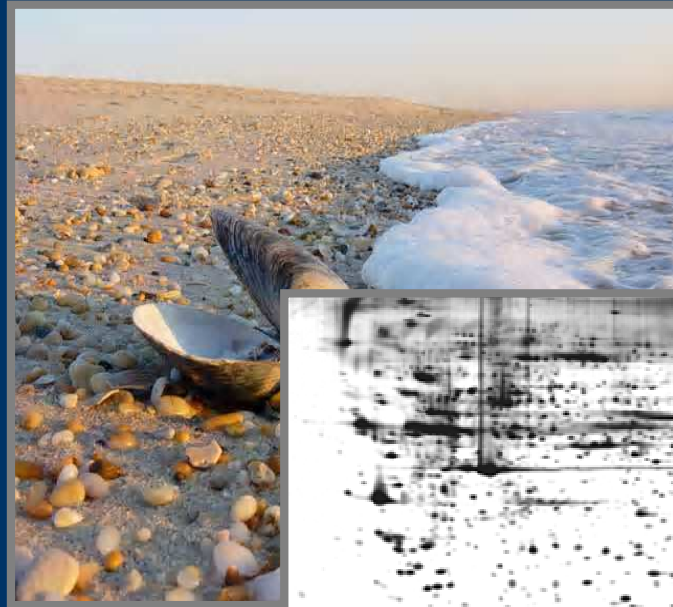


*Análisis genético del mejillón marino
Mytilus galloprovincialis Lmk. mediante
técnicas proteómicas*



TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ESTHER MOSQUERA GÓMEZ

Santiago de Compostela, Enero de 2005

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**Análisis genético del mejillón marino
Mytilus galloprovincialis Lmk. mediante técnicas
proteómicas**

MEMORIA, QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTA
ESTHER MOSQUERA GÓMEZ
SANTIAGO DE COMPOSTELA, ENERO DE 2005

El Dr. Gonzalo Alvarez Jurado, Catedrático del Departamento de Genética de la Universidad de Santiago de Compostela y el Dr. José Luis López Rodríguez, Profesor Titular de dicho Departamento

CERTIFICAN

Que la presente Memoria que lleva por título "ANÁLISIS GENÉTICO DEL MEJILLÓN MARINO *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LMK. MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS" que para la obtención del grado de Doctor presenta Dña. Esther Mosquera Gómez, ha sido realizada bajo su dirección, que la consideran concluida y autorizan su presentación al tribunal calificador.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Santiago de Compostela a 17 de Enero de 2005.

Dr. Gonzalo Alvarez Jurado

Dr. José Luis López Rodríguez

Esther Mosquera Gómez

Este trabajo ha sido financiado en parte, con una Beca de Tercer Ciclo y una Pre-doctoral concedida por la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia y por el proyecto de investigación de la Xunta de Galicia PGIDT 00 MAR 2001 PR.

A mí padre
TQB



Lo más hermoso que
podemos experimentar es
el misterio de las cosas.
Albert Einstein.

Agradecimientos:

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis, Dr. Gonzalo Álvarez Jurado y Dr. José Luis López Rodríguez, el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por todo lo que en este tiempo he podido aprender, así como su contribución al mismo.

Al Dr. José Miguel Fuentes, a quien debo la consecución de la mayor parte de las muestras analizadas en este trabajo, por su desinteresada disposición para ayudar en cuanto estuviera en sus manos.

También a aquellos compañeros de laboratorio, que de una manera u otra me han ayudado durante este tiempo, un recuerdo especial para Silvia con quien he compartido en medio de charlas y silencios muchas electroforesis, sus rutinas y sus momentos mágicos, como ese en el que las constelaciones de "spots" empiezan a surgir de la aparente y transparente uniformidad del gel. Cris aportó en esta última etapa sus particulares inyecciones de energía y buen humor. Gracias a Rebeca por su afecto y a Ana por muchos momentos de complicidad y risas en el pasado y por estar en lo sucesivo ahí en los momentos clave, buenos y malos. Al Dr. Carlos Zapata, con quien empezó hace ya algunos años mi particular singladura en el mundo de la investigación y que ha sido un buen compañero en momentos difíciles. A Nemancos, por una amistad que se ha ido forjando a lo largo de estos años de trabajo y en la que siempre he encontrado apoyo. Y por supuesto a Jos, con quien he compartido muchas horas de trabajo, a pesar de tormentas y mareas, amigo, hermano y compañero. A todos ellos, gracias por añadir su particular pizca de sal a esta etapa de mi vida.

Y ¡como no!, al motor último de todas las cosas, a mi familia, que siempre me ha brindado su apoyo: a Paco, piedra angular de mi descanso, mi fuerza y mi alegría, no creo que haya palabras para agradecer todo lo que durante estos años ha hecho por mí; a Hugo, que ha endulzado esta última etapa de trabajo; a mi madre; a Sam ... y muy especialmente a mi padre: su inteligencia clara, directa y práctica, su tremenda capacidad de análisis, sus ansias de saber y su nobleza han sido y serán mi modelo a seguir toda mi vida, su personalidad y su cariño calentarán mi alma mientras viva.

ABREVIATURAS

AOOF: Frente oceanográfico Almería - Orán

APS: Persulfato amónico

CHAPS: 3-(3-Cocoamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato

DNAmt: DNA mitocondrial

DTT: 1,4 – Ditiotreitól

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización para la agricultura y la alimentación

HWE: Equilibrio Hardy-Weinberg

IEF: Isoelectroenfoque

IPG: Gradiente de pH inmovilizado

NEPHGE: Electroforesis en gel en condiciones de no equilibrio

NP-40: Nonidet P – 40

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

pI: Punto isoeléctrico

pM: Peso molecular

psu: Unidades prácticas de salinidad

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TEMED: N, N, N', N' - Tetrametil – etilen diamino

TIROS: Satélite de televisión observacional infrarrojo

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometano

2-DE: Electroforesis bidimensional

1-DE: Electroforesis clásica

RESUMEN

En el presente trabajo se ha empleado la electroforesis bidimensional (2-DE) y otras técnicas proteómicas para realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de la expresión proteica de mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

Con el fin de detectar posibles diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal, se comparó la expresión de 92 polipéptidos separados mediante 2-DE encontrándose diferencias estadísticamente significativas en 45 (48,9%) de ellos. Estas diferencias se discuten en conexión con los cambios moleculares implicados en la adaptación de mejillones a diferentes condiciones ecológicas.

Se ha empleado la electroforesis bidimensional como una fuente de marcadores monogénicos y codominantes para el estudio genético de poblaciones naturales de *Mytilus galloprovincialis*.

Así, se ha utilizado la 2-DE para medir el nivel de variabilidad genética de *loci* que codifican proteínas abundantes de dicho mejillón marino, obteniéndose los niveles más elevados de heterozigosis media ($0,101 \pm 0,018$) detectados hasta la fecha en una especie animal mediante 2-DE. Estos resultados ponen de manifiesto que es necesario un replanteamiento en torno a la cuestión de los niveles de variabilidad que la 2-DE es capaz de detectar.

Se estudió la estructura genética de poblaciones naturales de *Mytilus galloprovincialis* a partir de 8 muestras procedentes de las costas atlántica y mediterránea de la Península Ibérica, mediante el análisis de la variación genética existente en 38 *loci* polimórficos separados mediante 2-DE y su comparación con resultados precedentes obtenidos por otros autores mediante el estudio de alozimas. Se observó la existencia de una discontinuidad genética asociada al frente oceanográfico Almería – Orán y coincidente con la detectada en estudios previos mediante el análisis de marcadores de alozimas y DNA mitocondrial. El nivel de diferenciación genética detectado es más de tres veces superior al detectado mediante el análisis con alozimas. Se aportan nuevos datos acerca de las fuerzas evolutivas responsables de este patrón de estructura genética poblacional.

SUMMARY

Proteomic tools, essentially two-dimensional electrophoresis (2-DE), were used for the quantitative and qualitative analysis of the protein expression of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

The quantitative expression of 92 selected proteins separated using classical 2-DE was compared between intertidal and cultured mussels. Statistically significant differences were detected in the expression of 48.9% of the polypeptides analysed. These findings are discussed in connection with the molecular changes involved in the adaptation of mussels to different ecological conditions.

Furthermore, two-dimensional electrophoresis has been used as a source of monogenic and codominant markers for population genetic studies in natural populations of *Mytilus galloprovincialis*.

Classical 2-DE has been used to measure the degree of genetic variability of *loci* coding abundant proteins of this marine mussel. The highest 2-DE estimates of average heterozygosity (0.101 ± 0.018) reported to date in an animal species were obtained. It is suggested that these data throw open the question of the level of genetic variability detectable by 2-DE.

Genetic structure of natural populations of *Mytilus galloprovincialis* was investigated from 8 samples collected from Atlantic and Mediterranean coasts of the Iberian Peninsula through analysis of 2-DE variation at 38 polymorphic *loci* and comparison with preceding allozyme data. A genetic discontinuity associated to the Almería – Orán oceanographic front and coincident with that previously reported for allozyme and mtDNA data was observed. The level of genetic differentiation detected was nearly three-fold higher than that reported for allozyme *loci*. Additional insights on the evolutionary forces responsible of this pattern of genetic structure were provided.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	15
1. Recolección de muestras	17
2. Preparación de las muestras	19
3. Valoración de la concentración proteica de las muestras	21
4. Electroforesis bidimensional (2-DE)	24
4.1. Primera dimensión: El isoelectroenfoque	25
4.1.1. Anfólitos transportadores sintéticos (técnica clásica)	25
4.1.2. Gradiente de pH inmovilizado en el gel (IPGs)	30
4.2. Equilibrado de los geles de primera dimensión	33
4.3. Segunda dimensión: SDS - PAGE	34
5. Fijación y tinción de los geles	38
6. Análisis informático de los patrones proteicos bidimensionales (Análisis cuantitativo)	40
7. Selección de polipéptidos para el análisis de polimorfismos genéticos (Análisis cualitativo)	40
8. Terminología de los polipéptidos	41

9. Criterios para la identificación de polimorfismos	42
10. Variabilidad genética intrapoblacional	43
11. Ajuste a las proporciones esperadas en el equilibrio Hardy-Weinberg	44
12. Estructura genética poblacional	47
12.1. Medida de la diferenciación genética entre poblaciones	47
12.2. Estimación del flujo génico	49
12.3. Medidas de distancia genética y construcción de árboles filogenéticos	51
13. Desequilibrio gamético	53
14. Otros análisis estadísticos	55
III. RESULTADOS	57
1. Diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal	59
2. Variabilidad genética intrapoblacional detectada mediante electroforesis bidimensional	67
2.1. Selección de los polipéptidos para el análisis e identificación de polimorfismos genéticos	69
2.2. Ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg	73
2.3. Variabilidad genética intrapoblacional	79

	XIX
2.4. Desequilibrio gamético	82
3. Estructura genética poblacional	89
3.1. Selección de polipéptidos para el análisis e identificación de polimorfismos genéticos	91
3.2. Frecuencias génicas y variabilidad genética intrapoblacional	96
3.3. Distancia genética y filogenia	115
3.4. Ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg	120
3.5. Diferenciación genética entre poblaciones	126
3.6. Flujo génico	145
3.7. Desequilibrio gamético	150
IV. DISCUSIÓN	159
1. Diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal	161
2. La variabilidad genética de las poblaciones de mejillón detectada mediante electroforesis bidimensional	164
3. Diferenciación genética de las poblaciones de mejillón de la Península Ibérica y el frente oceanográfico Almería - Orán	170
V. CONCLUSIONES	183
VI. REFERENCIAS	189
VII. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS	213

El mar, origen de la vida, es depositario de una enorme y poco conocida diversidad de regiones, ecosistemas, plantas, animales, microorganismos, genes y moléculas orgánicas. El mar, en apariencia homogéneo, es muy heterogéneo; de la antigüedad del mar y de sus especies, de la adaptación a ambientes diferentes, de su diversidad específica, de la dispersión de sus poblaciones se espera una gran diversidad genética.



*"It's funny when you think about it.
It's like the DNA world is finite but
maybe the protein world is infinite".
D. Hochstrasser*

INTRODUCCIÓN



*"The last decade has witnessed a
revolution in molecular biology. The
result has been an era of holistic biology,
where it is now accepted that biology
must be studied on a global scale".*

Jenny L. Harry

En la era post-genómica, la proteómica se está erigiendo como una herramienta fundamental en la investigación de los sistemas biológicos al abordar el vacío de conocimiento existente entre el genoma y la célula viva, tratando de identificar las proteínas expresadas en cada momento y que proporcionan a las células sus estructuras y sus funciones (*Anderson y Anderson, 1998; Hochstrasser, 1998*). El término “proteoma” fue acuñado por Marck Wilkins en 1995 para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma. Se trata de un elemento altamente dinámico, cuyos componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular dados, como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, efectores o señales bioquímicas o su estado fisiológico o patológico (*Anderson y Anderson, 1996*). Estos factores incrementan de forma considerable la complejidad del proteoma, como consecuencia de la activación o supresión de genes, las alteraciones en la intrincada pauta de interacciones intracelulares entre las proteínas o los cambios en sus modificaciones post-traduccionales (*Anderson y Anderson, 1998*). Aunque el término proteoma se aplica indiscriminadamente a cualquier conjunto de proteínas, su acepción más precisa es la que se refiere al conjunto de proteínas que componen una célula o tipo celular dado, en unas condiciones determinadas. El proteoma de una célula es la expresión de su fenotipo característico, y las diferencias entre un tipo celular y otro o entre un mismo tipo celular en diferentes situaciones, se pueden con cierta propiedad asignar a los cambios que tienen lugar en la expresión y funcionalidad de sus proteínas. La proteómica podría definirse como la ciencia de o el conjunto de técnicas que se usan para el análisis

sistemático del proteoma. Su objetivo principal es describir la expresión proteica de una célula o tejido y los cambios que en ella ocurren debido a la influencia de factores de diverso origen (variaciones ambientales, estrés, estado fisiológico de la célula, etc.).

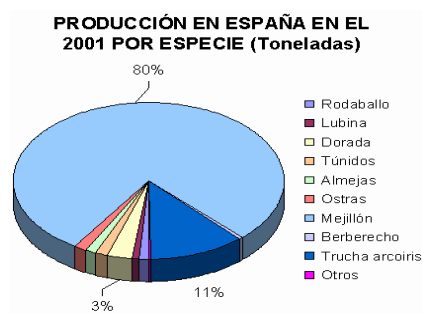
La electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE), descrita por primera vez hace más de un cuarto de siglo, es la técnica central en los estudios proteómicos y la base sobre la cual la proteómica se ha desarrollado ya que ha demostrado ser la técnica más poderosa para separar mezclas complejas de proteínas de muy diverso origen biológico (*Rabilloud, 2002*). Su elevado poder resolutivo se basa en que separa proteínas en base a dos criterios independientes: el punto isoeléctrico (en la primera dimensión) y el peso molecular (en la segunda dimensión) (*O'Farrell, 1975*). Posibilita así, la separación y visualización en un solo gel de todos los componentes proteicos mayoritarios de una célula o tejido, dando lugar a un patrón de "spots" que es característico de tejidos, condiciones ambientales y genotipos. Desde que fuera descrita de forma independiente por Patrick O'Farrell y Joachim Klose en 1975, ha experimentado una serie de mejoras importantes. Entre ellas, cabe destacar la introducción de gradientes de pH inmovilizados en la primera dimensión gracias al uso de inmovilinas (*Bjellqvist et al., 1982; Görg et al., 1988*) como agentes formadores de pH, en lugar de los anfólitos transportadores libres empleados en la técnica original. Con ello se ha podido ampliar el rango de proteínas analizables mediante 2-DE, aumentar la reproducibilidad entre laboratorios, simplificar en gran medida el proceso electroforético y facilitar la identificación de las proteínas separadas en los

geles bidimensionales al permitir cargar mayor cantidad de proteína en cada gel.

Las técnicas proteómicas se han aplicado en el estudio de un gran número de problemas biológicos, bioquímicos y biomédicos y en un gran número de organismos. Sin embargo, apenas se han realizado estudios proteómicos en moluscos marinos. En este trabajo se emplean técnicas proteómicas (fundamentalmente 2-DE) para el análisis cuantitativo y cualitativo de la expresión proteica del mejillón marino *Mytilus galloprovincialis*.

Los mejillones del género *Mytilus* se encuentran entre los moluscos marinos más comunes y constituyen un elemento fundamental en la ecología de las aguas costeras. Viven adheridos a las rocas o al fondo marino en la zona intermareal en aguas tropicales y templadas de todo el mundo, conformando extensas poblaciones naturales o bancos. En las costas europeas existen tres formas de mejillón del género *Mytilus*, de las que las principales son *M. edulis*, que se encuentra en las aguas frías del norte de Europa, y *M. galloprovincialis*, que se distribuye por las aguas templadas del Mediterráneo extendiéndose por la costa atlántica española hasta Francia y Reino Unido (Sanjuan et al., 1990; 1994).

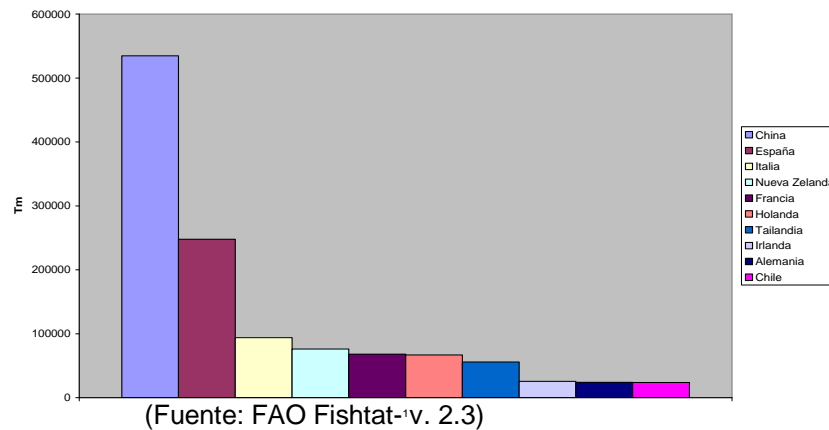
En España, y especialmente en Galicia, el cultivo de este molusco marino tiene una gran importancia económica. La miticultura representa el 80% de la producción acuícola española y el 95 % de la gallega.



(Fuente: FAO Fishtat- v. 2.3)

El cultivo de *Mytilus galloprovincialis* en aguas costeras gallegas, que constituye aproximadamente el 95 % de la producción española de mejillón, el 40 % de la producción europea y el 21 % del total mundial (Labarta, 2004), ha convertido a España en el primer productor europeo y segundo mundial (tras China) de este recurso marino. El sector mejillonero, con una elevada renta, unos 11.500 empleos entre fijos y temporales y 2.458 productores, que producen unas 290.000 toneladas de mejillón, continúa destacándose como sector estratégico para Galicia y principal armazón de la acuicultura en España (Labarta 2000). El “cluster” del mejillón genera en Galicia unos beneficios anuales que rondan los 420 millones de euros.

Principales productores mundiales de mejillón. Año 2000.



Las aplicaciones de la electroforesis bidimensional son numerosas, especialmente en el contexto de los estudios de proteómica de expresión (estudio de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable). Por ejemplo, para detectar y cuantificar modificaciones en la expresión proteica durante el desarrollo, bajo diferentes tipos de estrés o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. La aparición o

desaparición de “spots” en los geles bidimensionales proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas y la intensidad de los “spots” permite conocer los niveles de expresión proteica. En este trabajo se ha estudiado mediante 2-DE la existencia de posibles alteraciones en los niveles de expresión proteica entre dos poblaciones de mejillón procedentes de condiciones ecológicas diferentes (una cultivada en batea y otra procedente del intermareal).

Desde un punto de vista cualitativo, la técnica de electroforesis bidimensional permite disponer de un gran número de marcadores genéticos diferentes a los analizados hasta la fecha en mejillón. Varios autores han hecho referencia a la 2-DE como una técnica que permite estudiar un gran número de marcadores genéticos que pueden ser de gran utilidad en los estudios de genética de poblaciones ya que son monogénicos, codominantes y probablemente no estén sometidos a un fuerte efecto de la selección natural (*Leigh Brown y Langley, 1979; De Vienne et al., 1996*). Además, la elevada resolución de esta técnica permite separar en un solo gel miles de productos génicos y detectar cambios del orden de 0,02 unidades de pH en la primera dimensión y de 1 kDa. en la segunda dimensión, por lo que provee de un gran número de marcadores distribuidos aleatoriamente por el genoma. Al contrario que la electroforesis convencional (1-DE) que restringe su análisis a proteínas solubles en estado nativo, fundamentalmente enzimas, la electroforesis bidimensional (2-DE) permite estudiar un amplio espectro de proteínas y examinar por tanto un mayor número de *loci* codificadores de proteínas. Esto sugiere que la 2-DE podría tener un gran potencial para el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones, ya que permite analizar una

muestra del genoma más representativa. Sin embargo, son muy escasos los estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales realizados mediante 2-DE, debido a la complejidad técnica de la misma y a su mayor duración respecto a la 1-DE. Además, en ellos se obtuvieron estimas de variabilidad genética sustancialmente inferiores a las detectadas mediante 1-DE (Edwards y Hopkinson, 1980; Aquadro y Avise, 1981; Neel, 1990). No obstante, estos estudios se focalizaron en un número muy reducido de especies (esencialmente hombre y *Drosophila*) de manera que la información de la que se dispone es redundante y sesgada como para obtener una visión adecuada de los niveles de variabilidad que la 2-DE es capaz de detectar. En el hombre, las estimas de heterozigosis media (H) en diferentes tejidos varían entre 0,000 y 0,040 cuando se analizan más de 30 *loci* (Walton et al., 1979; Smith et al., 1980; Hamaguchi et al., 1981; Comings, 1982; Goldman y Merrill, 1983; Rosenblum et al., 1983; Hanash et al., 1986a,b; Takahashi et al., 1986). Otros estudios realizados en el hombre pero basados en menos de 30 *loci* detectaron niveles de heterozigosis media superiores a éstos (Rosenblum et al., 1984; Asakawa et al., 1985). Aparte del hombre solo se han analizado mediante 2-DE los niveles de variabilidad de otras dos especies de mamíferos: guepardo (H = 0,013, O'Brien et al., 1983) y ratón (H = 0,020, Racine y Langley, 1980). En invertebrados, las estimas de variabilidad genética obtenidas mediante 2-DE se encuentran restringidas a dos especies de *Drosophila*, en las cuales las estimas de heterozigosis media detectadas son muy similares a las descritas en mamíferos (0,040 y 0,018 para diferentes tejidos de *D. melanogaster*, 0,000 y 0,028 para diferentes tejidos de *D. simulans*; Leigh Brown y Langley, 1979; Ohnishi et al., 1982; Coulthart y Singh, 1988). Se

requiere por tanto la obtención de estimas adicionales de variabilidad genética mediante 2-DE en vertebrados e invertebrados.

En este trabajo se ha empleado la técnica de electroforesis bidimensional para determinar el nivel de variabilidad genética de las proteínas abundantes del mejillón marino *Mytilus galloprovincialis*. Los moluscos son uno de los grupos taxonómicos del reino animal en los que se han detectado niveles de variabilidad genética más elevados (valor medio de heterozigosis en marcadores alozímicos $0,145 \pm 0,010$ para 105 especies de moluscos revisadas por *Ward et al., 1992*). De hecho, en la especie *Mytilus galloprovincialis* se han detectado niveles de heterozigosis particularmente altos ($H= 0,240$, *Grant y Cherry, 1985*).

El uso de los marcadores de electroforesis bidimensional para el estudio de la diferenciación genética entre poblaciones y el análisis de la estructura poblacional, ha estado todavía más restringido que para el estudio de la variabilidad genética intrapoblacional. Su empleo en estudios filogenéticos ha demostrado ser de gran utilidad y fiabilidad en análisis sistemáticos de varios grupos de organismos (felinos: *Slattery et al., 1994*; osos: *Goldman et al., 1989* y primates: *Goldman et al., 1987*; *Janckzewski et al., 1990*). En varios estudios se han obtenido fundamentalmente las mismas relaciones filogenéticas mediante el análisis de este tipo de marcadores y análisis de secuenciación nucleotídica (*Bargelloni et al., 1994*; *Ritchie et al., 1997*; *Tokita et al., 2002*). La 2-DE permite inferir diferencias genéticas entre organismos basadas en comparaciones de cientos de proteínas codificadas por un gran número de genes, en contraste con los análisis filogenéticos a partir de secuenciación nucleotídica de uno o unos pocos genes (en los que no se puede excluir la

posibilidad de que las relaciones filogenéticas resultantes puedan estar sesgadas debido a que se muestrean un número pequeño de caracteres genéticos). Estimaciones conservadoras indican que una muestra de 400 *loci* proteicos separados mediante 2-DE equivalen al estudio de 100.000 nucleótidos (Goldman y O'Brien, 1993).

Los mejillones constituyen el grupo de organismos marinos más empleado en estudios genéticos. Hay varias razones para ello, como es la amplia distribución del género, que los hace especialmente adecuados para el estudio de poblaciones de la misma o distintas especies en diferentes escalas geográficas. Además, como ocupan un amplio rango de ambientes dentro de una misma área geográfica, se pueden comparar los niveles de variabilidad genética entre mejillones de diferentes hábitats. Asimismo, los dos estadios presentes en su vida (fase de larva pelágica y fase adulta sedentaria) facilitan el estudio de las contribuciones relativas de la selección natural y del flujo génico en el mantenimiento de los patrones de variación genética en las poblaciones naturales.

Uno de los factores más importantes que pueden interferir en la interpretación de la estructura genética actual de una especie es la historia de esa especie en relación con los cambios hidro-geológicos del ambiente en el que evolucionó. Se cree que *Mytilus galloprovincialis* se originó en el Mediterráneo a partir de *Mytilus edulis* durante el Pleistoceno (Barsotti y Merluzzi, 1968). En esta época el contacto entre el mar Mediterráneo y el océano Atlántico se vio interrumpido en el transcurso de sucesivas glaciaciones. Las diferentes condiciones ambientales existentes en el mar Mediterráneo junto con la interrupción del flujo entre ambas masas de agua probablemente favorecieron la diferenciación y dieron lugar al origen de

esta nueva especie, que posteriormente, con la apertura del estrecho de Gibraltar, se extendería a través de éste hacia el Atlántico.

La distribución actual de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo de la Península Ibérica presenta unas características genéticas muy interesantes. Estudios realizados con marcadores enzimáticos y de DNA mitocondrial demostraron que existe una fuerte disrupción genética asociada al frente Almería – Orán (Sanjuan *et al.*, 1994; 1996; 1997; Quesada *et al.*, 1995 a, b), una barrera oceanográfica que delimita el extremo oriental del mar de Alborán. El mar de Alborán, entre España y Marruecos, tiene aproximadamente 400Km de largo, 170Km de ancho y 2.000m de profundidad (Hauschildt *et al.*, 1999). Como brazo más occidental del mar Mediterráneo y abierto al océano Atlántico por el estrecho de Gibraltar, se convierte en una zona de transición entre estas dos cuencas de características oceanográficas radicalmente distintas (Carballo *et al.*, 1997). El desnivel entre ambas cuencas (14cm) permite un intercambio de aguas que se traduce en un flujo superficial de agua atlántica que entra en el Mediterráneo y se extiende hacia el oriente, mezclándose poco a poco con aguas inferiores y soportando una evaporación y un calentamiento variable en la superficie, en función de la época del año y la situación geográfica. Estas aguas vuelven al Atlántico como aguas intermedias y profundas, estableciéndose una circulación bicapa (Bornans *et al.*, 1986). La cantidad neta estimada de agua que fluye a través del estrecho es de aproximadamente 75.000m³/s (Sawyer, 1987). En esencia, la corriente atlántica, fuertemente baroclina, penetra en el mar de Alborán formando uno o dos torbellinos anticiclónicos semi-permanentes, uno occidental y otro oriental más inestable, antes de ser

canalizada y dar origen a la corriente argelina. Durante el tránsito, la corriente atlántica se va transformando en agua atlántica modificada. En el límite nordeste del torbellino oriental, la corriente de agua atlántica modificada converge con las aguas superficiales mediterráneas más salinas y más densas, procedentes del sureste peninsular, originando una discontinuidad en la densidad, conocida como frente Almería - Orán (AOOF), que suele extenderse normalmente de noroeste a sureste. Estos torbellinos y corrientes se manifiestan claramente, en las imágenes infrarrojas captadas por los satélites TIROS (Satélite de televisión observacional Infrarrojo):



El AOOF es una zona de fuertes corrientes (1m/s) en la que se dan cambios bruscos en la temperatura del agua y en su salinidad (1,4°C, 2psu en 2Km) (*Tintore et al., 1988*). Todo ello puede convertirlo en una importante barrera que impida el flujo génico entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas, que viven y se adaptan a medios con características oceanográficas diferentes, contribuyendo de esta manera a su diferenciación.

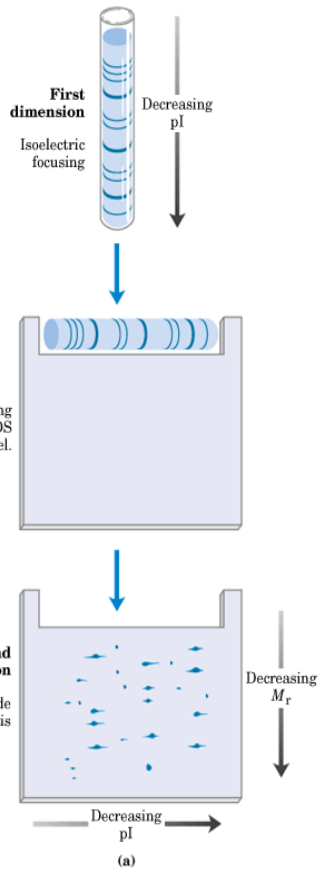
Estudios posteriores demostraron la existencia de un patrón de diferenciación similar entre poblaciones atlánticas y poblaciones

mediterráneas en otras especies de moluscos (*Sepia officinalis*: Pérez-Losada et al., 1999; 2002; *Pecten maximus* y *Pecten jacobaeus*: Ríos et al., 2002), crustáceos (*Chthamalus montagui*: Dando y Southward, 1981; Pannacciulli et al., 1997; *Chthamalus stellatus*: Pannacciulli et al., 1997; *Meganyctiphanes norvegica*: Zane et al., 2000) y peces (*Sardinella aurita*: Chikhi et al., 1997; *Gobius paganellus*: Amores et al., 1990; *Platichthys flesus*: Galleguillos y Ward, 1982, Borsa et al., 1997; *Platichthys stellatus*: Borsa et al., 1997; *Dicentrarchus labrax*: Naciri et al., 1999; *Merluccius merluccius*: Pla et al., 1991, Roldán et al., 1998; *Aphanius iberus*: Perdices et al., 2001). No obstante, sólo en algunos casos (*Sepia officinalis*, *Gobius paganellus*, *Dicentrarchus labrax*, *Meganyctiphanes norvegica*, *Chthamalus montagui*, *Chthamalus stellatus*, *Pecten maximus* y *Pecten jacobaeus*) este patrón de diferenciación se ha asociado con el frente oceanográfico Almería - Orán. En otras especies en cambio (*Nephrops norvegicus*: Stamatis et al., 2004; *Ostrea edulis*: Saavedra et al., 1993, 1995; Launey et al., 2002), no parece existir un cambio genético abrupto en esta zona. La medida en la que esta barrera influye sobre la distribución de las diferentes especies que habitan ambas cuencas dependerá tanto de sus características como de las de la especie en cuestión. En cualquier caso, el estudio de marcadores enzimáticos y de DNA ha puesto de manifiesto que esta zona de transición entre dos cuencas marinas con características ecológicas distintas parece constituir un área de gran importancia filogeográfica y de discontinuidad genética para varias especies. Todos los estudios realizados a este respecto tienen como precursores los llevados a cabo en *Mytilus galloprovincialis* mediante el estudio de marcadores

alozímicos (Sanjuan et al., 1994; Quesada et al., 1995a; Sanjuan et al., 1997) y de DNA mitocondrial (Quesada et al., 1995b; Sanjuan et al., 1996).

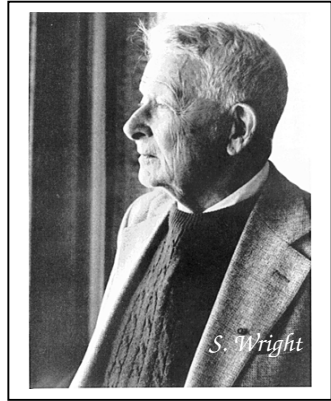
En este trabajo se pretende analizar la utilidad de los marcadores de electroforesis bidimensional para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica en relación al frente oceanográfico Almería - Orán. Asimismo, se pretende refinar la comprensión de la historia y evolución de esta especie en la Península Ibérica a través del estudio de la estructura genética de sus poblaciones mediante marcadores de 2-DE y la comparación con los datos obtenidos anteriormente por Quesada (1992) con el análisis de marcadores alozímicos.

Hasta la fecha, el grado de asociaciones no al azar o desequilibrio de ligamiento entre *loci* que codifican proteínas abundantes en poblaciones naturales se desconoce. La 2-DE permite separar en un solo gel un gran número de productos génicos, de manera que el genotipo multi*locus* de cada individuo puede inferirse directamente. A partir de estos datos, pueden estudiarse asociaciones entre polimorfismos genéticos en poblaciones con apareamiento al azar (Excoffier y Slatkin, 1995; Slatkin y Excoffier, 1996; Weir, 1996). Además, la magnitud del desequilibrio de ligamiento entre marcadores genéticos, resultado de la acción de varias fuerzas como mutación, selección, deriva o mezcla de poblaciones durante la historia evolutiva de una población, pueden utilizarse para inferir de forma indirecta cuán estrechamente están ligados en el mismo cromosoma. En este trabajo, se estudia el nivel de asociaciones no al azar entre *loci* codificadores de proteínas abundantes en poblaciones naturales de *Mytilus galloprovincialis*.



MATERIAL

MÉTODOS



1.- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se muestrearon un total de 12 poblaciones de mejillón pertenecientes a la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Sanjuan et al., 1990, 1994, 1997) distribuidas a lo largo de la costa de la Península Ibérica.

Dos de ellas, muestreadas en Vilagarcía (Noroeste de la Península Ibérica) en Noviembre de 1998, proceden de condiciones ambientales diferentes: una se extrajo de la franja del intermareal en una zona expuesta al oleaje; la otra en cambio procede de cultivo en batea en una zona resguardada en el interior de la Ría de Arosa. Los mejillones de ambas zonas se encuentran expuestos a condiciones físicas (temperatura, desecación, turbulencia) y ecológicas (disponibilidad de alimento, depredación) muy diferentes. En el intermareal los mejillones se encuentran expuestos a períodos de desecación debido a las mareas, durante los cuales no tienen disponibilidad de nutrientes y soportan temperaturas que pueden descender hasta 0°C en invierno y subir hasta 30°C en verano. En cambio, los de cultivo se encuentran permanentemente sumergidos en un ambiente estable y rico en nutrientes con temperaturas que oscilan entre los 12°C en invierno y los 19°C en verano (Fuentes et al., 2000). De cada una de estas poblaciones se extrajo una muestra de cuatro individuos adultos que se analizaron mediante electroforesis bidimensional de alta resolución con anfolitos (técnica clásica) para detectar posibles diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal.

Otras dos poblaciones, una natural procedente de Ribadeo, de la que se extrajo a partir del nivel inferior de la franja intermareal una muestra de 30 individuos adultos en Junio de 1999, y una cultivada en Vilagarcía, de la que se extrajo en Noviembre de 1997 una muestra de 8 individuos adultos, se emplearon para analizar los niveles de variabilidad genética de *Mytilus galloprovincialis* mediante electroforesis bidimensional de alta resolución con anfolitos (técnica clásica).

Las ocho poblaciones restantes se distribuyen a lo largo de las costas atlántica y mediterránea de la Península Ibérica, de manera que cuatro se encuentran al oeste del frente oceanográfico Almería – Orán (Santander, Ribadeo, Sintra y Marbella) y las otras cuatro al este de dicho frente (Águilas, Valencia, Cullera, Vilanova i la Geltrú). De cada una de ellas se extrajeron muestras de 30 individuos adultos entre Abril de 2001 y Julio de 2002 que se analizaron mediante la técnica de electroforesis bidimensional con inmóvilinas para estudiar la estructura genética de las poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica. En la mayoría, el muestreo se realizó durante la bajamar a partir del nivel inferior de la franja intermareal. En el caso de las poblaciones de Águilas y Vilanova i la Geltrú, ante la imposibilidad de encontrar mejillones en la zona intermareal, el muestreo se realizó en poblaciones de mejillones del infralitoral adheridos a jaulas de cultivo de peces.

Los mejillones se trasladaron vivos al laboratorio de forma inmediata tras su muestreo dentro de recipientes refrigerados con un elevado grado de humedad (en neveras portátiles con hielo y papel mojado con agua de mar).

Lugar y fecha de muestreo de poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* analizadas mediante 2-DE con anfolitos (las cuatro primeras) y 2-DE con inmovilinas (las ocho últimas).

Localidad	Mes	Año
1.- Vilagarcía (cultivo)	Noviembre	1998
2.- Vilagarcía	Noviembre	1998
3.- Vilagarcía (cultivo)	Noviembre	1997
4.- Ribadeo	Junio	1999
5.- Santander	Mayo	2001
6.- Ribadeo	Abril	2001
7.- Sintra	Abril	2001
8.- Marbella	Septiembre	2001
9.- Aguilas	Julio	2001
10.- Cullera	Julio	2002
11.- Valencia	Noviembre	2001
12.- Vilanova i la Geltrú	Junio	2002

2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez en el laboratorio, los mejillones recolectados en cada muestreo se diseccionaron extrayéndoseles el pie que inmediatamente se congeló, liofilizó y conservó en viales de plástico a una temperatura de -80°C . Se escogió este tejido debido a que fue con el que se obtuvieron patrones electroforéticos de mayor calidad (Mosquera, 2000) y por no estar sometido a cambios estacionales, como el manto, o a contaminantes externos, como las branquias o la glándula digestiva.

Los tres pasos fundamentales en la preparación de las muestras para su análisis mediante electroforesis bidimensional (2-DE) son: rotura de las

células del tejido a analizar, solubilización de las proteínas presentes en la muestra y eliminación de sustancias tales como lípidos, polisacáridos o ácidos nucleicos que puedan interferir en la posterior separación electroforética. Para romper las células del pie de mejillón, se liofilizaron las muestras previamente congeladas y se pulverizaron con la ayuda de un homogeneizador. La liofilización contribuye a la rotura posterior de las células y evita la acción de las proteasas presentes en el tejido. La solubilización de las proteínas de la muestra es probablemente la etapa más crítica y por tanto un paso fundamental en el desarrollo de la técnica de electroforesis bidimensional ya que de ella depende en gran medida la calidad de los patrones proteicos obtenidos. Para obtener patrones reproducibles y comparables, es necesario que las proteínas estén totalmente solubilizadas, desnaturalizadas y que no interaccionen entre ellas. Para conseguirlo, las muestras se disuelven en un tampón de lisis cuya composición, aunque puede variar ligeramente, consta básicamente de:

- Un detergente no iónico (CHAPS, NP-40) que solubiliza las proteínas evitando que se produzcan precipitaciones que modifiquen la movilidad electroforética. Además, al ser un detergente no iónico no altera la carga de las mismas.
- Un agente desnaturalizante (urea, thiourea), que hace que las proteínas presenten todos los aminoácidos al medio, siendo la movilidad en el gradiente de pH lo más fiel posible a la estructura primaria. También es muy útil para que los agentes reductores puedan actuar, así como los detergentes. Al trabajar con urea a concentraciones altas, es necesario tener precaución de no calentar la muestra por encima de 37°C, situación

en la cual la urea se descompone y el isocianato resultante carbamila las proteínas que modifican entonces su movilidad electroforética tanto en la primera como en la segunda dimensión.

- Un agente reductor (DTT) que impida la formación de puentes disulfuro entre las proteínas, evitando que interaccionen.

En nuestro caso, la composición del tampón de lisis empleado varió ligeramente en la 2-DE clásica (urea 9,5M, NP-40 2%, anfolitos 7-9 2%, DTT 100mM) y la 2-DE con inmovilinas (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 3%) debido a los avances desarrollados entre la aplicación de ambas técnicas. Las muestras de pie de mejillón se solubilizaron disolviendo 20mg del tejido liofilizado en 1ml de tampón de lisis y manteniéndolo en agitación a una temperatura constante de 30°C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo y con el fin de eliminar los restos no proteicos del extracto que pudieran intervenir en el proceso de separación electroforética, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 14.000 g. Los sobrenadantes se conservaron en viales de plástico a -80°C hasta el momento de la electroforesis.

3.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LAS MUESTRAS

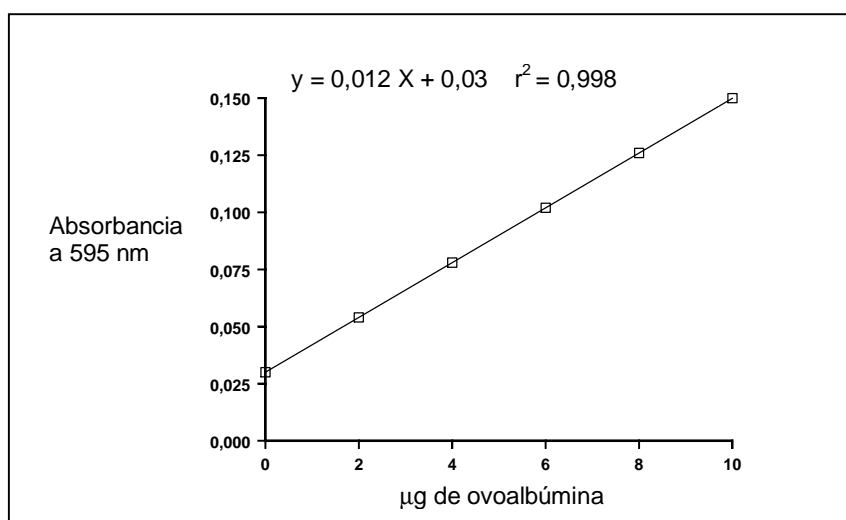
Los estudios, tanto cualitativos como cuantitativos, de las proteínas separadas en los geles bidimensionales pueden ser, en ocasiones, problemáticos si no se han cargado en los geles de primera dimensión cantidades similares de proteína (*O'Farrell, 1975; Ramagli y Rodríguez,*

1985). Este efecto es particularmente importante si se emplea un método de detección tan sensible como la tinción con plata que permite detectar cantidades de hasta 0,05 – 0,1ng de proteína / mm² de gel (Dunn, 1987). El conocimiento de la concentración proteica de la muestra es fundamental para controlar la cantidad de proteína que se carga en los geles de primera dimensión. La concentración de proteína disuelta en tampón de lisis no puede determinarse directamente por el método de Bradford, ni por ningún otro método específico para proteínas (Biuret o Lowry) debido a que los componentes del tampón de lisis (urea, detergentes, anfolitos, DTT) alteran la lectura espectrofotométrica. Para evitar este problema, Ramagli y Rodríguez (1985) desarrollaron un ensayo (Bradford modificado), consistente en acidificar el tampón de lisis previa dilución de las proteínas de la muestra. Así se pueden llevar a cabo mediciones fiables de la concentración de proteína en un rango de 0,5 a 50 µg. Este ensayo se aplicó a las muestras de pie de *Mytilus galloprovincialis*. En él, al igual que en el método tradicional de Bradford, es necesaria la construcción de una recta patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de una proteína determinada (en este caso, se utilizó la ovoalbúmina) disuelta en tampón de lisis y las medidas espectrofotométricas (absorbancias) correspondientes a cada una de ellas. En la siguiente tabla se indican las distintas concentraciones de ovoalbúmina (disuelta en tampón de lisis) empleadas para la elaboración de la recta patrón y las cantidades del resto de reactivos necesarios (ácido clorhídrico, agua ultrapura milliQ y reactivo de Bradford).

Ensayos realizados con diferentes concentraciones de proteína (ovoalbúmina) disuelta en tampón de lisis para su posterior lectura espectrofotométrica y elaboración de la recta patrón

Ovoalbúmina (μl)	Tampón de lisis (μl)	HCl (0,1 N) (μl)	H ₂ O milliQ (μl)	Reactivo de Bradford (ml)
0	10	10	80	3,5
2	8	10	80	3,5
4	6	10	80	3,5
6	4	10	80	3,5
8	2	10	80	3,5
10	0	10	80	3,5

A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm de cada una de las diluciones de ovoalbúmina en un espectrofotómetro. Con los valores obtenidos y los datos de concentración proteica empleados, se construyó la siguiente recta de regresión:



Recta de regresión de la absorbancia en función de la concentración de ovoalbúmina disuelta en tampón de lisis

Posteriormente, se realizaron diferentes diluciones en tampón de lisis de las muestras de pie de *Mytilus galloprovincialis* y se les aplicó el mismo procedimiento empleado con las muestras de ovoalbúmina:

Diluciones de las muestras de pie de *Mytilus galloprovincialis* preparadas para el análisis espectrofotométrico y determinación de la concentración proteica.

Pie (μ l)	Tampón de lisis (μ l)	HCl (0,1 N) (μ l)	H ₂ O milliQ (μ l)	Reactivo de Bradford (ml)
10	0	10	80	3,5
8	2	10	80	3,5
6	4	10	80	3,5
4	6	10	80	3,5
2	8	10	80	3,5
0	10	10	80	3,5

Con los valores de absorbancia obtenidos y haciendo uso de la recta de regresión construida anteriormente con la ovoalbúmina se determinó que la concentración de proteína que se obtiene al solubilizar 20mg de pie de *Mytilus galloprovincialis* en 1ml de tampón de lisis es 8,5 μ g/ μ l.

4.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

La electroforesis bidimensional de alta resolución fue desarrollada inicialmente por P. H. O'Farrell y J. Klose independientemente en 1975 y está considerada como la técnica experimental más resolutiva para separar mezclas complejas de proteínas en un solo gel. Consta de dos separaciones electroforéticas independientes: en la primera dimensión las

proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI) y en la segunda dimensión en base a su peso molecular (PM).

4.1.- Primera dimensión: el isoelectroenfoque

En la primera dimensión las proteínas se separan según su carga eléctrica en un gradiente de pH. En él, migrarán hacia el ánodo o el cátodo de acuerdo a su carga neta hasta alcanzar la región del gradiente de pH que coincida con su punto isoeléctrico (pI , pH específico en el cual la carga neta de la proteína es cero). El efecto del tamaño de las proteínas en la movilidad electroforética se minimiza utilizando geles de tamaño de poro grande (concentraciones de poliacrilamida en torno al 3,5%). El gradiente de pH en el gel puede lograrse mediante un sistema tampón con anfolitos transportadores o mediante un sistema de gradiente de pH inmovilizado.

4.1.1.- Anfolitos transportadores sintéticos (técnica clásica)

En la técnica original descrita por O'Farrell (1975), la primera dimensión es una electroforesis vertical que se realiza en geles de poliacrilamida polimerizados en tubos estrechos con gradientes de pH creados por anfolitos. Los anfolitos son moléculas anfotéricas solubles de pequeño tamaño (300 – 600Da) que poseen una gran capacidad amortiguadora cerca de su punto isoeléctrico (pI). Existen dos protocolos principales para sintetizar anfolitos transportadores: la reacción de diferentes oligoaminas (tetra-, penta-, y hexa- aminas) con ácido acrílico y la copolimerización de aminas, aminoácidos y dipéptidos con

epiclorhidrina. Estos procedimientos generan mezclas que contienen cientos o aún miles de especies anfóteras con valores de *pI* distribuidos en todo el rango de pH. Como distintas casas comerciales pueden emplear protocolos diferentes para la formación de anfolitos, se utilizaron siempre anfolitos de la misma casa comercial, ya que de lo contrario se vería afectada la reproducibilidad de los patrones proteicos bidimensionales. En presencia de un campo eléctrico, los anfolitos migran hasta el punto donde su carga neta es cero, formando un gradiente de pH continuo. Debido a que cada uno de los anfolitos tiene alta capacidad amortiguadora, el pH del medio que los rodea, es igual a su propio *pI*. Durante la electroforesis, las proteínas migrarán en ese gradiente hasta alcanzar un pH igual a su *pI*. Cabe destacar que los gradientes de pH creados por los anfolitos no son estables y tienden con el tiempo a la deriva hacia el cátodo.

Se analizaron mediante esta técnica cuatro poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* (3 procedentes de Vilagarcía y 1 de Ribadeo). La separación se realizó en geles cilíndricos de poliacrilamida de 180 x 1,5 mm al 4% (peso / volumen). Los tubos de cristal donde se polimerizan los geles de primera dimensión han de estar extremadamente limpios para que el gel permanezca firmemente adherido a las paredes del mismo durante la electroforesis. Para ello, entre cada electroforesis se lavaron depositándolos en mezcla crómica durante 10-12 horas, tras lo cual se lavaron con agua. A continuación se hirvieron en ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M durante 30 minutos. Se lavaron nuevamente con agua, esta vez destilada, y se introdujeron en etanol puro durante 30 minutos para finalmente secarlos en el microondas. La composición del gel de primera dimensión se describe en la siguiente tabla:

Composición del gel de primera dimensión (Isoelectroenfoque, IEF).

Urea	5,5g
Solución de Acrilamida (Acrilamida 28,38%, Bisacrilamida 1,62%)	1,3ml
NP-40 10%	2,0ml
Agua destilada	1,7ml
Anfolitos pH 5 - 7	0,6ml
Anfolitos pH 3 - 10	0,12ml
TEMED	7 μ l
APS 10%	10 μ l

Una vez mezclados todos los reactivos (excepto el TEMED y el APS) y solubilizada perfectamente la urea, se desgasificó la solución haciendo uso de una bomba de vacío. La desgasificación tiene por objeto eliminar el oxígeno de la solución ya que éste actúa como un inhibidor de la polimerización de la poliacrilamida. La razón de que se hayan mezclado anfolitos 5-7 con anfolitos 3-10 es que algunos lotes de anfolitos presentan “agujeros” en el gradiente de pH, lo cual puede provocar un calentamiento local que dañe la matriz en este punto. Una vez añadidos los agentes polimerizantes (TEMED y APS) se cargó rápidamente la solución del gel en el interior de los tubos de vidrio previamente sellados con parafilm en uno de sus extremos y dispuestos en un soporte vertical. Los tubos se llenaron con una aguja larga de punta roma cuidando que no quedaran burbujas y hasta una altura que distó 3 cm del extremo superior. La mezcla del gel se cubrió con agua destilada para evitar el contacto con el oxígeno del aire y se dejaron polimerizar durante tres horas. Transcurrido este

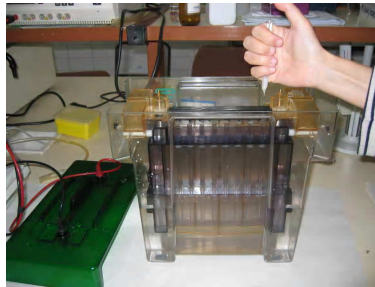
tiempo, se retiró el parafilm y el agua de los tubos y se transfirieron éstos a una cámara de electroforesis.



Elaboración de los geles de primera dimensión con anfolitos

Se determinó la cantidad óptima de muestra a cargar en la primera dimensión a fin de obtener patrones de gran calidad (buena resolución, distribución de los “spots” con ausencia de solapamiento, poca tinción de fondo, etc.) en los que se pueda observar el mayor número de “spots” posibles. Como la muestra se carga por uno de los extremos del gel, al principio de la electroforesis la concentración de proteínas es muy grande en la zona de carga y puede ocurrir precipitación de algunas proteínas que no entrarán en el gel y por tanto se perderán. Además, si alguna proteína se encuentra en grandes cantidades se concentrará en una zona concreta del gel pudiendo éste llegar a romperse. Se ve limitada por tanto, la cantidad de proteína que se puede cargar en los geles de primera dimensión. Se hicieron varias pruebas y finalmente se cargaron en cada gel entre 5 y 30 μ l de muestra haciendo uso de una jeringa Hamilton y a continuación 12 μ l de tampón de recubrimiento (urea 8M, anfolitos pH 7–9 1%, DTT 10mM), seguidos de la suficiente cantidad de hidróxido sódico (NaOH 20mM) como para acabar de llenar los tubos. El tampón de recubrimiento tiene por objeto evitar el contacto entre las proteínas de la

muestra y el hidróxido sódico. El reservorio superior de la cubeta de electroforesis se llenó con hidróxido sódico 20mM y se conectó al electrodo negativo. En el reservorio inferior, conectado al electrodo positivo se dispusieron tres litros de ácido fosfórico (PO_4H_3 10mM).



Carga de las muestras en los geles de primera dimensión (anfolitos)

Las condiciones del corrido electroforético fueron seguidas en base a las instrucciones proporcionadas por la casa comercial proveedora del sistema de electroforesis bidimensional (200V durante las dos horas iniciales seguidos de otras dos horas a 500V y por último 800V durante 16 horas). Todo el proceso se realizó a temperatura controlada mediante refrigeración por agua. Al finalizar la electroforesis de primera dimensión, los geles se extruyeron mediante inyección de agua a presión con una jeringa en el interior de los tubos, para someterlos de forma inmediata al proceso de equilibrado.

Este protocolo es incapaz de separar proteínas con pI superiores a 7,5. O'Farrell et al., (1977) modificaron la técnica original de manera que pudieran separarse las proteínas más básicas (NEPGHE, electroforesis en gel en condiciones de no equilibrio). De manera que si pretendiésemos analizar un rango 3-10, tendríamos que realizar dos electroforesis distintas, una para proteínas ácidas con pH comprendidos entre 3 y 7,5 (IEF) y otra

para proteínas básicas con pH entre 7,5 y 10 (NEPGHE). En el presente estudio no se empleó esta última debido a que el grado de reproducibilidad de los geles para proteínas básicas (NEPGHE) es muy bajo (O'Farrell *et al.*, 1977).

4.1.2.- Gradiente de pH inmovilizado en el gel (IPGs)

Con el fin de superar las limitaciones de la técnica clásica, Bjellqvist *et al.*, (1982) desarrollaron unos agentes formadores de gradientes de pH inmovilizados a los que llamaron inmovilinas (LKB, Bromma, Suecia). A finales de los 80, se diseñó una nueva metodología (Görg *et al.*, 1988) que utiliza geles de acrilamida al 4% deshidratados y unidos a un soporte plástico donde el gradiente de pH lo generan inmovilinas, unas moléculas anfotéricas unidas covalentemente a la matriz del gel (tiras IPG, Immobiline pH gradient DryStrip, Amersham Biosciences). Estos geles se obtienen mediante una serie de derivados de la acrilamida cuya estructura general es $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, donde R contiene grupos carboxilo o amino terciarios. Se trata en este caso de una electroforesis horizontal que permite un control más eficaz de la temperatura. La utilización de las tiras mejora enormemente la reproducibilidad (Corbett *et al.*, 1994) y el manejo de los geles. Los gradientes de pH, al encontrarse fijados covalentemente a la matriz del gel, son mucho más estables. El rango de pH analizable en un solo gel es mucho más amplio que en la electroforesis que emplea anfolitos (técnica clásica).

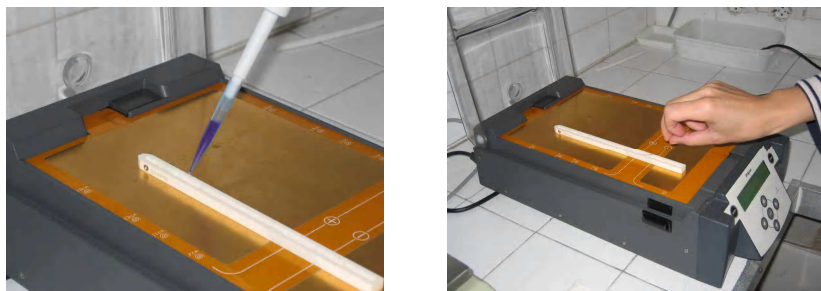
Las tiras se presentan deshidratadas y en varios tamaños (7, 11, 13 o 18 cm), abarcando un rango de pH variable y una distribución de dicho

rango que puede ser lineal (L) o no lineal (NL). Con el fin de optimizar la técnica para su aplicación al análisis de muestras de pie de mejillón, se hicieron pruebas con tiras de IPG de varias longitudes y rangos de pH lineales y no lineales. En este caso, como se pretendía analizar el mayor número posible de proteínas, se eligieron tiras de 18cm pH 3-10. Dado que la mayor parte de las proteínas de la muestra se concentraban en la zona central del gel, empleamos un gradiente no lineal (NL) que se distribuye sigmoidalmente entre los pH 5 a 7 (donde suelen concentrarse la mayor parte de las proteínas) reduciendo el solapamiento y favoreciendo una distribución de los “spots” más uniforme en el gel (*Bjellqvist et al., 1993*).

También se optimizó la cantidad de proteína o carga aplicable a cada gel en la primera dimensión para obtener patrones proteicos de gran calidad, la cual varía en función del gradiente de pH empleado, la distancia de separación (longitud de las tiras) y la complejidad proteica de la muestra. Según se pudo observar, cargando 30 μ l (~255 μ g) de muestra se obtenía un patrón con una excelente resolución y una gran cantidad de “spots” sin apenas veteado y solapamiento entre ellos.

La rehidratación de las tiras se llevó a cabo de forma simultánea a la aplicación de la muestra, mezclándose 315 μ l de tampón de rehidratación (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4%, azul de bromofenol trazas, DTT 0,3% p/v, tampón IPG 0,5% v/v) y 35 μ l de muestra. Estas proporciones se pueden variar, pero cuidando no sobrepasar los 350 μ l totales ya que en caso contrario, el gel no absorbería toda la solución y las proteínas permanecerían en la solución sobrante en vez de entrar en el gel. Dicha mezcla se extendió en unos recipientes de cerámica (“strip holders”) donde se realizó la primera dimensión y se dispuso encima el gel deshidratado,

cuidando que no se formaran burbujas entre la matriz del gel y la mezcla muestra-tampón de rehidratación. Las tiras de IPG se cubrieron entonces con aceite mineral para evitar la evaporación durante la electroforesis y la cristalización de la urea. Al no existir un punto concreto de aplicación de la muestra en el gel, se aumenta la resolución, ya que no se forman agregados proteicos que precipiten y provoquen estrías en el patrón proteico resultante. Además, se hace posible cargar una cantidad de muestra mucho más elevada (*Rabilloud et al., 1994*).



Carga de las muestras en los geles de primera dimensión (IPGs).

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una unidad IPGphor (Amersham Biosciences), sobre una placa refrigerada y siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. Es muy importante controlar la temperatura de los geles para que no suba de 20°C, lo cual podría afectar a la movilidad de algunas proteínas (*Görg et al., 1991*). Normalmente el corrido electroforético se realiza en varios pasos en los que el voltaje se aumenta de forma progresiva. Un voltaje inicial bajo minimiza la agregación de las proteínas de la muestra. La rehidratación se puede hacer de forma pasiva, sin aplicación de voltaje o bien activa, aplicando un voltaje bajo. Se realizó en este caso una rehidratación activa a 30V durante 12 horas para favorecer la entrada en el gel de las proteínas

de alto peso molecular (Görg *et al.*, 1999; 2000). Transcurridas estas 12 horas se inició inmediatamente el isoelectroenfoco a 500V durante 1 hora, seguidos de 1.000V también durante 1 hora y finalmente 8.000V hasta alcanzar un voltaje acumulado total de 33.500Vh. El tiempo de esta última fase puede variar dependiendo de la naturaleza de la muestra, la cantidad de proteína cargada en el gel y el método de aplicación de la misma. Una vez finalizada la primera dimensión los geles se sometieron de forma inmediata al proceso de equilibrado.



Electroforesis, primera dimensión (técnica de IPGs)

4.2.- Equilibrado de los geles de primera dimensión

El equilibrado es un paso intermedio que prepara los geles de primera dimensión para la electroforesis de segunda dimensión. Su función principal es poner en contacto las proteínas que han sido separadas en el isoelectroenfoco con el detergente SDS. El SDS es un agente desnaturizante con una fuerte carga negativa que se une a las proteínas enmascarando las diferencias individuales de carga entre ellas. Además, como la cantidad de SDS que se une a una proteína es directamente

proporcional a su masa, la migración en la segunda dimensión no dependerá de la carga de la proteína, si no únicamente de su masa.

Tras la primera dimensión los geles con anfolitos (técnica clásica) se mantuvieron durante 10 minutos sumergidos en solución de equilibrado (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 2%, DTT 100mM, glicerol 10%) para eliminar los anfolitos y la urea y permitir la interacción de las proteínas con el SDS. El equilibrado de los geles de primera dimensión con IPGs, difiere ligeramente debido a los avances incorporados a esta fase en los últimos años. Se realizó en dos pasos: en el primero los geles se incubaron durante 15 minutos en una solución de DTT (10mg/ml), que reduce los puentes disulfuro de las proteínas y las mantiene completamente desnaturalizadas, en tampón de equilibrado (Tris 50mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%). En el segundo, se incubaron también 15 minutos en una solución de iodoacetamida (25mg/ml) en el mismo tampón. La iodoacetamida elimina el exceso de DTT evitando el veteado en los patrones electroforéticos. Tras el equilibrado se retiró la solución y se guardaron los geles a -80°C .

4.3.- Segunda dimensión: SDS-PAGE

En la segunda dimensión las proteínas se separan en base a su peso molecular mediante la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS). La carga intrínseca de las proteínas de la muestra no es un factor de separación debido a la presencia de SDS en la muestra y en el gel. Tanto para la segunda dimensión de los geles de la técnica clásica como para los de IPGs se utilizó un sistema de electroforesis

vertical, ya que éste permite correr varios geles de forma simultánea. Para la segunda dimensión de los geles de anfolitos, (técnica clásica) se empleó el sistema de geles discontinuos con SDS descrito por Laemli (1970). El gel de resolución, con unas dimensiones de 200 x 160 x 1,5mm se realizó al 15% de poliacrilamida según el siguiente protocolo:

Composición del gel de resolución para la segunda dimensión (2-DE clásica)

Solución A (Acilamida 30%, Bisacrilamida 0,15%)	50ml
SDS	1ml
Solución B (Tris-ClH 1,5 M pH 8,8)	25ml
Agua destilada	23,5ml
TEMED	20µl
APS 10%	0,5ml

Antes de añadir el TEMED y el APS se desgasificó la solución del gel y una vez mezclados todos los componentes la solución se vertió entre las dos placas verticales del molde del gel, dejando libres 2,5cm en la parte superior. La parte superior del gel se selló cuidadosamente con isobutanol saturado con agua para eliminar las burbujas que pudieran haberse formado al verter el gel en el molde y para evitar el contacto con el oxígeno del aire. Transcurridas unas dos horas el gel estaba perfectamente polimerizado y se eliminó por tanto la capa de isobutanol, se lavó cuidadosamente la superficie del gel con agua destilada y se secó con papel whatman. En los 2,5cm restantes del molde se añadió el gel de concentración, al 5% de poliacrilamida, que se preparó como se describe a continuación:

Composición del gel de concentración para la segunda dimensión (2-DE clásica)

Solución D (Acrilamida 10%, Bisacrilamida 0,5%)	10ml
SDS 10%	0,2ml
Solución C (Tris-Base 240 mM pH 6,8)	10ml
TEMED	8 μ l
APS 10%	0,16ml

Las soluciones A (del gel de resolución) y D (del gel de concentración), se prepararon siempre en la misma semana en que se iban a utilizar y antes de guardarlas a 4°C se pasaban por un filtro de 0.45 μ m. El gel de concentración también se recubrió con isobutanol saturado con agua y se dejó polimerizar durante una hora, tras lo cual se lavó y secó al igual que el gel de resolución.

La segunda dimensión correspondiente a los geles de IPGs, se realizó en geles al 12,5% de poliacrilamida (200 x 220 x 1,5mm) y su composición se describe en la siguiente tabla:

Composición del gel de segunda dimensión (2-DE IPGs)

Solución de Acrilamida/Bis 37,5:1	50ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	30ml
SDS 10%	1,2ml
Agua destilada	38,1ml
TEMED	40 μ l
APS 10%	0,6ml

Una vez mezclados los todos los componentes, la solución se vertió en el molde del gel y se recubrió con isobutanol saturado con agua hasta su completa polimerización (dos horas). Entonces se lavó la superficie del gel con agua destilada y se secó con papel whatman. En ambos casos (2-DE con anfolitos y 2-DE con IPGs), tras descongelar el gel de primera dimensión se situó éste pegado a la parte superior del gel de segunda dimensión, sellándose posteriormente con una solución de agarosa al 0,5% en tampón de electroforesis (Tris base 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%) y trazas de azul de bromofenol. Esta solución de sellado también nos permitió visualizar el frente de la electroforesis. El corrido electroforético se realizó a 25mA por gel durante 1,5 horas seguidos de 35mA por gel durante 5 horas en el caso de la segunda dimensión de los geles de anfolitos y a 25mA por gel durante 15 minutos y 60mA por gel durante 3,5 horas en el caso de la segunda dimensión de los geles de IPGs. Los tiempos indicados para las últimas fases del corrido electroforético en ambas técnicas son aproximados; se consideró finalizada la electroforesis cuando el frente de azul de bromofenol llegaba al final del gel. El tampón de electroforesis, de igual composición en ambas técnicas, es el mismo en los reservorios superior e inferior (Tris base 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%). La segunda dimensión se realizó a una temperatura constante de 15°C.

5.- FIJACIÓN Y TINCIÓN DE LOS GELES

Tanto en los geles realizados mediante la técnica clásica como en los de la técnica de IPGs, el método de detección empleado fue la tinción con plata. Aunque se emplearon dos protocolos ligeramente distintos, el fundamento del método de tinción es básicamente el mismo: unir iones de plata a las proteínas y reducir con formaldehído en medio básico los iones de plata para formar un precipitado marrón de plata metálica. Esta técnica se eligió debido a su gran sensibilidad, capaz de detectar 0,1ng de proteína. En la electroforesis clásica, las proteínas se visualizaron con el método de tinción de plata descrito por *Morrissey (1981)*, que emplea DTT previa impregnación con nitrato de plata, proceso que permite obtener patrones de tinción más reproducibles. Se prefijaron los geles en una solución al 50% de metanol y 10% de ácido acético durante 30 minutos, seguidos de otros 30 minutos en una solución al 5% de metanol y 7% de ácido acético. Posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 10% durante media hora, se lavaron y se dejaron sumergidos en agua milli-Q toda la noche. Al día siguiente se realizó un nuevo lavado de 30 minutos con agua milli-Q, seguido de un baño en DTT 5µg/ml de media hora. Seguidamente se trataron con una solución de nitrato de plata al 0,1% durante otros 30 minutos, al cabo de los cuales se lavaron los geles rápidamente con una pequeña cantidad de agua mili-Q y se procedió al revelado (3% carbonato sódico y formaldehído 0,018%). El revelado se paró con ácido cítrico 2,3M y agitación durante 10 minutos.

Los geles realizados mediante la técnica que emplea IPGs, se tiñeron mediante el método de tinción con plata descrito por *Heukeshoven*

y *Dernick (1985)* con ligeras variaciones. La fijación se realizó sumergiendo los geles durante 30 minutos en una solución al 40% de etanol y 10% de ácido acético. Se eliminó de esta fase la fijación con glutaraldehído debido a su incompatibilidad con un posible análisis posterior mediante espectrometría de masas. En la siguiente fase (sensibilización) se sumergieron los geles en una solución al 30% de etanol, 0,2% de tiosulfato sódico y 6,8% de acetato sódico durante media hora. A continuación se hicieron tres lavados de 5 minutos con agua milli-Q y se pusieron en contacto con una solución de nitrato de plata al 0,25% durante otra media hora. Transcurrido este tiempo se lavaron los geles con agua milli-Q y se hicieron varios pases con solución de revelado (2,5% carbonato sódico y 0,015% de formaldehído). Cuando los patrones proteicos estaban lo suficientemente teñidos, se paró el revelado con una solución de EDTA al 1,5%.

Puntualmente, se recurrió a la tinción con azul de Coomassie, manteniendo los geles durante 3 - 4 horas en agitación sumergidos en una solución de tinción (azul de Coomassie 0,2%, etanol 50%, acético 5%) para posteriormente desteñirlos en varios pases en una solución de etanol (20%) – acético (5%).

Finalizado el proceso de tinción, se lavaron los geles con agua milli-Q y se digitalizaron en un densitómetro GS-700 (Bio-Rad) a una resolución de $84,7 \times 84,7 \mu\text{m}$. Los geles originales se conservaron plastificados a 4°C.

6.- ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LOS PATRONES PROTEICOS BIDIMENSIONALES (ANÁLISIS CUANTITATIVO)

Una vez digitalizados los patrones bidimensionales se analizaron mediante el software Melanie 3 (Bio-Rad) evitando el uso de filtros que pudieran interferir en las comparaciones posteriores. Se eliminaron del análisis los “spots” solapantes, los que se encontraban situados en los márgenes del gel (donde hay una mayor inestabilidad de pH) y los que se encontraron sólo en un individuo. Los demás, se caracterizaron respecto a su masa molecular aparente, y punto isoeléctrico (*pI*). Se normalizó la intensidad de los “spots” de cada gel expresándola como la proporción de la intensidad proteica total detectada de ese gel (volumen relativo o % vol.) (Byrjalsen *et al.*, 1999; Tsuji *et al.*, 1999). Los datos de las intensidades proteicas normalizadas para todos los “spots” analizados se exportaron al programa de análisis estadístico SPSS donde se testó la existencia de diferencias significativas en la intensidad de cada “spot” entre mejillones del intermareal y mejillones de cultivo mediante el test U de Mann-Whitney.

7.- SELECCIÓN DE POLIPÉPTIDOS PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS (ANÁLISIS CUALITATIVO)

La selección de polipéptidos para el análisis de variabilidad genética y estructura poblacional se realizó sin tener conocimiento previo de la identidad de los “spots”, en base únicamente a su apariencia en el gel y fue llevada a cabo por dos investigadores que no habían realizado en

ellos ningún estudio de variabilidad. Los criterios empleados para esta selección fueron tres: reproducibilidad, intensidad y aislamiento relativo en el gel. Se desestimaron todos los “spots” no reproducibles. No se consideraron por tanto aquellos presentes en los márgenes del gel ya que en esta zona el pH es inestable y la reproducibilidad baja. Se seleccionaron “spots” con una intensidad suficiente como para que, en caso de aparecer dos variantes en lugar de una (heterocigoto, situación en la que, según el criterio de dosis génica, cada variante aparecería con la mitad de intensidad que en el homocigoto, en cuyo caso solo se observa una) éstas puedan distinguirse de forma inequívoca sobre el fondo del gel. Se requiere además un mínimo de margen libre alrededor del “spot”, suficiente como para permitir la detección de posibles variantes alélicas. Se excluyeron por tanto los “spots” asociados a estrías y aquellos presentes en zonas sobrecargadas del gel.

8.- TERMINOLOGÍA DE LOS POLIPÉPTIDOS

Se empleó un sistema de nomenclatura numérico basado en la posición de los “spots” en el gel. La numeración se realizó de izquierda a derecha y de arriba abajo. Dos investigadores compararon visualmente los patrones proteicos de los diferentes individuos. Muchos polipéptidos aparecen en los geles bidimensionales formando parte de “constelaciones de spots”, fácilmente identificables y muy útiles para la localización de “spots” concretos, así como la forma y el color característico de éstos. Para facilitar el análisis se consideró conveniente dividir el gel en varias zonas

cuyos límites fueron determinados de forma arbitraria, en consonancia generalmente con las citadas “constelaciones”.

9.- CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Entre todos los “spots” analizados, se identificaron varios polimorfismos genéticos, teniendo en cuenta los siguientes criterios (*Goldman y Merrill, 1983; Rosenblum et al., 1984*):

- Sus variantes presentan alteraciones en carga. En el isoelectroenfoque, un cambio de carga produce un cambio significativo en la posición del “spot”. El grado en el que un simple cambio de carga influye en el punto isoeléctrico de una proteína (es decir, la distancia entre el “spot” original y el “spot” producido por la proteína modificada) depende del punto isoeléctrico de la proteína así como de su peso molecular y su composición aminoacídica. Si una proteína posee un grupo dissociable con un pK_a (constante de disociación) próximo al punto isoeléctrico de la misma, un simple cambio en carga podría situar dicho punto isoeléctrico en un valor igual al pK_a de ese grupo, provocando su disociación y un cambio de carga todavía mayor. El efecto producido por un cambio de carga disminuye a medida que aumenta el peso molecular. Las proteínas con un peso molecular menor tienen normalmente cambios en su punto isoeléctrico más acusados que las proteínas de elevado peso molecular. Algunas variantes también muestran pequeñas diferencias en masa molecular. La electroforesis bidimensional permite detectar cambios de

0,02 unidades de pH en la primera dimensión de de 1kDa en la segunda dimensión.

- Dosis génica. Cuando están presentes las dos variantes en carga (heterocigoto), la densidad con la que cada una de ellas aparece en el gel es el 50% de la existente cuando sólo está presente una (homocigoto).

- Diferentes geles en los que se han corrido muestras de un mismo individuo deben presentar el mismo fenotipo para todos los polimorfismos.

Los polimorfismos proteicos así identificados se analizaron en todas las poblaciones muestreadas, calculándose las frecuencias genotípicas correspondientes y a partir de ellas, las frecuencias génicas.

10.-VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

Se calculó la heterocigosis esperada por *locus* mediante la estimación insesgada de la heterocigosis propuesta por Nei (1978):

$$h_e = 2N \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) / (2N - 1)$$

siendo p_i la frecuencia estimada del alelo i en la muestra, calculada a partir de las frecuencias genotípicas observadas, k el número de alelos presentes en el *locus* y N el número de individuos analizados. Dichas estimaciones se realizaron con la ayuda del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995).

Para obtener una estimación de la variabilidad genética poblacional, también se calculó el número medio de alelos por *locus* (N_a):

$$N_a = \sum_{i=1}^r n_a / r$$

siendo n_a el número de alelos por *locus* y r el número de *loci* analizados. Con el mismo fin, se calculó la heterozigosis media por *locus*:

$$H = \sum_{i=1}^r h_e / r$$

Esta última es una medida de variabilidad genética mucho más precisa que la anterior, ya que tiene en cuenta la frecuencia a la que aparece cada alelo.

11.- AJUSTE A LAS PROPORCIONES ESPERADAS EN EL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Se testó la hipótesis de conformidad de las distribuciones genotípicas observadas con las esperadas en el equilibrio Hardy-Weinberg mediante el test χ^2 y el test de probabilidad exacta (*Louis y Dempster, 1987; Hernández y Weir, 1989; Guo y Thompson, 1992*). El test χ^2 de bondad de ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg, puede dar lugar a resultados espúreos cuando el tamaño de muestra no es elevado o hay frecuencias genotípicas con valores muy bajos. Es precisamente en esos casos cuando el test de probabilidad exacta es muy útil.

Con el fin de conocer la magnitud de las desviaciones entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas en equilibrio Hardy - Weinberg, se calculó el valor del estadístico F_{IS} mediante el estimador insesgado para $F_{IS} = 0$ desarrollado por Robertson y Hill (*1984*), basado en

la proporción de alelos en homocigosis. Para cada uno de los homocigotos que segregan en un *locus* multialélico, estos autores señalan que la estimación de F_{IS} viene determinada por la expresión:

$$\hat{f}_{ii} = \frac{4NT_{ii}}{N_i(2N - N_i)}$$

con varianza

$$\text{var}(\hat{f}_{ii}) = \frac{1}{N}$$

donde N_i es el número de alelos i presentes en la muestra, N el número de individuos analizados y T_{ii} la estimación insesgada del exceso de homocigotos para el genotipo ii , la cual responde a la fórmula:

$$T_{ii} = \frac{2(2N - 1)N_{ii} - N_i(N_i - 1)}{4(N - 1)}$$

siendo N_{ii} el número de individuos ii . La estimación global de F_{IS} para el *locus* es

$$\hat{f}_T = \frac{2\sum_i (T_{ii}/N_i)}{k - 1}$$

donde k es el número de alelos. Su varianza para grandes muestras viene dada por

$$\text{var}(\hat{f}_T) = \frac{1}{N(k - 1)}$$

Aunque se han propuesto varios estimadores F_{IS} , éste propuesto por Robertson y Hill, es el que presenta menor varianza cuando su valor es cero, por tanto es apropiado para poblaciones en las que existen pequeñas desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg.

Robertson y Hill (1984) propusieron un test de significación para la hipótesis nula de $F_{IS} = 0$. Su fundamento se basa en la propiedad de que el cuadrado de una variante normal estandarizada (z^2) sigue una distribución χ^2 con 1 grado de libertad (Weir, 1996):

$$z^2 = \frac{(\hat{f}_T - f_0)^2}{\text{var}(\hat{f})}$$

bajo la hipótesis nula, es decir, cuando $f_T = f_0 = 0$.

Con el mismo fin (medir la magnitud de las desviaciones de las proporciones esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg) se calculó el valor del estadístico \hat{f}_c (Weir y Cockerham, 1984) que está relacionado con el número de heterocigotos presentes en la muestra (Rousset y Raymond, 1995):

$$\hat{f}_c = \frac{4N^2 - \sum_i n_i^2 - 2(2N - 1)N_{het}}{4N^2 - \sum_i n_i - 2N_{het}}$$

donde n_i es el número de alelos, N el número de individuos y N_{het} el número de heterocigotos. Todos estos análisis se realizaron con el programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

12.- ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

12.1.- Medida de la diferenciación genética entre poblaciones

Para una población que se encuentra dividida en varias subpoblaciones, Wright (1951, 1965) desarrolló tres estadísticos F (F_{IT} , F_{IS} y F_{ST}) que definió como correlaciones entre gametos que se unen al azar para formar cigotos y que se encuentran relacionados mediante la siguiente fórmula: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$. F_{IS} constituye una medida promedio de las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg presentes en las subpoblaciones mientras que F_{IT} mide éstas en el total. F_{ST} el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones y se define como

$$F_{ST} = \frac{\sigma_{\bar{x}}^2}{\bar{x}(1 - \bar{x})}$$

donde \bar{x} y $\sigma_{\bar{x}}^2$ son la media y la varianza de la frecuencia génica entre poblaciones. Este modelo asume una serie de premisas que difícilmente se cumplen en las poblaciones naturales, razón por la cual su uso en las poblaciones reales es controvertido (Nei, 1986).

Weir y Cockerham (1984) redefinieron los índices de Wright en términos de correlación intraclase derivada de un análisis de varianza de las frecuencias alélicas. Si hay estructuración poblacional, los alelos presentes dentro de una subpoblación deben estar correlacionados (encontrarse juntos en una proporción superior a la esperada) con respecto a todos los alelos de la población. El estimador θ de Weir y Cockerham (1984) correspondiente al estadístico F_{ST} de Wright, estima la

correlación de pares de alelos entre individuos dentro de una subpoblación mediante un análisis de la varianza de las frecuencias alélicas:

$$\hat{\theta} = \frac{a}{a + b + c}$$

donde a, b y c con los componentes de varianza entre poblaciones, entre individuos dentro de poblaciones y entre gametos dentro de individuos, respectivamente.

Se calculó el valor de este estimador para cada *locus*, así como el correspondiente al global de las poblaciones analizadas, a las poblaciones de la región atlántica y a las de la región mediterránea mediante el programa de ordenador GENEPOP (*Raymond y Rousset, 1995*).

La formulación de Weir y Cockerham (1984) asume básicamente las mismas premisas que Wright:

- Hay un número infinito de poblaciones que derivaron de una única población ancestral al mismo tiempo y de la cual se muestrean s poblaciones. Los índices de fijación se definen en función de la población ancestral y se estiman a partir de los datos de frecuencias genotípicas de las s poblaciones muestreadas.
- Todas las poblaciones son estadísticamente independientes y no se asume que exista mutación, migración ni selección
- El tamaño de población se mantiene igual para todas las poblaciones y en todas las generaciones.

Nei, reformuló el índice de fijación F_{ST} en base a las heterozigosis observadas y esperadas en la población y lo denominó coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}). Su método presenta la gran ventaja de ser aplicable a cualquier situación, independientemente de los agentes

evolutivos que estén actuando sobre las poblaciones de estudio. En una población subdividida en s subpoblaciones, Nei (1977) define el índice de diferenciación genética entre las subpoblaciones (G_{ST}) para cada *locus* como

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

siendo $H_S = 1 - \sum_i \sum_k p_{ik}^2 / s$ el promedio de las heterozigosis esperadas y $H_T = 1 - \sum_k \bar{p}_k^2$ la heterozigosis esperada en la población total (\bar{p}_k frecuencia media del alelo k en el total de las subpoblaciones, p_{ik} frecuencia del alelo k en la subpoblación i). Para r *loci*, el valor de G_{ST} se calcula a partir de los H_T y H_S medios.

Se estimó la diversidad genética total (H_T), la diversidad genética dentro de poblaciones (H_S) y el coeficiente de diferenciación genética G_{ST} para cada *locus* así como para el global de las poblaciones analizadas, para las poblaciones de la región atlántica y para las de la región mediterránea. También se calculó el valor de G_{ST} entre y dentro de ambas regiones, todo ello con la ayuda del programa DISPAN (Ota, 1993).

A pesar de sus diferentes filosofías, las propiedades de los estimadores descritos por Nei (1977) y Weir y Cockerham (1984) son muy similares (Chakraborty y Danker-Hopfe, 1991).

12.2.- Estimación del flujo génico

El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una

especie es una unidad evolutiva independiente. El método indirecto más comúnmente utilizado para estimar los niveles de flujo génico se basa en el estadístico F_{ST} . Wright (1951) mostró que en un modelo de isla en equilibrio

$$F_{ST} \approx \frac{1}{1 + 4Nm}$$

donde N es el tamaño efectivo poblacional y m la tasa de migración. De este resultado puede obtenerse una estimación indirecta de Nm , ya que

$$Nm \approx \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right) \text{ (Slatkin, 1985).}$$

Mediante esta fórmula se calcularon los niveles de flujo génico en el área total, en la región mediterránea, en la región atlántica, entre y dentro de dichas regiones a partir de los valores de θ (Weir y Cockerham, 1984) y a partir de los valores de G_{ST} (Nei, 1977).

Para evidenciar si existe un patrón de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993) se calculó el valor de G_{ST} para cada par de poblaciones muestreadas mediante el programa DISPAN (Ota, 1993) y el valor resultante se utilizó para obtener una estimación de Nm mediante la fórmula anteriormente descrita. A estas estimas de flujo génico entre poblaciones se las denota por M . Se construyó así una recta de regresión con los valores de flujo génico (M) entre pares de poblaciones en función de la distancia geográfica que las separa (ambas variables en escala logarítmica).

12.3.- Medidas de distancia genética y construcción de árboles filogenéticos

Los datos de frecuencias alélicas permiten estudiar las relaciones evolutivas entre poblaciones íntimamente relacionadas (*Takezaki y Nei, 1996*) mediante el cálculo de distancias genéticas. Las medidas de distancia genética permiten cuantificar el grado de divergencia genética existente entre poblaciones. La medida de distancia genética más ampliamente utilizada fue propuesta por Nei (*1972, 1978*). Su estima insesgada entre dos poblaciones viene dada por la expresión

$$D = -\ln I$$

donde I es la identidad genética normalizada $I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$

siendo $J_x = \sum_j^r \sum_i^{m_j} x_{ij}^2 / r$ y $J_y = \sum_j^r \sum_i^{m_j} y_{ij}^2 / r$ las homocigosis medias de los *loci* analizados en las poblaciones X e Y, respectivamente y $J_{xy} = \sum_j^r \sum_i^{m_j} x_{ij} y_{ij} / r$. x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del alelo i del *locus* j en las poblaciones X e Y, m_j es el número de alelos en el *locus* j y r el número de *loci* analizados. Bajo el modelo de infinitos alelos, se espera que D aumente linealmente con el tiempo si el balance mutación-deriva se mantiene durante el proceso evolutivo (*Takehazi y Nei, 1996*). Esta medida de distancia se estimó para cada par de poblaciones mediante el programa DISPAN (*Ota, 1993*).

En 1983 Nei et al. proponen una nueva medida de distancia genética a la que designan como D_A y cuya expresión es

$$D_A = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r \left(1 - \sum_{i=1}^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}} \right)$$

y que bajo el modelo de infinitos alelos ha demostrado ser más eficiente que D a la hora de obtener árboles filogenéticos con una topología correcta cuando el período evolutivo que se estudia es corto. Esto es debido a que D tiene un elevado error de muestreo. No obstante D proporciona estimas de la longitud de las ramas del árbol más fiables (Takehazi y Nei, 1996). Las estimas de D_A para cada par de poblaciones se obtuvieron mediante el programa de ordenador DISPAN (Ota, 1993).

Reynolds et al., 1983 describen para poblaciones que divergen únicamente debido a la deriva una medida de distancia genética para períodos evolutivos cortos basada en el coeficiente de coascendencia θ :

$$D = -\ln(1 - \theta)$$

El coeficiente de coascendencia fué calculado para cada par de poblaciones con la ayuda del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995) mediante el análisis de varianza descrito por Cockerham, 1973 y Weir y Cockerham, 1984.

Las matrices de distancia genética obtenidas mediante las estimas D , D_A y D_θ se emplearon para la construcción mediante el programa MEGA2 (Kumar et al., 2001) de dendrogramas según el método UPGMA (unweighted pair group-method with arithmetic mean, Sneath y Sokal, 1973) y NJ (neighbor joining, Saitou y Nei 1987). Este último, no asume una tasa constante de cambios evolutivos. Para estimar la fiabilidad de los diferentes nodos en los árboles filogenéticos construidos se aplicó un test bootstrap (Efron, 1982; Felsenstein, 1985) mediante el programa de ordenador DISPAN (Ota, 1993).

13.- DESEQUILIBRIO GAMÉTICO

Se testó la asociación entre genotipos para cada par de *loci* en cada población mediante el test de probabilidad exacta de Fisher. Con el fin de determinar qué pares de *loci* mostraban en el global de las poblaciones una asociación genotípica significativa, se aplicó el test de combinación de probabilidades de Fisher (Fisher, 1950). Todo ello se realizó con la ayuda del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995).

Uno de los métodos más empleados para la reconstrucción de haplotipos a partir de datos de frecuencias genotípicas es el método de máxima verosimilitud, que emplea el algoritmo EM (expectation-maximization, Dempster et al., 1977; Excoffier y Slatkin, 1995). Mediante este algoritmo se calcularon las frecuencias haplotípicas para cada par de *loci* a partir de los datos de frecuencias genotípicas con el programa de ordenador ARLEQUIN (Schneider et al., 2000). Xu et al. (2002) han demostrado la efectividad del algoritmo EM en la predicción de frecuencias haplotípicas utilizando frecuencias genotípicas de individuos no relacionados. El cálculo del desequilibrio de ligamiento a partir de los datos de frecuencias haplotípicas fué realizado teniendo en cuenta que muchos de los *loci* proteicos analizados son multialélicos (Weir y Cockerham, 1978; Weir, 1996). Por tanto, para cada par de alelos A_i y B_j de los *loci* A y B, respectivamente, se calculó el coeficiente de desequilibrio

$$D_{ij} = X_{ij} - p_i q_j$$

siendo X_{ij} la frecuencia del gameto $A_i B_j$ y p_i y q_j las frecuencias alélicas correspondientes. Para cada par de alelos se calculó también la medida

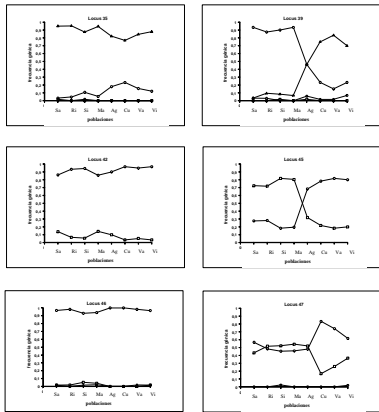
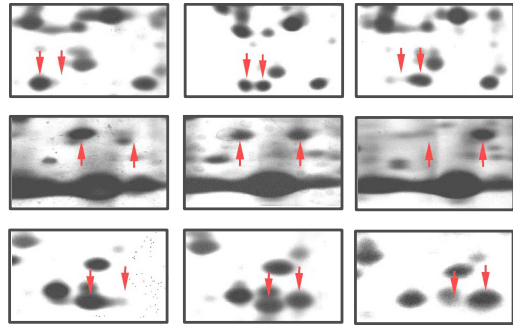
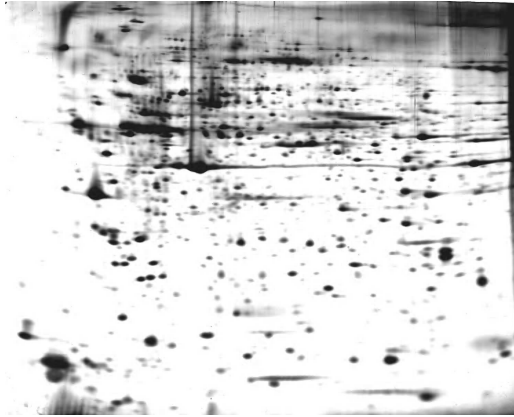
normalizada del grado de desequilibrio gamético descrita por Lewontin (1964)

$$D'_{ij} = D_{ij} / D_{\max}$$

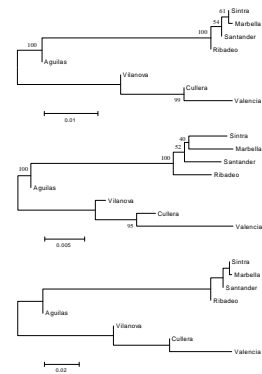
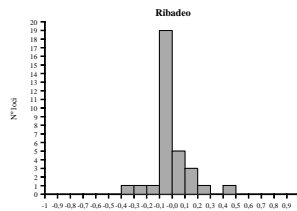
donde $D_{\max} = \min[p_i q_j, (1 - p_i)(1 - q_j)]$ cuando $D_{ij} < 0$ o $D_{\max} = \min[p_i(1 - q_j), (1 - p_i)q_j]$ cuando $D_{ij} > 0$. Se calcularon los valores medios de D'_{ij} para cada combinación alélica en el global de las poblaciones, en las poblaciones de la región atlántica y en las poblaciones de la región mediterránea. Asimismo, se testó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los D'_{ij} de cada par alélico en las poblaciones del Atlántico y en las del Mediterráneo mediante el test U de Mann-Whitney. El grado de desequilibrio entre todos los alelos de dos loci se calculó mediante $D' = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^l p_i q_j |D'_{ij}|$ donde k y l son el número de alelos en los loci A y B respectivamente (Hedrick, 1987; Zapata et al., 2001). La significación estadística del desequilibrio gamético para cada par alélico se calculó mediante el test $\chi^2_{ij} = 2ND_{ij}^2 / p_i(1 - p_i)q_j(1 - q_j)$ con un grado de libertad, donde N es el número de individuos muestreados (Weir y Cockerham, 1978; Weir, 1996). La hipótesis general de que ninguno de los D_{ij} es diferente de cero se testó mediante test χ^2 para cada par de alelos (χ^2_{ij}) con corrección de Bonferroni para múltiples test (Zapata et al., 2001) y con un test de razón de verosimilitudes (Slatkin y Excoffier, 1995).

14.- OTROS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el transcurso del presente trabajo se han incluido algunos análisis adicionales, correspondientes en general con métodos convencionales que pueden encontrarse detallados en manuales de estadística (*Gibbons, 1992; Peña, 2001; Siegel, 1988; Sokal y Rohlf, 1995*). Aquellos que presentan alguna particularidad especial se explican en la parte del texto en la que se utilizan.



	Santander	Ribadeo	Sitra	Marbella	Agullas	Cullera	Valencia	Vilanova
Santander	0.0000	0.0118	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Ribadeo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Sitra	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Marbella	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Agullas	0.0141	0.0118	0.0148	0.0190	0.0299	0.0238	0.0231	0.0252
Cullera	0.0408	0.0390	0.0419	0.0469	0.0581	0.0505	0.0622	0.0713
Valencia	0.0772	0.0766	0.0796	0.0875	0.1731	0.1682	0.1976	0.0370
Vilanova	0.0412	0.0402	0.0462	0.0527	0.0000	0.0000	0.0000	0.0033
	0.0333	0.0341	0.0365	0.0413	0.0135	0.0117	0.0156	0.0000
	0.1347	0.1289	0.1504	0.1628	0.0186	0.0057	0.0300	0.0000



1.- DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA ENTRE
MEJILLONES DE CULTIVO Y MEJILLONES DEL INTERMAREAL

La figura 1 muestra un mapa representativo del patrón proteico obtenido al cargar en los geles bidimensionales 50 μ g de muestra de pie de *Mytilus galloprovincialis*. Mediante el programa de análisis de geles bidimensionales Melanie 3 se detectaron un promedio de 750 "spots" por gel.

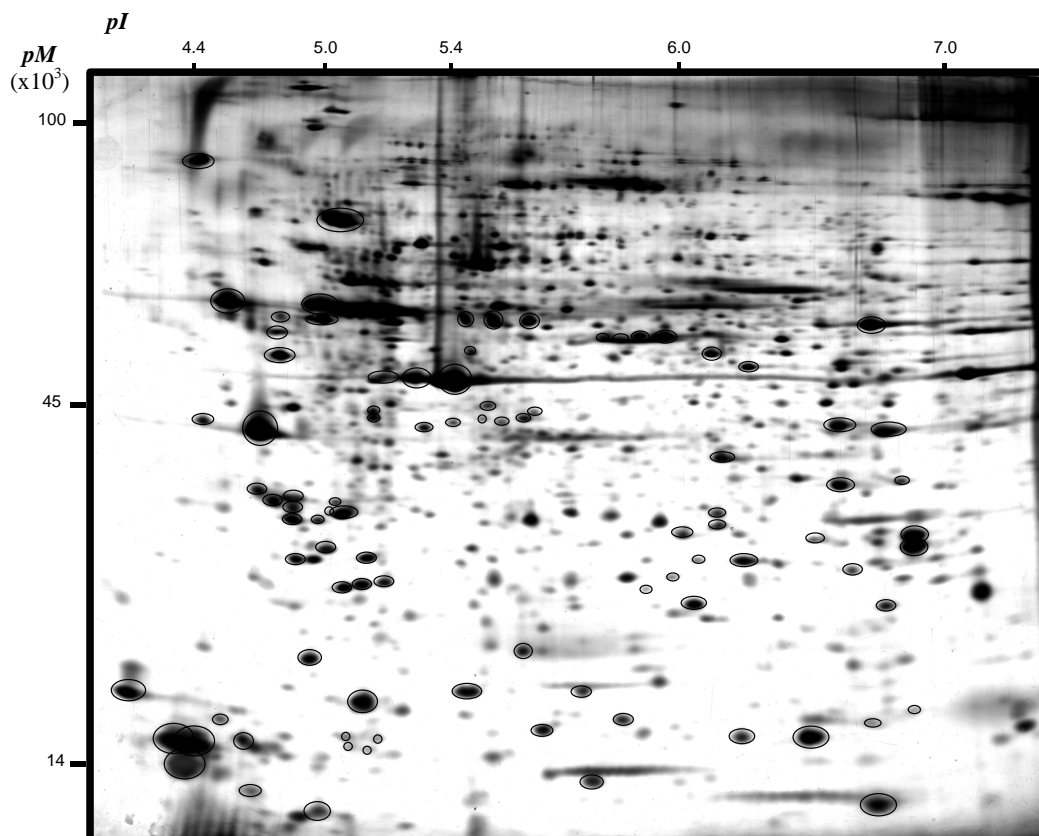


Figura 1.- Mapa representativo del patrón proteico obtenido mediante electroforesis bidimensional (técnica clásica) a partir de una muestra de pie de *Mytilus galloprovincialis*. Se señalan con círculos las 92 proteínas seleccionadas para el análisis cuantitativo. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (*pI*) se indican en los ejes vertical y horizontal, respectivamente.

Con el fin de comprobar la reproducibilidad cuantitativa de los “spots” proteicos se realizaron 3 repeticiones de dos series de separaciones electroforéticas: en una de las series se separó la misma muestra en dos geles distintos de forma paralela y en idénticas condiciones dentro de un único proceso electroforético; en la otra se separó la misma muestra en dos procesos electroforéticos ocurridos en días diferentes. Con la ayuda del programa Melanie 3, se cuantificaron las intensidades de los diferentes “spots” presentes en los geles de cada serie. El coeficiente de correlación de las intensidades de los “spots” entre los pares de geles fue de $0,988 \pm 0,011$ en la primera serie y de $0,981 \pm 0,013$ en la segunda, mostrando claramente una elevada reproducibilidad. En la figura 2 se representan los resultados de estas dos series de ensayos mediante sendas gráficas en las cuales se muestran las intensidades (% volumen) de cada uno de los “spots” presentes en los dos geles de una misma serie enfrentadas, es decir, una en el eje x y otra en el eje y. Como se puede observar, los valores obtenidos se ajustan bastante bien a una recta $y = x$. Para evitar posibles artefactos producto de la tinción con nitrato de plata, se repitió el mismo proceso empleando tinción con azul de Coomassie, obteniéndose resultados similares. Debido a este elevado grado de reproducibilidad, aunque se realizaron varias réplicas de cada muestra, solo se empleó un gel por individuo en el análisis informático.

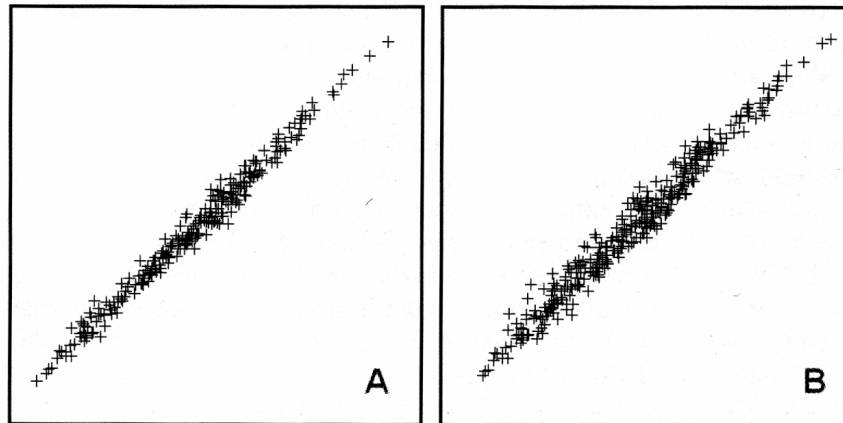


Figura 2.- Análisis de reproducibilidad de la intensidad proteica. Se representan enfrentadas (eje x vs. eje y) las intensidades (porcentaje de volumen respecto al total) de cada “spot” presente en (A) dos geles en los que se ha separado la misma muestra simultáneamente y bajo las mismas condiciones (B) dos geles en los que se ha separado la misma muestra bajo las mismas condiciones pero en días diferentes.

Para comparar los niveles endógenos o niveles de expresión proteica de mejillones del intermareal con los de mejillones de cultivo, se seleccionaron 92 “spots” que se podían identificar sin ambigüedad en todos los geles (figuras 1 y 3). Se descartaron los “spots” solapados, aquellos presentes en los márgenes del gel, donde el pH es más inestable y los que presentaban intensidades muy elevadas o bien muy bajas. Tampoco se tuvieron en cuenta los cambios cualitativos, es decir, aquellos “spots” que aparecían solo en un individuo ya que podrían ser debidos a la presencia de variantes polimórficas. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad proteica (% volumen) entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal (4 individuos de cultivo vs. 4 individuos del intermareal) en 45 de los 92 “spots” analizados (48,9%)

mediante el test no paramétrico U de Mann – Whithney ($p < 0,05$). De esos 45, 31 presentaban una mayor expresión en mejillones de cultivo (representados mediante círculos negros en la figura 3) y 14 se expresaban en mayor medida en los mejillones del intermareal (representados mediante círculos blancos).

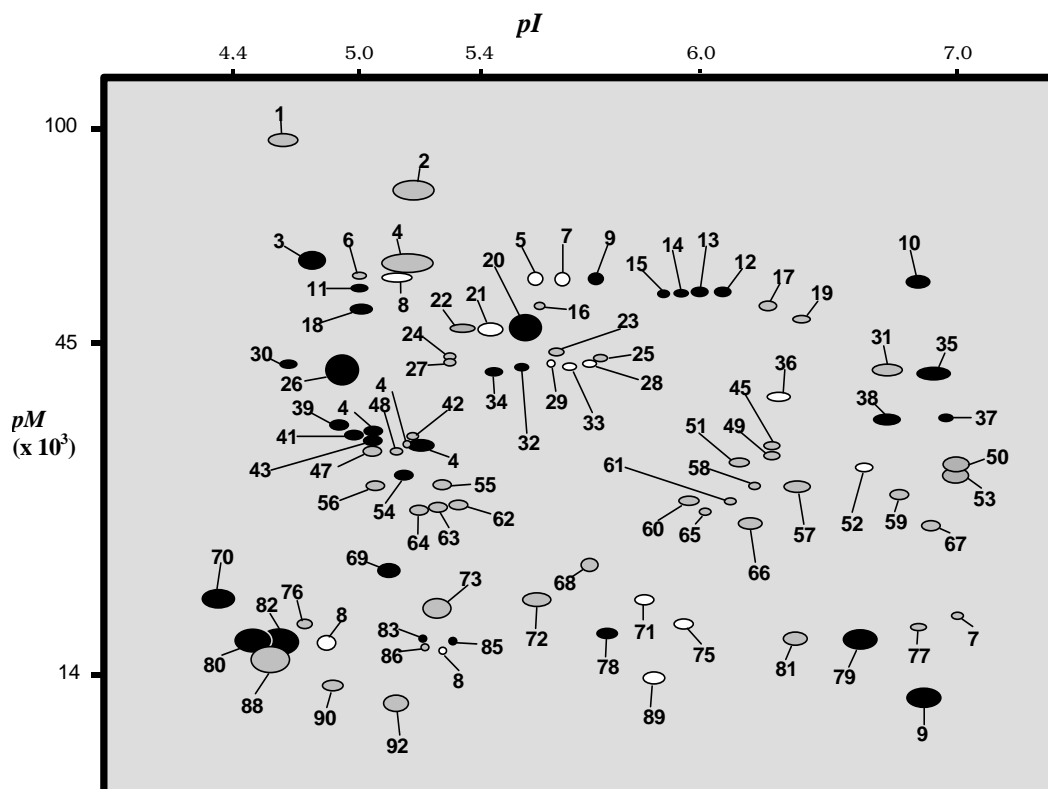


Figura 3.- Representación esquemática de las 92 proteínas seleccionadas para el análisis cuantitativo. Los círculos negros indican aquellas proteínas que presentan una mayor expresión en mejillones de cultivo y los blancos las que se expresan en mayor cantidad en mejillones del intermareal. Se representan con círculos grises aquellas proteínas que no presentaron diferencias detectables en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal

En los 47 (51,1%) “spots” restantes (círculos grises), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos. En la figura 4 se indica la intensidad media de los 6 “spots” que mostraron las variaciones más grandes entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal (“spots” 8, 20, 32, 41, 75 y 80). Estas proteínas se analizaron mediante espectrometría de masas (López *et al.*, 2001), identificándose los “spots” 8, 20 y 80 como Hsp70 (heat-shock protein 70), cadena ligera de la miosina y actina, respectivamente. Debido a que esta especie no se encuentra representada en las bases de datos, la identificación de las proteínas es compleja y se realiza por homología con proteínas de otras especies presentes en las bases de datos. Por esta razón, los “spots” 32, 41 y 75 no se pudieron identificar.

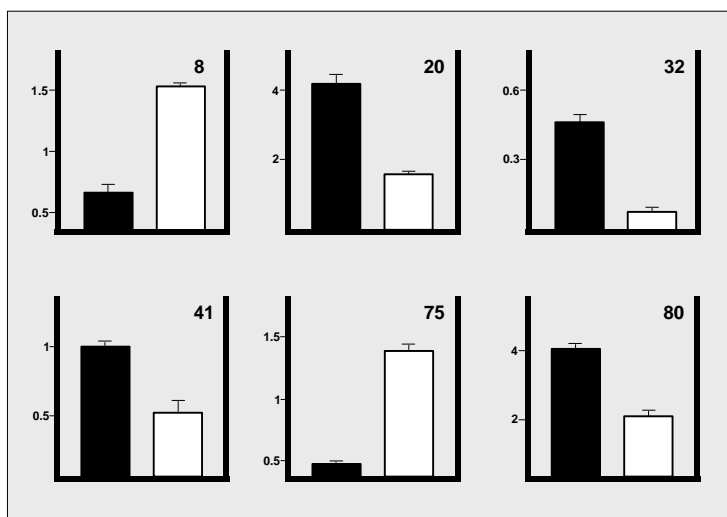


Figura 4.- Representación de las diferencias en la abundancia relativa de 6 proteínas en mejillones de cultivo y mejillones del intermareal. Se han seleccionado aquellas proteínas (8, 20, 32, 41, 75, 80) donde se detectaron las variaciones más acusadas.

2.- VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL DETECTADA
MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

2.1.- SELECCIÓN DE POLIPÉPTIDOS PARA EL ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.

Para el análisis de variabilidad genética intrapoblacional, se analizó mediante electroforesis bidimensional de alta resolución (técnica clásica) una muestra de 30 individuos de la población de Ribadeo recogida en Junio de 1999 y otra de 8 individuos de la población de Vilagarcía recogida en Noviembre de 1997 (figura 5).

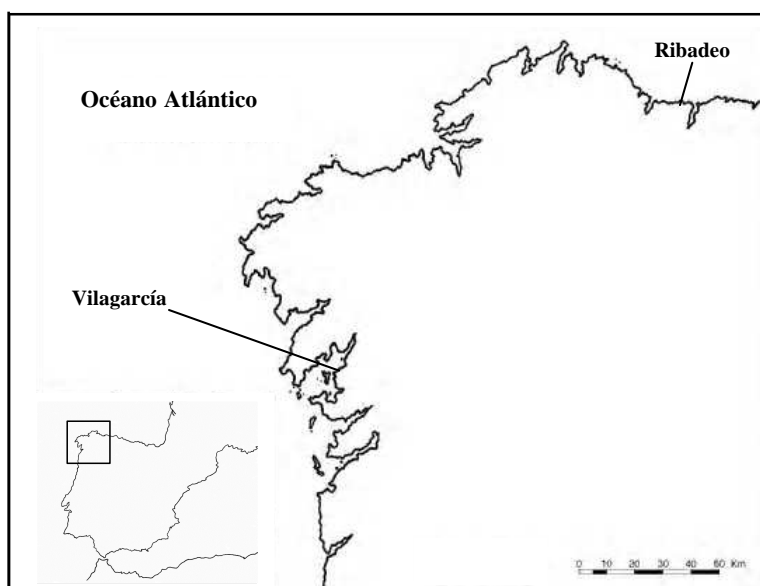


Figura 5.- Localidades muestreadas en la costa noroeste de la Península Ibérica para el análisis de la variabilidad genética de poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* mediante electroforesis bidimensional.

RESULTADOS

Por cada individuo muestreado, se realizaron al menos 2 separaciones electroforéticas a diferentes concentraciones proteicas (8,50 y 4,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En la figura 6 se muestra un mapa representativo del patrón proteico obtenido al separar 255 μg de muestra de pie de *Mytilus galloprovincialis* mediante 2-DE (técnica clásica).

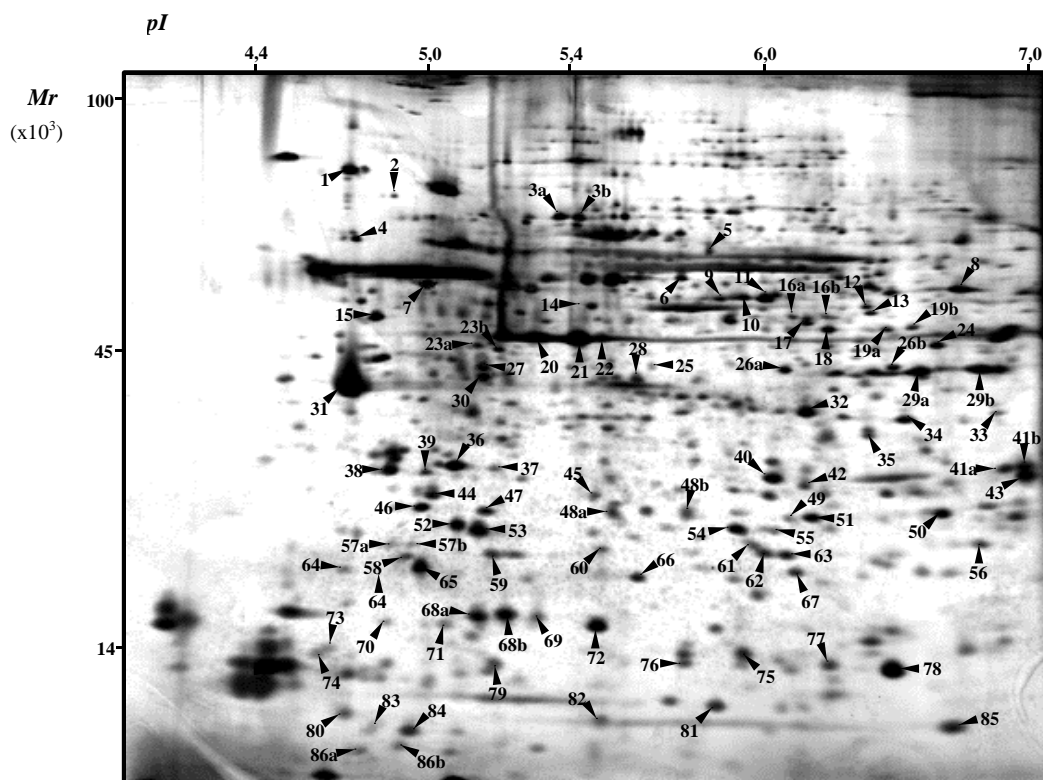


Figura 6.- Patrón proteico obtenido a partir de una muestra de pie de *Mytilus galloprovincialis* mediante electroforesis bidimensional (técnica clásica). Se indican con números los 86 polipéptidos seleccionados para el análisis de variabilidad genética y con letras (a: ácido; b: básico) variantes polimórficas presentes en alguno de ellos. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal, respectivamente.

Los rangos de pH (4,5 – 7,5) y de peso molecular (*PM* 10 – 100 kDa) analizados permiten visualizar mediante tinción con nitrato de plata aproximadamente 1.200 “spots” en cada gel. La reproducibilidad cualitativa de éstos se comprobó en un estudio anterior (Mosquera, 2000). En base a los criterios descritos con anterioridad en material y métodos se seleccionaron 86 “spots”, que se indican con flechas junto a la numeración correspondiente a cada uno (figura 6). Entre ellos, algunos se identificaron como polimorfismos genéticos en base a los criterios descritos en material y métodos.

En la figura 7 se muestran 3 ejemplos de polimorfismos genéticos (*loci* 46, 14 y 53, cuyas posiciones en el gel bidimensional pueden observarse en la figura 6) identificados en los geles bidimensionales.

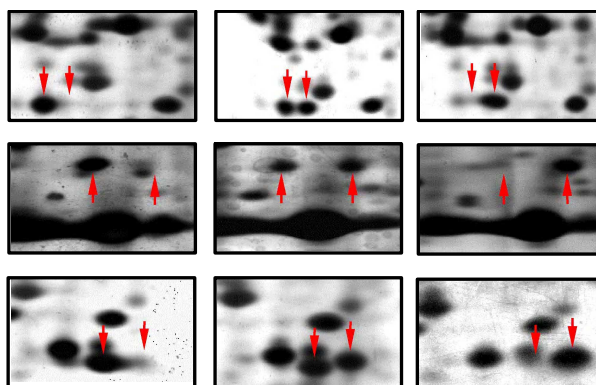


Figura 7.- Ejemplos de 3 polimorfismos genéticos detectados mediante electroforesis bidimensional (técnica clásica). De arriba abajo: *loci* 46, 14 y 53. Para cada *locus* se muestran los genotipos posibles con dos alelos; de izquierda a derecha: homocigoto ácido, heterocigoto y homocigoto básico. Las flechas indican la posición de las variantes presentes y ausentes.

Se muestran todos los genotipos posibles con dos alelos: los heterocigotos en la columna central, pudiéndose observar en ellos el efecto de dosis génica al comparar su intensidad con la de los homocigotos, los homocigotos ácidos en la columna de la izquierda y los homocigotos básicos en la columna derecha. La sección de gel que se incluye en cada caso permite identificar una serie de “spots” de referencia que sirven para, atendiendo a sus posiciones relativas, identificar la variante alélica presente en cada caso.

De los 86 “spots” analizados en ambas poblaciones, se detectaron 26 polimórficos en la población de Vilagarcía y 32 en la población de Ribadeo. En la figura 8 se muestra un esquema con los 86 “spots” analizados donde se distinguen los que no mostraron variabilidad (monomórficos) representados con círculos blancos y aquellos en los que se identificaron 2 o más variantes polimórficas, que se presentan como círculos negros o grises unidos con líneas. Los círculos negros indican la variante alélica más frecuente y los grises las demás. La denominación de las variantes alélicas se realizó mediante numeración de las mismas desde la parte más básica a la parte más ácida del gel.

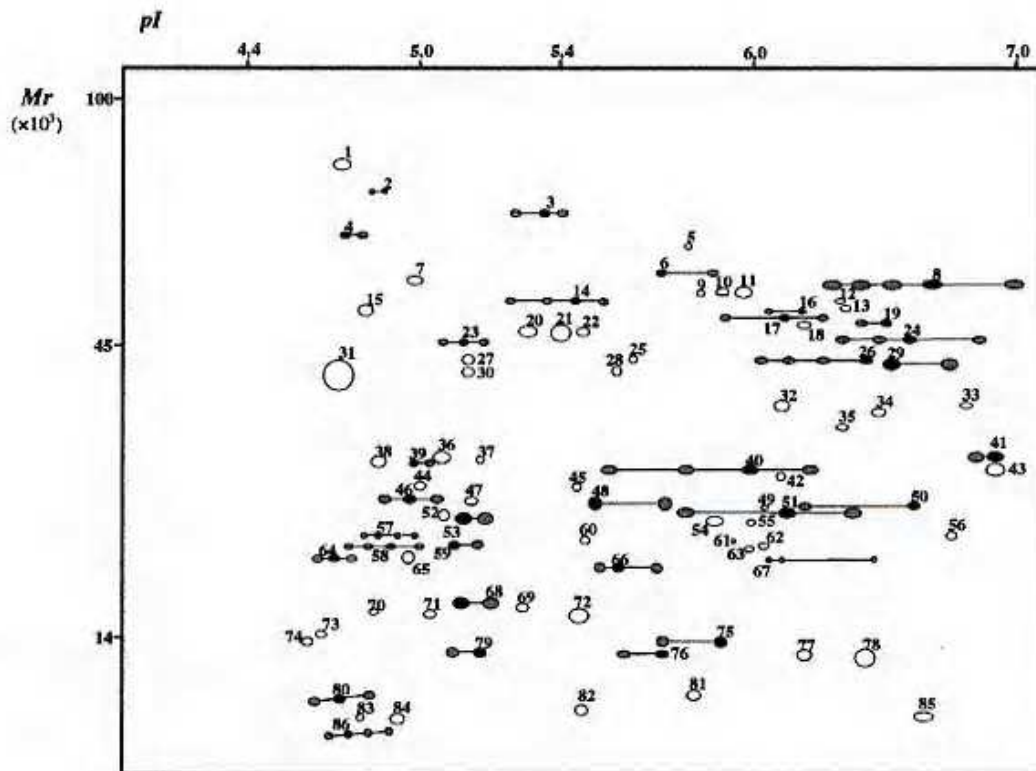


Figura 8.- Representación esquemática de los 86 polipéptidos analizados mediante electroforesis bidimensional (técnica clásica). Las variantes polimórficas se muestran unidas por una línea resaltándose en negro la correspondiente al alelo más frecuente y en gris las demás. Las proteínas monomórficas se muestran en blanco.

2.2.- AJUSTE A LAS PROPORCIONES HARDY-WEINBERG

En las tablas 1 y 2 se muestran las frecuencias genotípicas observadas para los *loci* polimórficos detectados en las poblaciones de Ribadeo y Vilagarcía. Solamente 3 de los 32 polimorfismos identificados en la población de Ribadeo (*locus* 2, 48 y 46) mostraron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg estadísticamente significativas. En el *locus* 2 se

detectó una deficiencia de heterocigotos significativa ($f_T = +0,490$, $P < 0,01$; $\chi^2 = 6,47$, $P < 0,01$; test exacto, $P = 0,10$), y en el *locus* 48 un exceso de heterocigotos significativo ($f_T = -0,430$, $P < 0,05$; $\chi^2 = 5,81$, $P < 0,05$; test exacto, $P = 0,03$). Los test χ^2 y f_T no detectaron desviaciones significativas en el *locus* 46 ($f_T = +0,171$, $P > 0,05$; $\chi^2 = 5,74$, $P > 0,05$) pero sí lo hizo el test de probabilidad exacta ($P = 0,0497$). También se detectó en este *locus*, una deficiencia de heterocigotos estadísticamente significativa para el alelo 20 ($f_{ii} = +0,424$, $P < 0,05$). En la población de Vilagarcía sólo 2 *loci* (6 y 76) presentaron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg estadísticamente significativas ($f_T = +0,703$, $P < 0,05$ para ambos *loci*). Todas estas desviaciones pierden su significación estadística al aplicar a los test la corrección de Bonferroni para controlar los posibles errores de tipo I debido al uso de múltiples test, en cada población.

Las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg mostradas por los dos estadísticos F_{IS} (f_C y f_T) son similares en las dos poblaciones. En la muestra de Ribadeo, los valores de f_C oscilan entre $-0,426$ y $+0,478$ y los valores de f_T varían entre $-0,430$ y $+0,490$. Los valores medios de f_C y f_T para todos los *loci* analizados son $-0,004 \pm 0,018$ y $-0,011 \pm 0,016$, respectivamente. En la población de Vilagarcía los valores de f_C oscilan entre $-0,581$ y $+0,632$ y los valores de f_T varían entre $-0,571$ y $+0,703$ siendo sus valores medios $-0,065 \pm 0,032$ y $-0,033 \pm 0,032$, respectivamente.

Tabla 1.- Frecuencias genotípicas de 32 polimorfismos proteicos detectados mediante 2-DE en la población de Ribadeo. Se indican el número total de individuos analizados (N) y la magnitud de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg según los estadísticos f_c y f_r . La significación estadística de dichas desviaciones se evaluó mediante el test basado en el estimador f_T , el test χ^2 y el test de probabilidad exacta (se indica la probabilidad, P).

Locus	Genotipos																N	f_c	f_r	χ^2	P (test exacto)
	10/10	10/20	10/30	10/40	10/50	20/20	20/30	20/40	20/50	30/30	30/40	30/50	40/40	40/50	50/50						
2	27	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	+0,478	+0,490**	6,47**	0,10	
3	0	8	0	-	-	21	1	-	-	0	-	-	-	-	-	30	-0,140	-0,073	0,92	1	
4	0	1	-	-	-	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	0,000	0,000	0,01	-	
6	0	1	-	-	-	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	0,000	0,000	0,01	-	
8	0	6	-	0	0	19	-	3	1	-	-	1	0	0	0	30	+0,045	+0,082	0,55	0,45	
14	0	1	0	-	-	17	10	-	-	2	-	-	-	-	-	30	+0,059	+0,038	0,11	0,73	
16	13	12	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	+0,155	+0,158	0,58	0,45	
17	0	2	0	-	-	25	3	-	-	0	-	-	-	-	-	30	-0,051	-0,029	0,25	1	
19	24	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	+0,208	+0,212	1,10	0,33	
23	0	4	0	-	-	20	5	-	-	0	-	-	-	-	-	29	-0,115	-0,076	0,98	1	
24	-	-	-	-	-	23	5	2	-	0	0	0	-	-	-	30	-0,086	-0,050	0,52	1	
26	9	3	7	6	-	2	0	1	-	0	1	-	1	-	-	30	+0,042	+0,095	3,79	0,32	
29	3	10	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	+0,164	+0,168	0,66	0,38	
39	0	1	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	0,000	0,000	0,01	-	
40	0	3	0	0	-	22	3	0	-	1	1	-	0	-	-	30	+0,219	+0,090	1,07	0,08	
41	16	12	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-0,256	-0,259	2,08	0,30	
46	0	0	2	-	-	11	9	-	-	8	-	-	-	-	-	30	+0,323	+0,171	5,74	0,05	
48	2	21	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,426	-0,430*	5,81*	0,03	
50	15	13	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,050	-0,051	0,14	1	
51	0	1	0	-	-	26	3	-	-	0	-	-	-	-	-	30	-0,040	-0,019	0,15	1	
53	3	13	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	+0,016	+0,016	0,00	1	
57	-	-	-	-	-	0	5	0	-	12	12	0	-	-	-	29	-0,286	-0,193	4,99	0,32	
58	0	1	0	-	-	28	1	-	-	0	-	-	-	-	-	30	-0,009	0,000	0,02	1	
59	4	15	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,041	-0,041	0,10	1	
64	0	2	0	-	-	23	3	-	-	0	-	-	-	-	-	28	-0,055	-0,031	0,27	1	
66	0	3	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,036	-0,036	0,08	1	
67	0	0	1	-	-	0	1	-	-	28	-	-	-	-	-	30	-0,009	0,000	0,02	1	
68	0	3	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,036	-0,036	0,08	1	
76	25	5	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,074	-0,075	0,25	1	
79	27	3	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-0,036	-0,036	0,08	1	
80	0	3	0	-	-	24	2	-	-	0	-	-	-	-	-	29	-0,053	-0,030	0,26	1	
86	0	0	5	1	-	1	5	1	-	11	5	0	-	-	-	29	-0,051	-0,035	0,69	0,91	

* P < 0,05
** P < 0,01

Tabla 2.- Frecuencias genotípicas de 26 polimorfismos proteicos detectados mediante 2-DE en la población de Vilagarcía. Se indican el número total de individuos analizados (N) y la magnitud de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg según los estadísticos f_C y f_T . La significación estadística de estas desviaciones se evaluó mediante el test basado en el estimador f_T , el test χ^2 y el test de probabilidad exacta (se indica la probabilidad, P).

Locus	Genotipos										N	f_C	f_T	χ^2	P (test exacto)					
	10/10	10/20	10/30	10/40	10/50	20/20	20/30	20/40	20/50	30/30						30/40	30/50	40/40	40/50	50/50
3	0	2	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,077	-0,082	0,16	1
6	1	1	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	+0,632	+0,703*	2,78	0,20
8	-	-	-	-	-	5	2	-	1	0	-	0	-	-	0	8	-0,105	-0,052	0,26	1
14	0	1	0	0	-	2	4	1	-	0	0	-	0	-	-	8	-0,333	-0,143	2,18	1
16	2	6	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,556	-0,571	2,88	0,44
19	5	3	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,167	-0,176	0,43	1
23	6	2	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,077	-0,082	0,16	1
24	1	0	0	-	-	3	4	-	-	0	-	-	-	-	-	8	+0,125	+0,393	2,17	0,09
26	2	2	1	1	-	1	1	0	-	0	0	-	0	-	-	8	+0,079	+0,036	0,36	1
29	0	4	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,273	-0,286	0,89	1
40	0	0	0	1	-	5	1	1	-	0	0	-	0	-	-	8	+0,160	+0,012	0,60	0,39
46	-	-	-	-	-	3	5	-	-	0	-	-	-	-	-	8	-0,400	-0,416	1,65	0,49
48	2	4	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	+0,067	+0,071	0,00	1
50	3	5	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,400	-0,416	1,65	0,49
51	-	-	-	-	-	7	1	-	-	0	-	-	-	-	-	8	0,000	0,000	0,04	-
53	0	3	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,167	-0,176	0,43	1
57	0	0	1	0	-	0	3	0	-	3	1	-	0	-	-	8	-0,228	-0,091	0,71	1
58	0	1	-	0	-	6	-	1	-	-	-	-	0	-	-	8	-0,037	-0,005	0,08	1
59	3	3	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	+0,300	+0,327	0,45	0,53
64	0	1	0	-	-	5	1	-	-	0	-	-	-	-	-	7	-0,044	-0,007	0,10	1
66	-	-	-	-	-	7	1	-	-	0	-	-	-	-	-	8	0,000	0,000	0,04	-
67	0	-	1	-	-	0	-	-	-	7	-	-	-	-	-	8	0,000	0,000	0,04	-
75	5	3	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,167	-0,176	0,43	1
76	6	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	+0,632	+0,703*	2,78	0,20
79	6	2	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-0,077	-0,082	0,16	1
86	0	-	6	0	-	-	-	-	-	1	1	-	0	-	-	8	-0,581	-0,345	4,09	0,14
																	-0,065	-0,033		
																	±0,032	±0,032		

* P < 0,05

En la figura 9 se representan las distribuciones de los valores de f_T en ambas poblaciones.

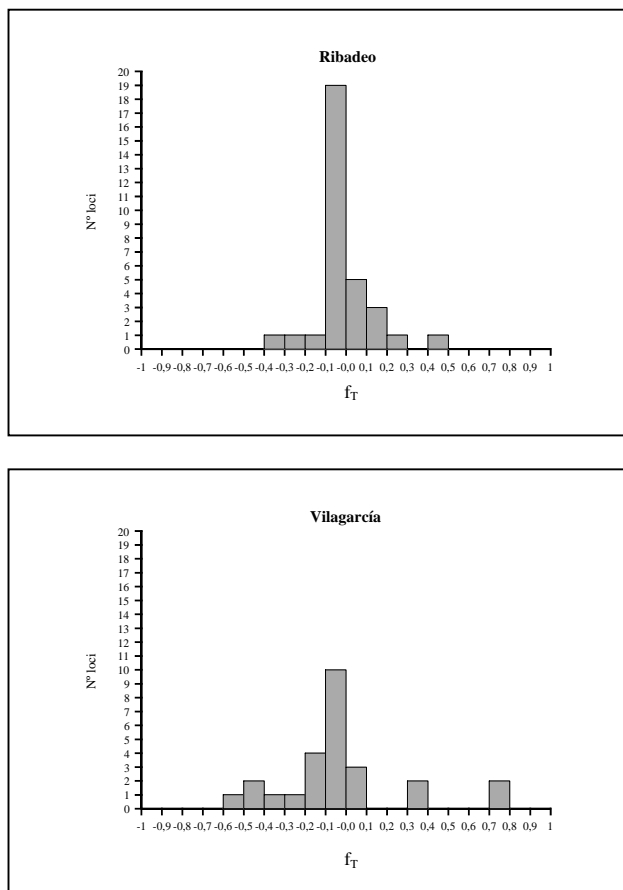


Figura 9.- Distribución de las estimas de f_T para los loci polimórficos detectados mediante electroforesis bidimensional en las poblaciones de Ribadeo y Vilagarcía.

Se observa que la media de los valores de f_T es similar aunque la dispersión de los datos es más amplia en la población de Vilagarcía, probablemente debido al reducido tamaño de muestra analizado. En ambas poblaciones, los valores medios de f_T y f_C estimados se encuentran muy próximos al exceso de heterocigotos esperado por muestreo en una población en equilibrio Hardy-Weinberg, que es $F_{IS} = -1/(2N-1)$ (Kirby, 1975; Robertson & Hill, 1984). De esta manera, el valor de F_{IS} esperado por muestreo sería $-0,017$ en la población de Ribadeo ($N = 30$) y $-0,067$ en la población de Vilagarcía ($N = 8$). Parece por tanto, que los datos genotípicos se encuentran en líneas generales en concordancia con las proporciones esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg, aunque pueden existir desviaciones significativas en *loci* específicos, con tendencia hacia la deficiencia de heterocigotos. El defecto de heterocigotos es un fenómeno detectado comúnmente en poblaciones de moluscos marinos de diferentes especies y que ya se describió para marcadores alozímicos en *Mytilus galloprovincialis* con anterioridad a este trabajo (Sanjuan et al., 1990, 1994; Raymond et al., 1997). Aunque no hay una explicación satisfactoria para este fenómeno, se ha sugerido que pueden estar implicados factores que actúan específicamente sobre algunos *locus* como la selección o el efecto Wahlund (Raymond et al., 1997).

2.3.- VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

En la tabla 3 se muestran los índices de variabilidad (heterozigosis esperada, grado de polimorfismo y número de alelos por *locus*) estimados para las poblaciones de Vilagarcía y Ribadeo. Los patrones de polimorfismo son muy similares en ambas poblaciones. En la población de Ribadeo se encontraron 54 *loci* monomórficos y 32 polimórficos (16 con dos alelos, 12 con tres alelos y 4 cuatro alelos). En la población de Vilagarcía de los 86 *loci* analizados 60 eran monomórficos y 26 polimórficos (17 con dos alelos, 5 con tres alelos y 4 con cuatro alelos).

Tabla 3.- Estimaciones de variabilidad genética obtenidas mediante marcadores de 2-DE en dos poblaciones de *Mytilus galloprovincialis*.

	Ribadeo	Vilagarcía
Heterozigosis media	0,101 ± 0,018	0,114 ± 0,021
Número medio de alelos por <i>locus</i>	1,61 ± 0,10	1,45 ± 0,09
Proporción de <i>loci</i> polimórficos	0,372	0,302
Número de individuos	30	8
Número de <i>loci</i>	86	86

Las estimaciones de variabilidad genética son muy similares también en ambas poblaciones con valores de heterozigosis media de $0,101 \pm 0,018$ en la población de Ribadeo y $0,114 \pm 0,021$ en la población de Vilagarcía. En la tabla 4 se comparan estas estimaciones con la obtenida para esta misma especie mediante análisis de alozimas ($H = 0,240$; Grant y Cherry, 1985), y

con estimas obtenidas para otras especies mediante marcadores de electroforesis bidimensional y marcadores de alozimas. En cuanto a las estimas obtenidas mediante 2-DE en diferentes especies, la obtenida en este trabajo es la más elevada, siendo del orden de 5 a 7 veces mayor que los valores de heterozigosis detectados en *Drosophila* (promedio de las estimas de heterozigosis de diferentes estudios ponderada por el número de *loci* analizados: 0,021 y 0,023 para *D. melanogaster* y *D. simulans*, respectivamente), ratón (0,020), guepardo (0,013) y hombre (promedio ponderado 0,017). Las estimas de heterozigosis obtenidas mediante marcadores de 2-DE en diferentes especies animales son siempre menores que las obtenidas mediante marcadores de alozimas. Existe entre ellas, no obstante, una correlación positiva y estadísticamente significativa ($r = 0,838$, g.l. 4, $P < 0,05$) de manera que las especies en las que los marcadores de alozimas detectan una mayor variabilidad genética, también son más variables según los análisis mediante marcadores de 2-DE, y aquellas que muestran un menor grado de variabilidad mediante marcadores de alozimas también son menos variables según los análisis mediante marcadores de 2-DE. También se observa que a pesar de que hay relativamente pocas estimas de variabilidad obtenidas mediante marcadores de 2-DE, el rango de variación de las mismas es mucho más reducido que el de las estimas obtenidas mediante marcadores de alozimas.

Tabla 4.- Estimaciones de variabilidad genética obtenidas mediante marcadores de electroforesis bidimensional (2-DE) y electroforesis de una dimensión (1-DE) en varias especies animales. N indica el tamaño de muestra y H la heterocigosis media

Especies / Tejidos	2-DE			1-DE		
	Nº loci	H	Ref.	Nº loci	H	Ref.
Hombre (<i>Homo sapiens</i>)				71	0,067	(18)
fibroblastos	5	200	0,006	121	0,143	(19)
linfocitos	28	186	0,024			
	3	250	0,005 ± 0,003			(3)
	40	106	0,031 ± 0,002			(4)
eritrocitos	27	46	0,031 ± 0,005			(5)
	100	55	0,040 ± 0,003			(6)
plaquetas	44	33	0,026			(7)
plasma	62	20	0,062 ± 0,007			(8)
	107 (a)	23	0,045 ± 0,006			(9)
	110 (b)	23	0,057 ± 0,007			(9)
	62 (c)	23	0,080 ± 0,011			(9)
cerebro	145	176	0,0004			(10)
riñón	25	83	0,000			(11)
Guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>)						
fibroblastos	6	155	0,013	47	0,000	(12)
Ratón (<i>Mus musculus</i>)						
riñón	-	72	0,020	41	0,085	(20)
Drosophila (<i>D. melanogaster</i>)						
cuero completo	20	54	0,040	19	0,132	(20)
tracto reproductor masculino	20	307	0,018			(15)
Drosophila (<i>D. simulans</i>)						
cuero completo	19 (d)	70	0,000	79	0,118	(21)
tracto reproductor masculino	20 (d)	295	0,028			(15)
Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)						
pie	30	86	0,101 ± 0,018	23	0,240	(22)

(1) Walton et al., 1979; (2) Goldman and Merrill, 1983; (3) Hamaguchi et al., 1981; (4) Hanash et al., 1986a; (5) Rosenblum et al., 1984; (6) Takahashi et al., 1986; (7) Hanash et al., 1986b; (8) Rosenblum et al., 1983; (9) Asakawa et al., 1985; (10) Comings, 1982; (11) Smith et al., 1980; (12) O'Brien et al., 1983; (13) Racine and Langley, 1980; (14) Leigh Brown and Langley, 1979; (15) Coulthart and Singh, 1988; (16) Ohnishi et al., 1982; (17) Mosquera et al., 2003; (18) Harris and Hopkinson, 1972; (19) Nei and Graur, 1984; (20) Nevo, 1978; (21) Singh et al., 1987; (22) Grant and Cherry, 1985.

(a) Amerindios (b) Japoneses (c) Caucasoides

2.4.- DESEQUILIBRIO GAMÉTICO

Debido al reducido tamaño de muestra analizado en la población de Vilagarcía, el análisis de desequilibrio se restringió a la población de Ribadeo. En él no se consideraron aquellos *loci* en los que se detectó una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg, ya que la estimación de máxima verosimilitud de las frecuencias haplotípicas a partir de las frecuencias genotípicas asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Hill, 1974; Excoffier y Slatkin, 1995). Se descartaron del análisis de desequilibrio por tanto los *loci* 2, 46 y 48 y se incluyeron los 29 *loci* polimórficos restantes, analizándose un total de 406 asociaciones entre pares de *loci*. Se detectó asociación gamética estadísticamente significativa en 18 pares (4,43%) según el test de razón de verosimilitudes y en 81 (19,95%) según los tests χ^2 (con corrección de Bonferroni) para cada par de alelos. Mediante el test χ^2 se detectaron asociaciones significativas entre los alelos más frecuentes de 53 pares de *loci* (13,05%). En total se detectaron asociaciones estadísticamente significativas mediante los diferentes test aplicados en 92 (22,66%) de los 406 pares de *loci* analizados. Los resultados de este estudio muestran que los test χ^2 detectan más asociaciones significativas que el test de razón de verosimilitudes. De todas formas, cabe destacar que el test χ^2 no tiene una elevada potencia estadística para detectar desequilibrio gamético significativo, especialmente cuando las frecuencias alélicas son extremas y el desequilibrio no es relativamente intenso (Brown, 1975; Zapata y

Alvarez, 1992). Este hecho debe considerarse de manera especial en nuestro caso, ya que el tamaño de muestra no es muy elevado (2N = 60).

En la tabla 5 se muestran valores de desequilibrio correspondientes a los 92 pares de loci en los que se detectaron asociaciones estadísticamente significativas.

Tabla 5.- Análisis de desequilibrio gamético para los 92 pares de loci que mostraron alguna asociación estadísticamente significativa. Se indican los valores de D' global, la probabilidad del test de razón de verosimilitudes (P) y el número de χ^2_{ij} significativos / número de χ^2 (con corrección de Bonferroni). También se indica el valor de D'_{ij} y χ^2_{ij} para los alelos más frecuentes. k y l son los números de alelos en cada par de loci

Par de loci	(k x l)	DESEQUILIBRIO GLOBAL			ALELOS MAS FRECUENTES	
		D'	P	χ^2_{ij} sign./ n° χ^2	D'ij	χ^2_{ij}
3 - 6	(3x2)	0,991	0,210	2/3	1,000	5,88*
4 - 14	(2x3)	1,000	0,032	1/3	1,000	3,11
8 - 3	(4x3)	0,547	0,155	2/12	-0,433	0,50
8 - 14	(4x3)	0,557	0,074	4/12	0,527	12,48***
8 - 17	(4x3)	0,287	0,181	2/12	0,202	0,89
8 - 23	(4x3)	0,323	0,138	1/12	0,298	3,79
8 - 24	(4x3)	0,273	0,045	2/12	0,188	1,12
8 - 26	(4x4)	0,411	0,473	0/16	0,453	4,04*
8 - 39	(4x2)	1,000	0,022	1/4	1,000	3,84*
8 - 40	(4x4)	0,290	0,372	1/16	-0,102	0,03
8 - 41	(4x2)	0,905	0,911	1/4	-1,000	8,79**
8 - 51	(4x3)	0,568	0,221	2/12	0,627	6,77**
8 - 67	(4x3)	1,000	0,156	4/12	1,000	8,19**
8 - 76	(4x2)	0,380	0,233	1/4	0,413	3,70
8 - 79	(4x2)	0,598	0,023	1/4	0,575	4,18*
8 - 80	(4x3)	0,282	0,226	2/12	0,208	0,91
17 - 24	(3x3)	0,224	0,192	1/9	0,086	0,30
17 - 39	(3x2)	1,000	0,132	2/3	1,000	13,53***
17 - 64	(3x3)	0,494	0,019	5/9	0,443	8,61**
17 - 79	(3x2)	0,302	0,186	1/3	0,258	2,33
17 - 80	(3x3)	0,233	0,534	1/9	0,160	1,16
19 - 40	(2x4)	0,214	0,303	1/4	0,179	1,27
19 - 86	(2x4)	0,314	0,205	1/4	0,132	0,25

Tabla 5.- continuación

23 - 6	(3x2)	1,000	0,178	1/3	1,000	5,47*
24 - 3	(3x3)	0,221	0,123	2/9	0,025	0,03
24 - 4	(3x2)	0,994	0,217	2/3	1,000	7,83**
24 - 14	(3x3)	0,153	0,366	2/9	0,179	0,77
24 - 26	(3x4)	0,656	0,023	1/12	0,699	5,08*
24 - 39	(3x2)	1,000	0,068	2/3	1,000	7,29**
24 - 40	(3x4)	0,294	0,244	2/12	0,138	0,76
24 - 46	(3x3)	0,340	0,008	2/9	0,438	1,63
24 - 50	(3x2)	0,453	0,298	0/3	0,452	4,11*
24 - 58	(3x3)	0,486	0,393	2/9	0,451	3,14
24 - 64	(3x3)	0,131	0,784	1/9	0,056	0,15
24 - 79	(3x2)	0,301	0,255	1/3	0,230	1,26
24 - 80	(3x3)	0,282	0,269	1/9	0,286	3,24
24 - 86	(3x4)	0,457	0,242	1/12	0,560	4,41*
26 - 23	(4x3)	0,443	0,244	1/12	-0,240	0,47
26 - 46	(4x3)	0,381	0,019	1/12	0,223	2,43
26 - 51	(4x3)	0,816	0,073	1/12	1,000	5,64*
26 - 66	(4x2)	0,659	0,464	0/4	1,000	4,14*
26 - 80	(4x3)	0,409	0,167	1/12	-0,083	0,03
26 - 86	(4x4)	0,387	0,082	1/16	0,369	5,91*
29 - 68	(2x2)	1,000	0,028	1/1	1,000	8,67**
29 - 86	(2x4)	0,269	0,468	1/4	0,284	3,15
39 - 23	(2x3)	1,000	0,000	1/3	1,000	5,35*
39 - 79	(2x2)	1,000	0,104	1/1	1,000	18,29***
39 - 80	(2x3)	1,000	0,173	2/3	1,000	10,66**
40 - 23	(4x3)	0,407	0,328	1/12	-0,305	0,20
40 - 86	(4x4)	0,377	0,245	0/16	0,453	4,36*
41 - 3	(2x3)	0,471	0,106	2/3	0,448	6,90**
41 - 4	(2x2)	1,000	0,043	0/1	1,000	3,56
41 - 59	(2x2)	0,454	0,163	1/1	0,454	5,24*
41 - 64	(2x3)	0,684	0,063	2/3	0,683	9,64***
41 - 66	(2x2)	1,000	0,018	1/1	1,000	11,74***
50 - 23	(2x3)	0,447	0,005	1/3	0,370	3,52
50 - 86	(2x4)	0,255	0,163	1/4	0,075	0,24
51 - 58	(3x3)	0,507	0,242	3/9	0,480	6,58*
51 - 80	(3x3)	0,232	0,355	1/9	0,160	1,16
57 - 3	(3x3)	0,572	0,162	3/9	0,626	10,06**
57 - 23	(3x3)	0,142	0,908	1/9	0,104	0,29
58 - 68	(3x2)	0,477	0,189	2/3	0,458	8,15**
58 - 79	(3x2)	0,477	0,190	2/3	0,458	8,15**
58 - 80	(3x3)	0,492	0,315	3/9	0,453	4,45*
58 - 86	(3x4)	1,000	0,113	1/12	1,000	3,60
59 - 3	(2x3)	0,481	0,426	0/3	0,481	3,95*
59 - 23	(2x3)	0,390	0,184	1/3	0,356	2,21
59 - 64	(2x3)	1,000	0,287	1/3	1,000	8,45**
59 - 79	(2x2)	1,000	0,181	1/1	1,000	5,09*
64 - 3	(3x3)	0,401	0,271	0/9	0,352	3,85*
64 - 79	(3x2)	0,443	0,151	1/3	0,421	3,80
66 - 23	(2x3)	0,497	0,204	0/3	0,545	5,15*
66 - 64	(2x3)	0,649	0,009	2/3	0,634	13,16***
66 - 79	(2x2)	0,263	0,176	1/1	0,263	4,16*
66 - 86	(2x4)	0,584	0,277	1/4	-0,427	1,02

Tabla 5.- continuación

67 - 53	(3x2)	1,000	0,365	0/3	1,000	4,41*
67 - 58	(3x3)	1,000	1,000	2/9	-1,000	0,26
67 - 68	(3x3)	0,471	0,524	1/9	0,408	1,86
67 - 76	(3x2)	0,458	0,310	1/3	0,438	4,34*
68 - 79	(2x2)	0,263	0,259	1/1	0,263	4,16*
68 - 86	(2x4)	0,868	0,073	1/4	1,000	5,61*
76 - 58	(2x3)	0,457	0,299	1/3	0,438	4,34*
76 - 64	(2x3)	0,287	0,129	0/3	0,285	4,54*
76 - 79	(2x2)	0,607	0,058	1/1	0,607	12,87***
76 - 80	(2x3)	0,365	0,090	2/3	0,326	6,15*
79 - 23	(2x3)	0,616	0,041	1/3	0,574	5,48*
79 - 80	(2x3)	0,636	0,027	2/3	0,621	13,05***
80 - 4	(3x2)	1,000	0,073	2/3	1,000	10,66**
80 - 14	(3x3)	0,257	0,078	2/9	0,200	0,62
86 - 3	(4x3)	1,000	0,792	0/12	-1,000	6,93**
86 - 4	(4x2)	1,000	0,031	1/4	1,000	1,77
86 - 23	(4x3)	0,456	0,264	1/12	0,404	2,92

En general, en estos pares se pueden observar dos patrones de desequilibrio gamético. En 53 de ellos, la asociación estadística es debida fundamentalmente a alelos frecuentes, mientras que en los 39 pares restantes, se encuentra asociada a alelos raros. En el primer caso, la magnitud del desequilibrio gamético detectado es elevada ($D' = 0,687 \pm 0,036$) y también lo es considerando sólo los alelos frecuentes ($D'_{ij} = 0,699 \pm 0,037$). En el segundo caso en cambio, la magnitud del desequilibrio global ($D' = 0,411 \pm 0,040$) y del desequilibrio asociado a alelos frecuentes ($D'_{ij} = 0,334 \pm 0,045$) es considerablemente menor.

Se han detectado grupos de *loci* en los cuales todas las combinaciones muestran desequilibrio gamético estadísticamente significativo. En la tabla 6 se muestra uno de estos grupos, compuesto por 6 *loci* (8, 17, 24, 39, 79 y 80). En él, el desequilibrio global para pares de *loci* varía entre 0,224 y 1 con un valor medio de $0,561 \pm 0,088$. Además,

tres *loci* de este grupo (39, 79 y 80) muestran asociaciones significativas entre los alelos más frecuentes para todas las combinaciones, con valores de D'_{ij} para alelos frecuentes que varían entre 0,621 y 1.

Tabla 6.- Grupo de seis loci (8, 17, 24, 39, 79 y 80) que muestran asociaciones estadísticamente significativas entre todos los pares. Para cada par de locus se indican en la línea superior el D' total y el número de χ^2_{ij} estadísticamente significativos / número total de χ^2 (entre paréntesis) y en la línea inferior, los valores de $|D'_{ij}|$ y χ^2_{ij} para los alelos más frecuentes (entre paréntesis).

	8	17	24	39	79	80
8	-					
17	0,287 (2/12) 0,202 (0,89)	-				
24	0,273 (1/12) 0,188 (1,12)	0,224 (1/9) 0,086 (0,30)	-			
39	1 (1/4) 1 (3,84)	1 (2/3) 1 (13,53 ^{***})	1 (2/3) 1 (7,29 ^{**})	-		
79	0,598 (1/4) 0,575 (4,18 [*])	0,302 (1/3) 0,258 (2,33)	0,301 (1/3) 0,230 (1,26)	1 (1/1) 1 (18,29 ^{***})	-	
80	0,282 (2/12) 0,208 (0,91)	0,233 (1/9) 0,160 (1,16)	0,282 (1/9) 0,286 (3,24)	1 (2/3) 1 (10,66 ^{**})	0,636 (2/3) 0,621 (13,05 ^{***})	-

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

También se detectaron varios grupos formados por 3 o 4 *loci*. En la tabla 7 se muestra uno de ellos, formado por cuatro *loci* (58, 76, 79 y 80). El valor global de D' para pares de *loci* en este grupo varía de 0,365 a 0,636 con un valor medio de $0,506 \pm 0,041$. En él, todas las combinaciones

muestran asociaciones significativas entre los alelos más frecuentes, con valores de D'_{ij} dentro de un rango de 0,326 a 0,621.

Tabla 7.- Grupo de cuatro loci (58, 76, 79 y 80) que muestran asociaciones estadísticamente significativas entre todos los pares. Para cada par de locus se indican en la línea superior el D' total y el número de χ^2_{ij} estadísticamente significativos / número total de χ^2 (entre paréntesis) y en la línea inferior, los valores de $|D'_{ij}|$ y χ^2_{ij} para los alelos más frecuentes (entre paréntesis).

	58	76	79	80
58	-			
76	0,457 (1/3) 0,438 (4,34*)	-		
79	0,477 (2/3) 0,458 (8,15**)	0,607 (1/1) 0,607 (12,87***)	-	
80	0,492 (3/9) 0,453 (4,45*)	0,365 (2/3) 0,326 (6,15*)	0,636 (2/3) 0,621 (13,05***)	-

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

3.- ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

3.1.- SELECCIÓN DE POLIPÉPTIDOS PARA EL ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.

En la figura 10 se indica la localización de las 8 poblaciones de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis* muestreadas a lo largo de la Península Ibérica para el análisis de estructura poblacional entre Abril de 2001 y Julio de 2002. De ellas, 4 se sitúan al oeste del frente oceanográfico Almería - Orán (Santander, Ribadeo, Sintra y Marbella) y las otras cuatro al este de dicho frente (Almería, Cullera, Valencia y Vilanova i la Geltrú).

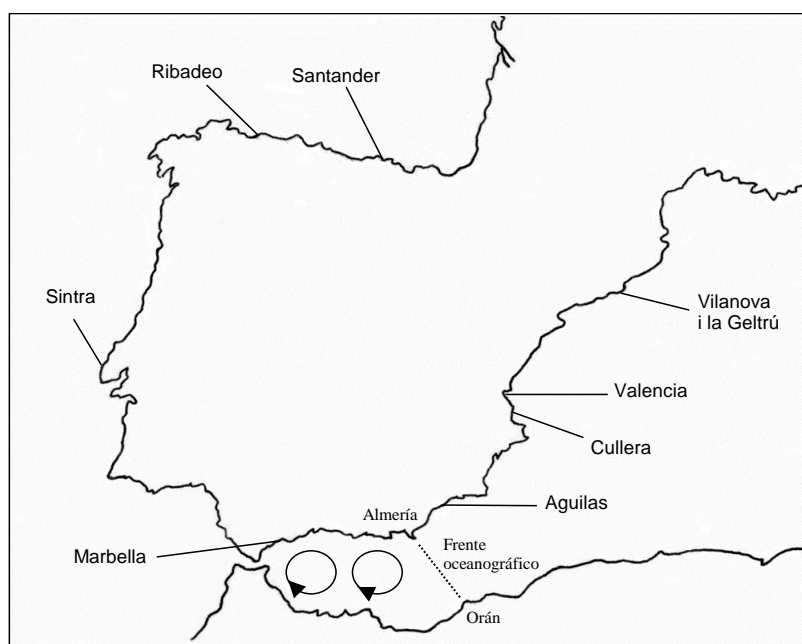


Figura 10.- Localidades muestreadas en el análisis de la estructura genética de las poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica mediante marcadores de electroforesis bidimensional (técnica de IPGs).

En la figura 11 se muestra un mapa representativo del patrón proteico obtenido al separar 255µg de muestra de pie de *Mytilus galloprovincialis* mediante 2-DE (técnica de IPGs).

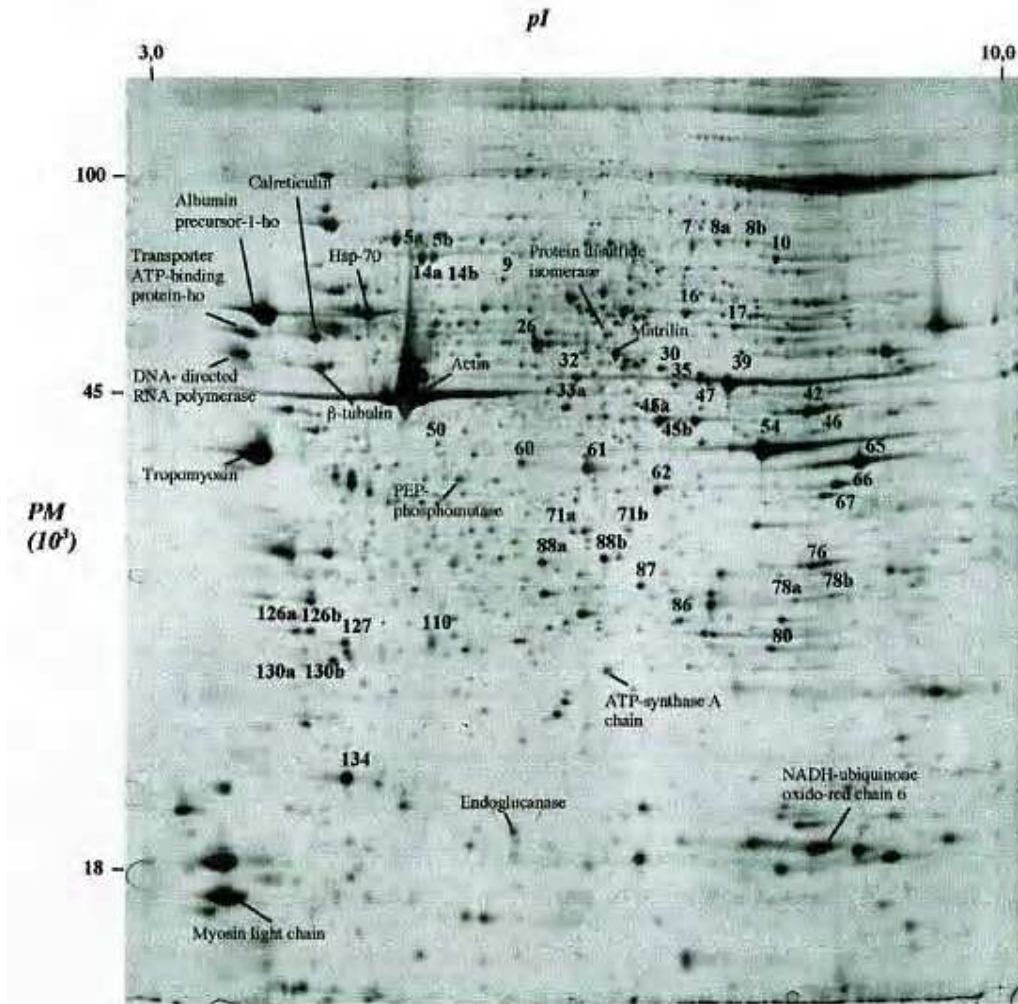


Figura 11.- Patrón proteico de pie de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) obtenido mediante electroforesis bidimensional de alta resolución (técnica de IPGs). Se señalan con números los polipéptidos en los que se ha detectado polimorfismo; las letras indican variantes ácidas (a) o básicas (b). Se indica también la identidad de algunos polipéptidos determinada mediante espectrometría de masas por López *et al.*, 2002.

Los rangos de pH (3 – 10) y de peso molecular (*PM* 10 – 100kDa) analizados permiten visualizar mediante tinción con nitrato de plata aproximadamente 1.300 “spots” en cada gel. En las figuras 12 y 13 se muestran varios ejemplos de polimorfismos genéticos identificados en los geles bidimensionales (técnica de IPGs).

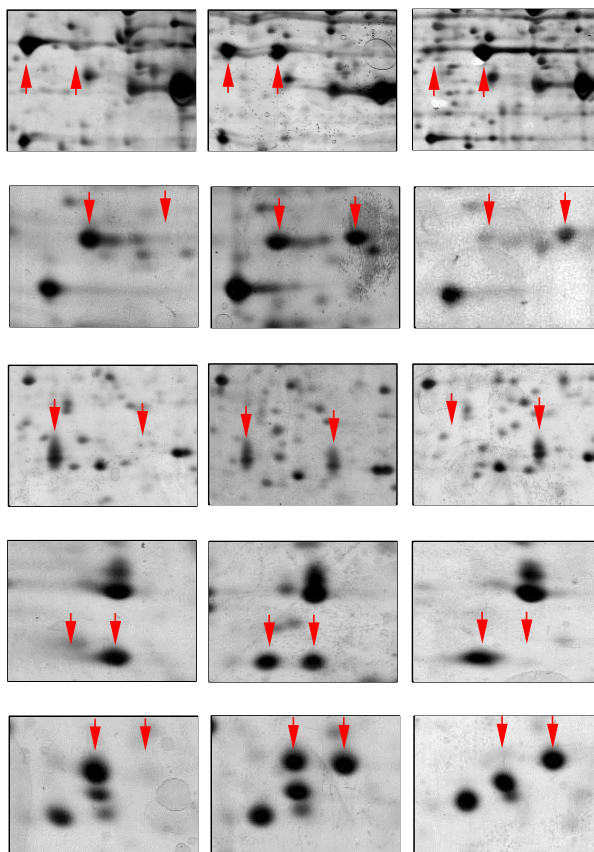


Figura 12.- Ejemplos de 5 polimorfismos genéticos detectados mediante electroforesis bidimensional (técnica de IPGs). De arriba abajo: loci 45, 78, 110, 126 y 127. Para cada locus se muestran los genotipos posibles con dos alelos; de izquierda a derecha: homocigoto ácido, heterocigoto, homocigoto básico. Las flechas indican la posición de las variantes presentes y ausentes.

Se muestran todos los genotipos posibles con dos (figura 12) y tres (figura 13) alelos. En la figura 12 se muestran en la columna central los heterocigotos, en la columna de la izquierda se muestran los homocigotos ácidos y en la columna derecha los homocigotos básicos de 5 *loci* polimórficos (*loci* 45, 78, 110, 126 y 127) cuya posición en el gel se puede ver en la figura 11.

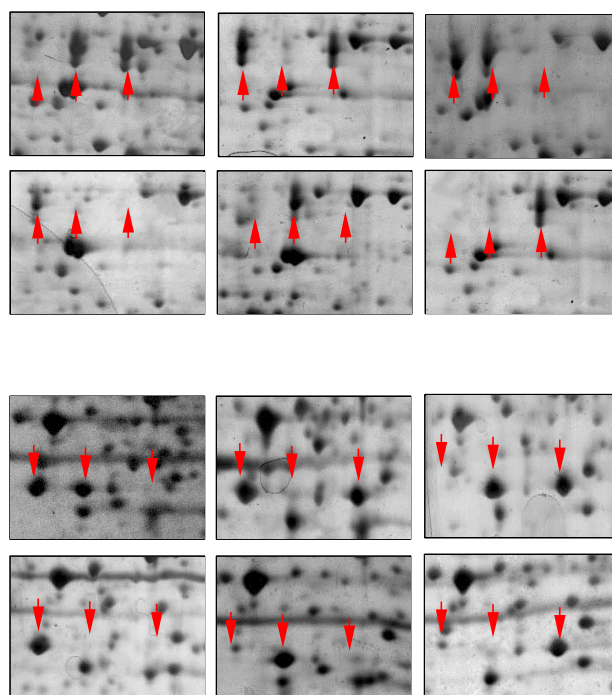


Figura 13.- Ejemplos de 2 polimorfismos genéticos detectados mediante electroforesis bidimensional (técnica de IPGs). Se muestran los genotipos posibles con tres alelos para los locus 7 (arriba) y 33 (abajo). Las flechas indican la posición de las variantes presentes y ausentes.

En la figura 13 se muestran en las filas superiores los 3 heterocigotos posibles y en las filas inferiores los 3 homocigotos correspondientes a cada alelo desde el más ácido (izquierda) al más básico (derecha) de dos *loci* polimórficos (*loci* 7 y 33). Los 38 *loci* polimórficos analizados (con su numeración correspondiente) y todas las variantes alélicas detectadas en cada uno de ellos (unidas mediante líneas) se muestran en la figura 14.

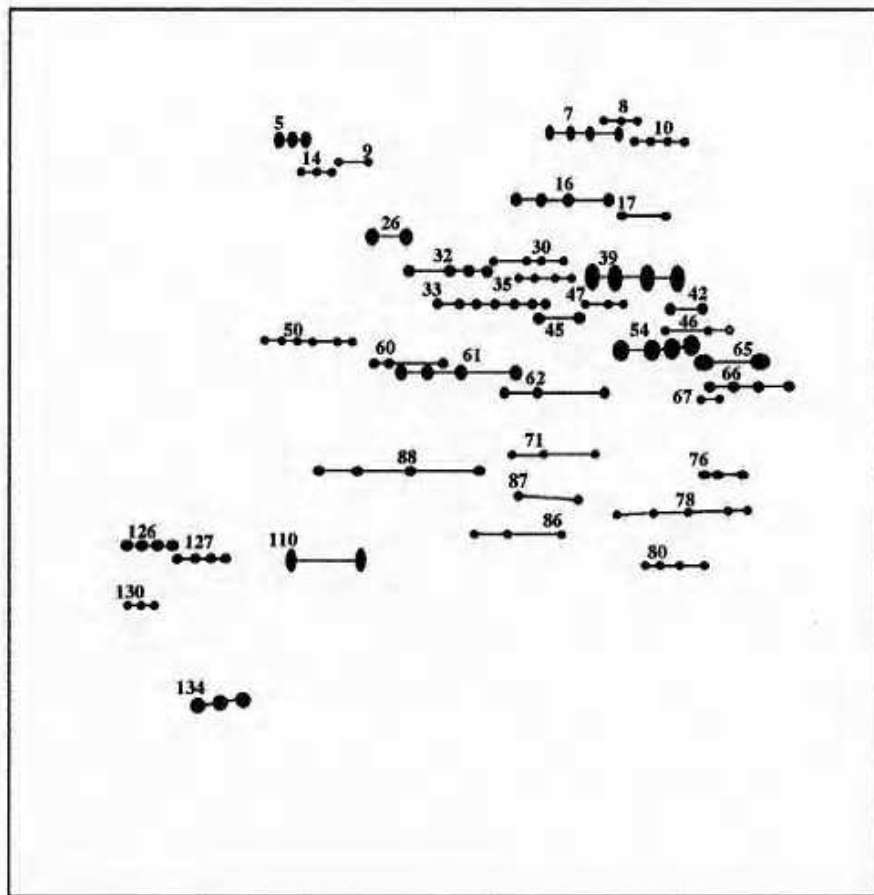


Figura 14.- Representación esquemática de los 38 polimorfismos proteicos analizados mediante 2-DE (técnica de IPGs) con todas sus variantes alélicas (unidas mediante líneas).

3.2.- FRECUENCIAS GÉNICAS Y VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

El número de alelos detectados por *locus* polimórfico en las ocho poblaciones de mejillón estudiadas oscila entre 2 y 7 (hay ocho *loci* con dos alelos, 13 con 3 alelos, 14 con 4 alelos, uno con 5, uno con 6 y uno con 7 alelos). En la tabla 8 se muestran las frecuencias alélicas de los 38 *loci* polimórficos analizados en cada población. El modo en cómo varían éstas a lo largo de las 8 poblaciones de mejillón de la Península Ibérica analizadas se puede observar en la figura 15. En la mayor parte de los *loci*, se observa una pequeña variación entre poblaciones. Sin embargo, algunos *loci* (10, 17, 30, 33, 39, 45, 47 etc.) mostraron cambios bruscos en las frecuencias génicas de sus alelos entre las poblaciones de la región atlántica (Santander, Ribadeo, Sintra y Marbella) y las poblaciones de la región mediterránea (Águilas, Cullera, Valencia y Vilanova i la Geltrú), llegando incluso a invertirse el patrón de distribución de dichas frecuencias (el alelo más frecuente en la región atlántica pasa a ser el más raro en la región mediterránea y viceversa). En cambio, el grado de variación entre poblaciones de la misma región suele ser en general, bajo. Cabe destacar la posición intermedia que en ocasiones muestra la población de Águilas con frecuencias que se asemejan a veces a las frecuencias típicas de las poblaciones atlánticas, otras veces son más similares a las frecuencias típicas de las poblaciones mediterráneas o bien se encuentran a medio camino entre ambas.

Tabla 8.- Frecuencias alélicas de 38 loci analizados mediante electroforesis bidimensional en 8 poblaciones de *Mytilus galloprovincialis*. N es el número de individuos analizados.

Población	Locus	Alelo							N
		1	2	3	4	5	6	7	
1. Santander	5	0,500	0,500	0,000	-	-	-	-	26
2. Ribadeo		0,422	0,578	0,000	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,458	0,542	0,000	-	-	-	-	24
4. Marbella		0,560	0,440	0,000	-	-	-	-	25
5. Aguilas		0,350	0,633	0,017	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,375	0,625	0,000	-	-	-	-	28
7. Valencia		0,196	0,804	0,000	-	-	-	-	28
8. Vilanova		0,328	0,672	0,000	-	-	-	-	29
1. Santander	7	0,268	0,625	0,089	0,018	-	-	-	28
2. Ribadeo		0,268	0,589	0,125	0,018	-	-	-	28
3. Sintra		0,146	0,750	0,083	0,021	-	-	-	24
4. Marbella		0,179	0,768	0,053	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,178	0,786	0,036	0,000	-	-	-	28
6. Cullera		0,111	0,796	0,056	0,037	-	-	-	27
7. Valencia		0,120	0,740	0,140	0,000	-	-	-	25
8. Vilanova		0,250	0,607	0,089	0,054	-	-	-	28
1. Santander	8	0,222	0,463	0,315	-	-	-	-	27
2. Ribadeo		0,286	0,393	0,321	-	-	-	-	28
3. Sintra		0,229	0,438	0,333	-	-	-	-	24
4. Marbella		0,404	0,404	0,192	-	-	-	-	26
5. Aguilas		0,278	0,407	0,315	-	-	-	-	27
6. Cullera		0,143	0,571	0,286	-	-	-	-	28
7. Valencia		0,100	0,500	0,400	-	-	-	-	25
8. Vilanova		0,052	0,690	0,258	-	-	-	-	29
1. Santander	9	0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	31
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	27
4. Marbella		0,018	0,982	0,000	-	-	-	-	28
5. Aguilas		0,086	0,914	0,000	-	-	-	-	29
6. Cullera		0,017	0,966	0,017	-	-	-	-	29
7. Valencia		0,036	0,964	0,000	-	-	-	-	28
8. Vilanova		0,093	0,907	0,000	-	-	-	-	27

Tabla 8.- continuación

1. Santander	10	0,000	0,232	0,768	0,000	-	-	-	28
2. Ribadeo		0,000	0,232	0,768	0,000	-	-	-	28
3. Sintra		0,000	0,333	0,667	0,000	-	-	-	24
4. Marbella		0,000	0,173	0,808	0,019	-	-	-	26
5. Aguilas		0,000	0,500	0,466	0,034	-	-	-	29
6. Cullera		0,000	0,569	0,431	0,000	-	-	-	29
7. Valencia		0,000	0,720	0,280	0,000	-	-	-	25
8. Vilanova		0,017	0,550	0,433	0,000	-	-	-	30
1. Santander	14	0,018	0,321	0,661	-	-	-	-	28
2. Ribadeo		0,000	0,380	0,620	-	-	-	-	25
3. Sintra		0,000	0,396	0,604	-	-	-	-	24
4. Marbella		0,020	0,400	0,580	-	-	-	-	25
5. Aguilas		0,000	0,432	0,568	-	-	-	-	22
6. Cullera		0,000	0,296	0,704	-	-	-	-	27
7. Valencia		0,000	0,250	0,750	-	-	-	-	26
8. Vilanova		0,000	0,327	0,673	-	-	-	-	26
1. Santander	16	0,103	0,000	0,759	0,138	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,040	0,040	0,800	0,120	-	-	-	25
3. Sintra		0,055	0,000	0,806	0,139	-	-	-	18
4. Marbella		0,048	0,000	0,762	0,190	-	-	-	21
5. Aguilas		0,021	0,000	0,854	0,125	-	-	-	24
6. Cullera		0,022	0,000	0,826	0,152	-	-	-	23
7. Valencia		0,000	0,018	0,889	0,093	-	-	-	27
8. Vilanova		0,000	0,000	0,768	0,232	-	-	-	28
1. Santander	17	0,867	0,133	-	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,883	0,117	-	-	-	-	-	30
3. Sintra		0,914	0,086	-	-	-	-	-	29
4. Marbella		0,885	0,115	-	-	-	-	-	26
5. Aguilas		0,654	0,346	-	-	-	-	-	26
6. Cullera		0,444	0,556	-	-	-	-	-	27
7. Valencia		0,190	0,810	-	-	-	-	-	29
8. Vilanova		0,448	0,552	-	-	-	-	-	29
1. Santander	26	0,034	0,966	-	-	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,031	0,969	-	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,034	0,966	-	-	-	-	-	29
4. Marbella		0,034	0,966	-	-	-	-	-	29
5. Aguilas		0,000	1,000	-	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,033	0,967	-	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	1,000	-	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,017	0,983	-	-	-	-	-	30

Tabla 8.- continuación

1. Santander	30	0,000	0,117	0,883	0,000	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,113	0,871	0,016	-	-	-	31
3. Sintra		0,000	0,200	0,800	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,107	0,893	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,000	0,268	0,732	0,000	-	-	-	28
6. Cullera		0,000	0,611	0,389	0,000	-	-	-	27
7. Valencia		0,018	0,625	0,339	0,018	-	-	-	28
8. Vilanova		0,000	0,500	0,500	0,000	-	-	-	29
1. Santander	32	0,000	0,967	0,000	0,033	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,952	0,016	0,032	-	-	-	31
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	27
4. Marbella		0,000	0,966	0,000	0,034	-	-	-	29
5. Aguilas		0,033	0,967	0,000	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	0,966	0,000	0,034	-	-	-	29
7. Valencia		0,000	0,983	0,000	0,017	-	-	-	29
8. Vilanova		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
1. Santander	33	0,185	0,111	0,000	0,185	0,000	0,519	0,000	27
2. Ribadeo		0,188	0,203	0,000	0,109	0,000	0,500	0,000	32
3. Sintra		0,100	0,120	0,000	0,080	0,020	0,680	0,000	25
4. Marbella		0,074	0,241	0,000	0,093	0,000	0,574	0,018	27
5. Aguilas		0,267	0,300	0,016	0,150	0,000	0,267	0,000	30
6. Cullera		0,300	0,420	0,000	0,240	0,000	0,040	0,000	25
7. Valencia		0,267	0,467	0,033	0,183	0,000	0,050	0,000	30
8. Vilanova		0,189	0,414	0,000	0,276	0,000	0,121	0,000	29
1. Santander	35	0,017	0,033	0,950	0,000	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,047	0,953	0,000	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	0,107	0,875	0,018	-	-	-	28
4. Marbella		0,000	0,054	0,946	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,000	0,179	0,821	0,000	-	-	-	28
6. Cullera		0,000	0,232	0,768	0,000	-	-	-	28
7. Valencia		0,000	0,155	0,845	0,000	-	-	-	29
8. Vilanova		0,000	0,121	0,879	0,000	-	-	-	29
1. Santander	39	0,000	0,934	0,033	0,033	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,875	0,094	0,031	-	-	-	32
3. Sintra		0,017	0,900	0,083	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,933	0,067	0,000	-	-	-	30
5. Aguilas		0,019	0,462	0,461	0,058	-	-	-	26
6. Cullera		0,000	0,233	0,750	0,017	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	0,150	0,833	0,017	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	0,233	0,700	0,067	-	-	-	30

Tabla 8.- continuación

1. Santander	42	0,138	0,862	-	-	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,067	0,933	-	-	-	-	-	30
3. Sintra		0,056	0,944	-	-	-	-	-	27
4. Marbella		0,143	0,857	-	-	-	-	-	28
5. Aguilas		0,100	0,900	-	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,034	0,966	-	-	-	-	-	29
7. Valencia		0,052	0,948	-	-	-	-	-	29
8. Vilanova		0,034	0,966	-	-	-	-	-	29
1. Santander	45	0,724	0,276	-	-	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,719	0,281	-	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,817	0,183	-	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,804	0,196	-	-	-	-	-	28
5. Aguilas		0,317	0,683	-	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,217	0,783	-	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,183	0,817	-	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,200	0,800	-	-	-	-	-	30
1. Santander	46	0,017	0,967	0,016	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,018	0,982	0,000	-	-	-	-	28
3. Sintra		0,052	0,931	0,017	-	-	-	-	29
4. Marbella		0,040	0,940	0,020	-	-	-	-	25
5. Aguilas		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	28
6. Cullera		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	29
7. Valencia		0,000	0,982	0,018	-	-	-	-	28
8. Vilanova		0,017	0,966	0,017	-	-	-	-	29
1. Santander	47	0,433	0,567	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,517	0,483	0,000	-	-	-	-	29
3. Sintra		0,523	0,454	0,023	-	-	-	-	22
4. Marbella		0,543	0,457	0,000	-	-	-	-	23
5. Aguilas		0,520	0,480	0,000	-	-	-	-	25
6. Cullera		0,167	0,833	0,000	-	-	-	-	27
7. Valencia		0,259	0,741	0,000	-	-	-	-	29
8. Vilanova		0,365	0,616	0,019	-	-	-	-	26
1. Santander	50	0,000	0,017	0,900	0,000	0,016	0,067	-	30
2. Ribadeo		0,031	0,000	0,969	0,000	0,000	0,000	-	32
3. Sintra		0,033	0,000	0,934	0,000	0,000	0,033	-	30
4. Marbella		0,039	0,039	0,865	0,019	0,019	0,019	-	26
5. Aguilas		0,017	0,000	0,948	0,000	0,000	0,035	-	29
6. Cullera		0,000	0,019	0,962	0,000	0,000	0,019	-	26
7. Valencia		0,036	0,018	0,893	0,000	0,000	0,053	-	28
8. Vilanova		0,017	0,000	0,917	0,000	0,016	0,050	-	30

Tabla 8.- continuación

1. Santander	54	0,017	0,983	0,000	0,000	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,017	0,950	0,017	0,016	-	-	-	30
5. Aguilas		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	29
8. Vilanova		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
1. Santander	60	0,033	0,967	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,984	0,016	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
5. Aguilas		0,017	0,983	0,000	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,033	0,967	0,000	-	-	-	-	30
1. Santander	61	0,000	0,033	0,967	0,000	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,000	0,984	0,016	-	-	-	32
3. Sintra		0,017	0,000	0,983	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,000	1,000	0,000	-	-	-	30
5. Aguilas		0,000	0,017	0,983	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	0,000	1,000	0,000	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	0,000	1,000	0,000	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	0,033	0,967	0,000	-	-	-	30
1. Santander	62	0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,984	0,016	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,983	0,017	-	-	-	-	30
5. Aguilas		0,018	0,982	0,000	-	-	-	-	28
6. Cullera		0,017	0,983	0,000	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
1. Santander	65	0,154	0,846	-	-	-	-	-	26
2. Ribadeo		0,167	0,833	-	-	-	-	-	30
3. Sintra		0,180	0,820	-	-	-	-	-	25
4. Marbella		0,231	0,769	-	-	-	-	-	26
5. Aguilas		0,204	0,796	-	-	-	-	-	27
6. Cullera		0,140	0,860	-	-	-	-	-	25
7. Valencia		0,120	0,880	-	-	-	-	-	25
8. Vilanova		0,130	0,870	-	-	-	-	-	27

Tabla 8.- continuación

1. Santander	66	0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	29
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	28
4. Marbella		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,017	0,983	0,000	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	25
7. Valencia		0,000	0,946	0,036	0,018	-	-	-	28
8. Vilanova		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	27
1. Santander	67	0,000	1,000	-	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	1,000	-	-	-	-	-	29
3. Sintra		0,018	0,982	-	-	-	-	-	28
4. Marbella		0,000	1,000	-	-	-	-	-	29
5. Aguilas		0,033	0,967	-	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	1,000	-	-	-	-	-	25
7. Valencia		0,000	1,000	-	-	-	-	-	29
8. Vilanova		0,000	1,000	-	-	-	-	-	27
1. Santander	71	0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,983	0,017	-	-	-	-	30
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	28
4. Marbella		0,000	0,983	0,017	-	-	-	-	30
5. Aguilas		0,000	0,983	0,017	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	1,000	0,000	-	-	-	-	29
7. Valencia		0,016	0,967	0,017	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	0,983	0,017	-	-	-	-	30
1. Santander	76	0,983	0,000	0,017	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,867	0,133	0,000	-	-	-	-	30
3. Sintra		0,983	0,017	0,000	-	-	-	-	29
4. Marbella		0,982	0,018	0,000	-	-	-	-	28
5. Aguilas		1,000	0,000	0,000	-	-	-	-	29
6. Cullera		0,964	0,036	0,000	-	-	-	-	28
7. Valencia		0,983	0,000	0,017	-	-	-	-	30
8. Vilanova		1,000	0,000	0,000	-	-	-	-	29
1. Santander	78	0,000	0,017	0,776	0,207	0,000	-	-	29
2. Ribadeo		0,000	0,016	0,656	0,312	0,016	-	-	32
3. Sintra		0,000	0,000	0,776	0,224	0,000	-	-	29
4. Marbella		0,017	0,017	0,759	0,207	0,000	-	-	29
5. Aguilas		0,000	0,017	0,604	0,379	0,000	-	-	29
6. Cullera		0,000	0,000	0,500	0,500	0,000	-	-	28
7. Valencia		0,000	0,000	0,792	0,208	0,000	-	-	24
8. Vilanova		0,000	0,000	0,638	0,362	0,000	-	-	29

Tabla 8.- continuación

1. Santander	80	0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,969	0,016	0,015	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,983	0,000	0,017	-	-	-	30
5. Aguilas		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,036	0,964	0,000	0,000	-	-	-	28
7. Valencia		0,000	1,000	0,000	0,000	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	0,983	0,017	0,000	-	-	-	29
1. Santander	86	0,000	0,100	0,900	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,000	0,250	0,750	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,000	0,133	0,867	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,016	0,217	0,767	-	-	-	-	30
5. Aguilas		0,000	0,117	0,883	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	0,033	0,967	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,000	0,083	0,917	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,000	0,100	0,900	-	-	-	-	30
1. Santander	87	0,914	0,086	-	-	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,922	0,078	-	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,983	0,017	-	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,933	0,067	-	-	-	-	-	30
5. Aguilas		0,900	0,100	-	-	-	-	-	30
6. Cullera		0,967	0,033	-	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,883	0,117	-	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,883	0,117	-	-	-	-	-	30
1. Santander	88	0,018	0,130	0,852	0,000	-	-	-	27
2. Ribadeo		0,000	0,062	0,922	0,016	-	-	-	32
3. Sintra		0,034	0,155	0,759	0,052	-	-	-	29
4. Marbella		0,058	0,096	0,788	0,058	-	-	-	26
5. Aguilas		0,050	0,150	0,767	0,033	-	-	-	30
6. Cullera		0,000	0,217	0,761	0,022	-	-	-	23
7. Valencia		0,066	0,167	0,767	0,000	-	-	-	30
8. Vilanova		0,020	0,080	0,900	0,000	-	-	-	25
1. Santander	110	0,411	0,589	-	-	-	-	-	28
2. Ribadeo		0,437	0,563	-	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,500	0,500	-	-	-	-	-	23
4. Marbella		0,425	0,575	-	-	-	-	-	20
5. Aguilas		0,250	0,750	-	-	-	-	-	22
6. Cullera		0,159	0,841	-	-	-	-	-	22
7. Valencia		0,250	0,750	-	-	-	-	-	30
8. Vilanova		0,212	0,788	-	-	-	-	-	26

RESULTADOS

Tabla 8.- continuación

1. Santander	126	0,000	0,444	0,537	0,019	-	-	-	27
2. Ribadeo		0,000	0,453	0,547	0,000	-	-	-	32
3. Sintra		0,017	0,450	0,533	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,339	0,661	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,000	0,483	0,517	0,000	-	-	-	29
6. Cullera		0,000	0,273	0,727	0,000	-	-	-	22
7. Valencia		0,000	0,056	0,944	0,000	-	-	-	9
8. Vilanova		0,000	0,421	0,579	0,000	-	-	-	19
1. Santander	127	0,034	0,621	0,345	0,000	-	-	-	29
2. Ribadeo		0,000	0,641	0,344	0,015	-	-	-	32
3. Sintra		0,017	0,600	0,383	0,000	-	-	-	30
4. Marbella		0,018	0,679	0,303	0,000	-	-	-	28
5. Aguilas		0,000	0,583	0,417	0,000	-	-	-	30
6. Cullera		0,018	0,553	0,393	0,036	-	-	-	28
7. Valencia		0,000	0,586	0,414	0,000	-	-	-	29
8. Vilanova		0,000	0,535	0,448	0,017	-	-	-	29
1. Santander	130	0,000	0,979	0,021	-	-	-	-	24
2. Ribadeo		0,000	0,953	0,047	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,033	0,950	0,017	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,000	0,978	0,022	-	-	-	-	23
5. Aguilas		0,021	0,875	0,104	-	-	-	-	24
6. Cullera		0,000	0,857	0,143	-	-	-	-	14
7. Valencia		0,000	0,786	0,214	-	-	-	-	7
8. Vilanova		0,000	0,958	0,042	-	-	-	-	12
1. Santander	134	0,950	0,050	0,000	-	-	-	-	30
2. Ribadeo		0,937	0,047	0,016	-	-	-	-	32
3. Sintra		0,950	0,050	0,000	-	-	-	-	30
4. Marbella		0,911	0,089	0,000	-	-	-	-	28
5. Aguilas		0,966	0,034	0,000	-	-	-	-	29
6. Cullera		0,950	0,050	0,000	-	-	-	-	30
7. Valencia		0,964	0,036	0,000	-	-	-	-	28
8. Vilanova		0,950	0,050	0,000	-	-	-	-	30

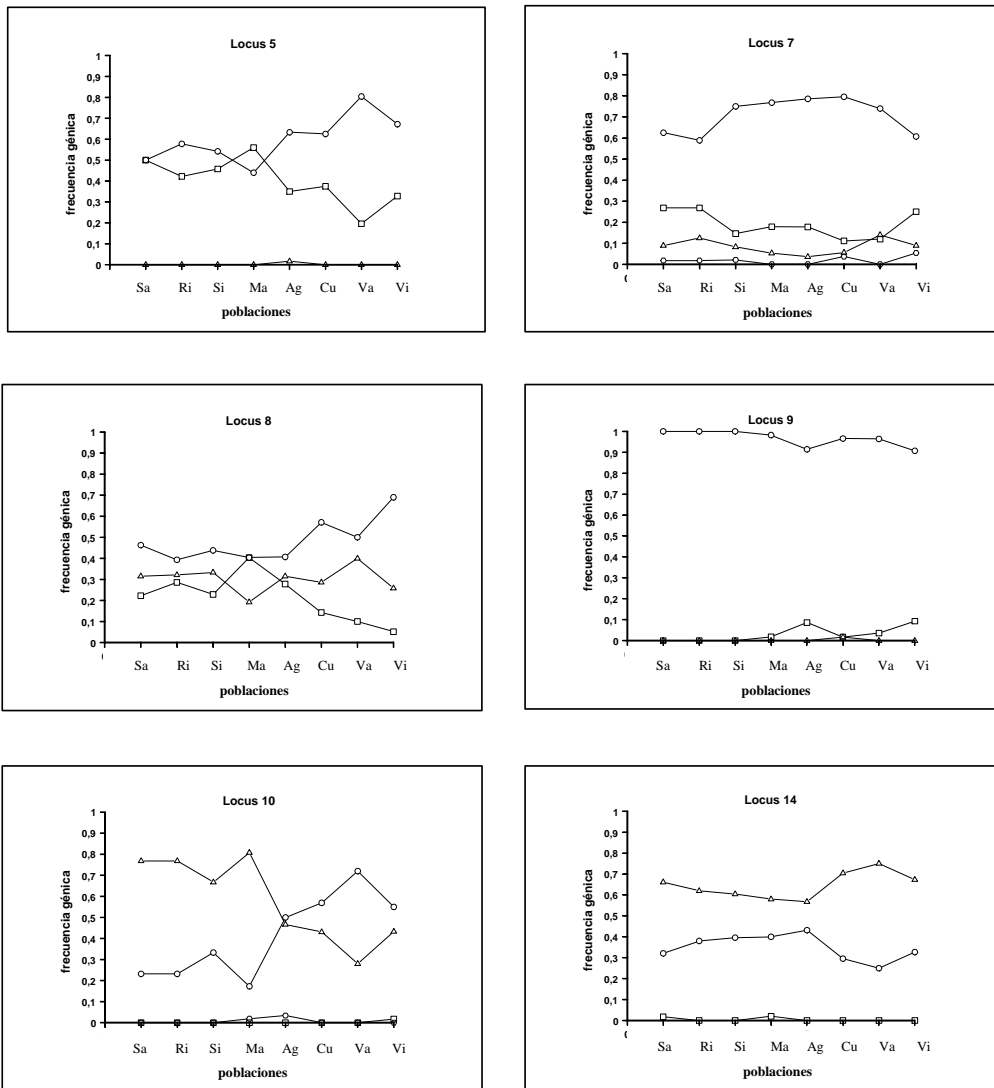


Figura 15.- Variación geográfica de las frecuencias alélicas de 38 loci de 2-DE en poblaciones de mejillón de la Península Ibérica (Sa: Santander, Ri: Ribadeo, Si: Sintra, Ma: Marbella, Ag: Aguilas, Cu: Cullera, Va: Valencia, Vi: Vilanova i la Geltrú).

Figura 15.- continuación

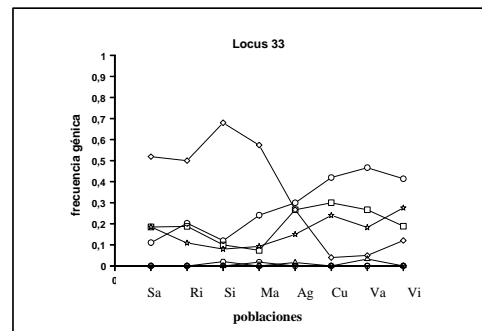
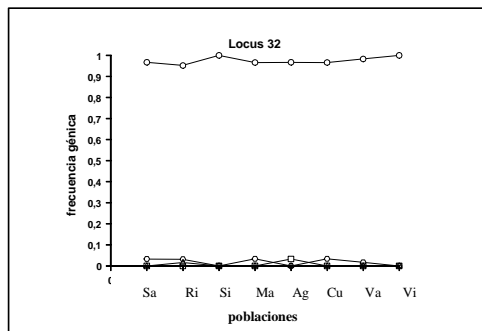
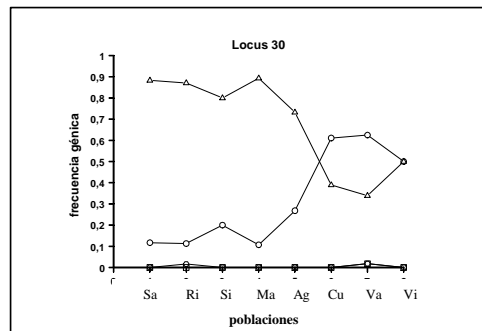
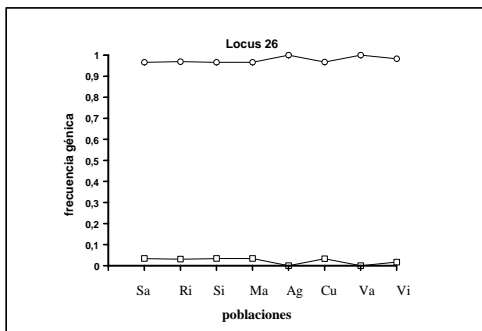
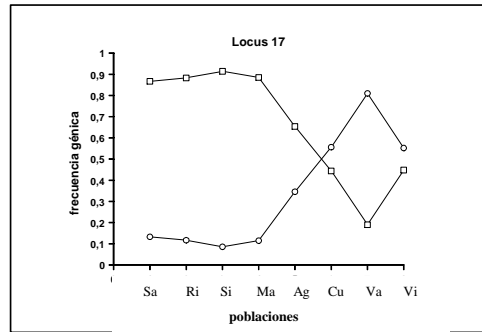
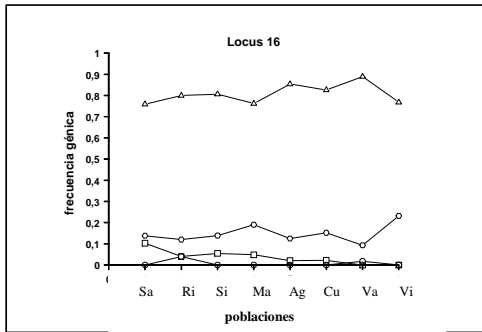


Figura 15.- continuación

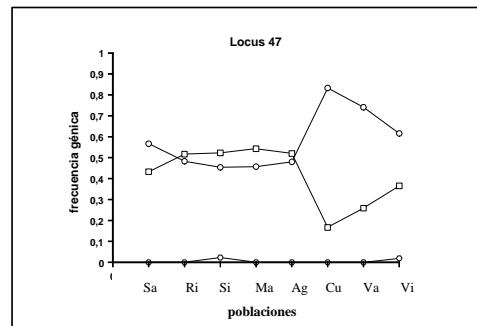
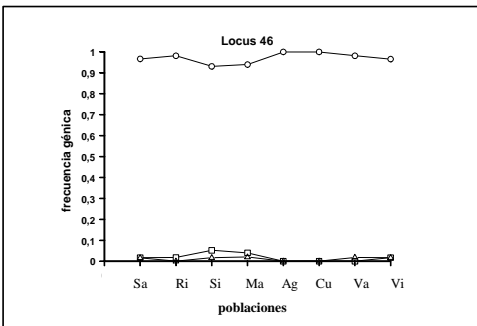
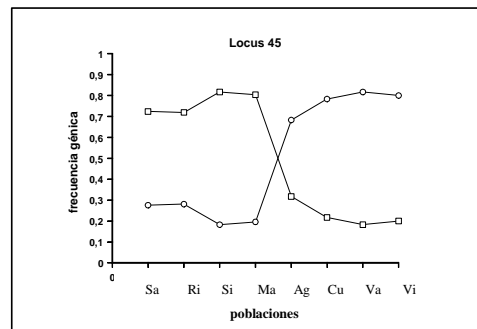
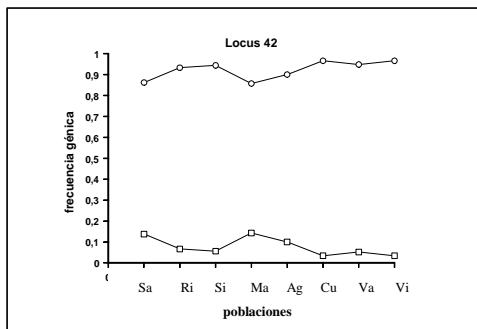
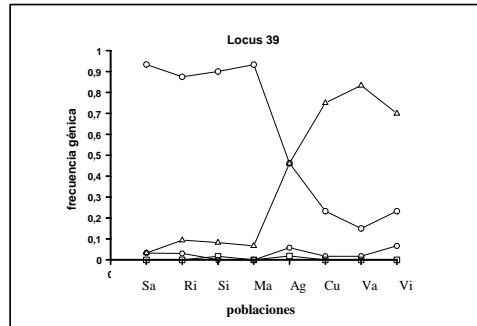
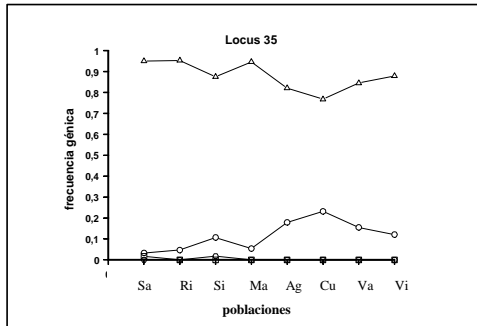


Figura 15.- continuación

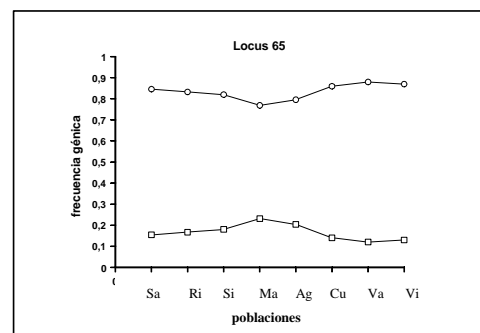
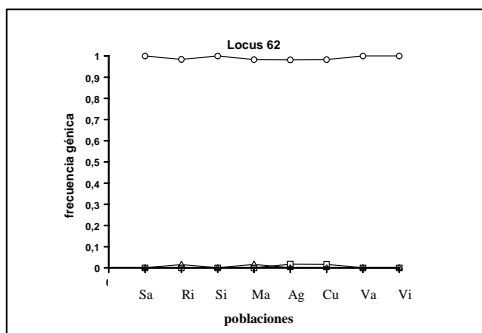
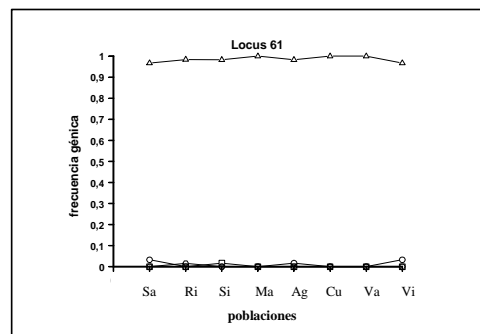
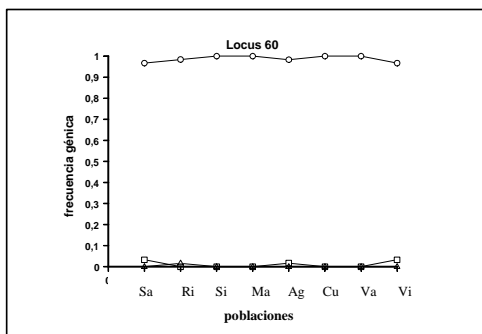
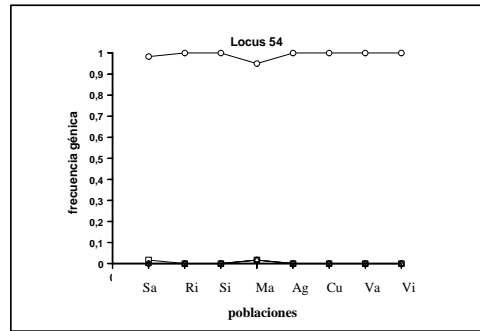
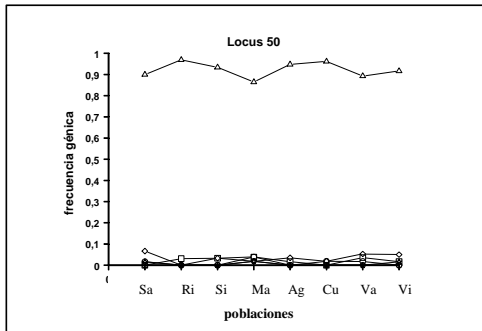


Figura 15.- continuación

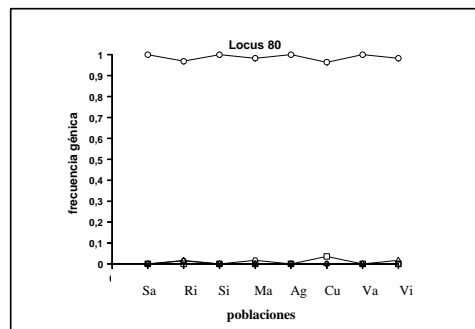
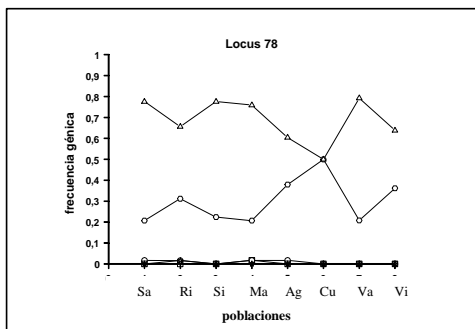
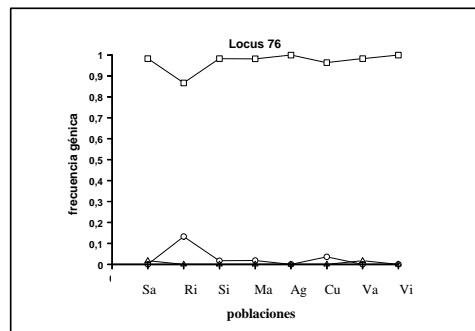
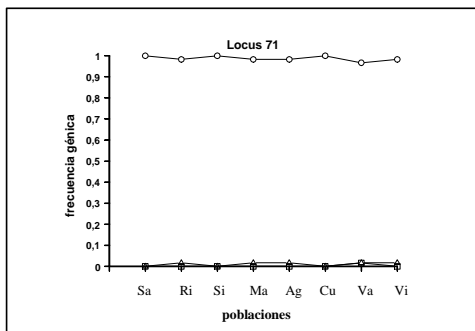
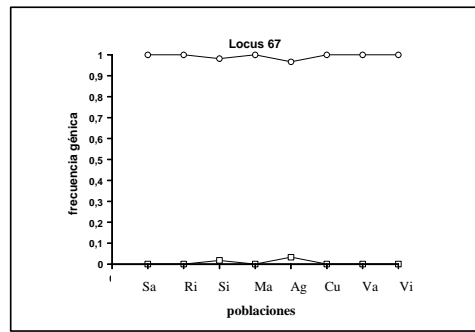
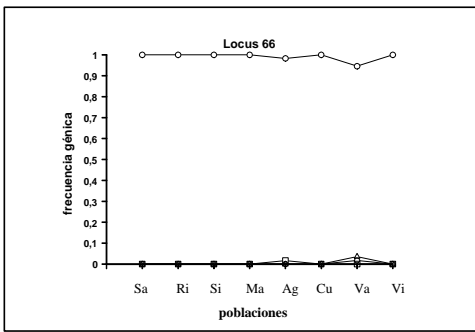


Figura 15.- continuación

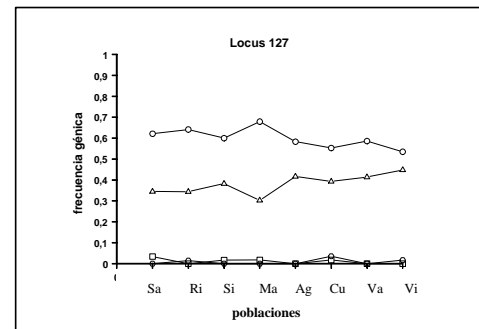
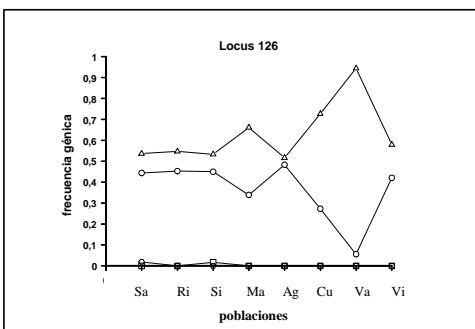
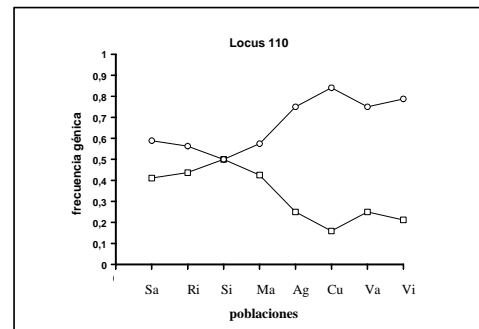
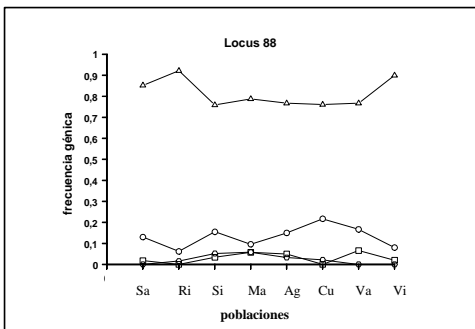
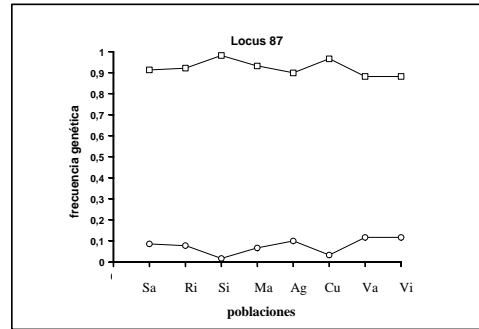
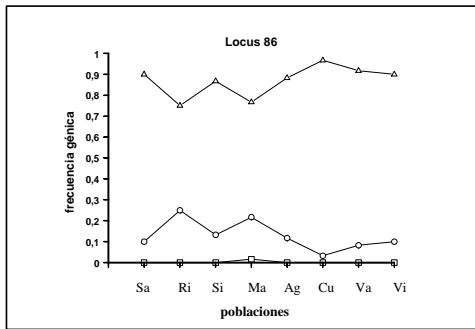
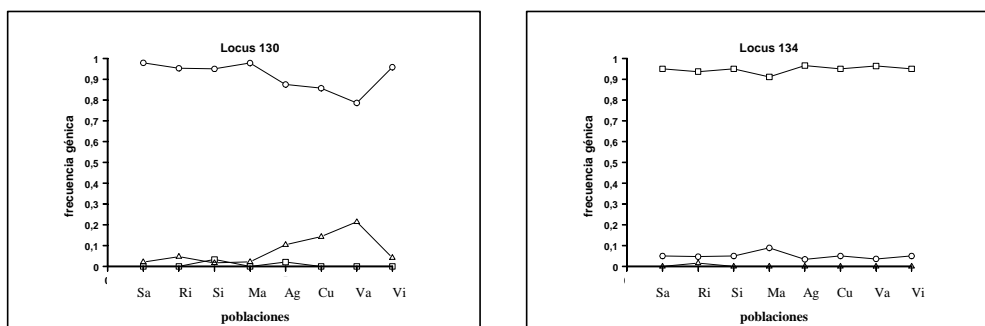


Figura 15.- continuación



Para comprobar si existen en algún *locus* diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las frecuencias génicas de las poblaciones de ambas regiones (atlántica y mediterránea) se empleó el test t (t de Student). Éste, asume que los datos siguen una distribución normal y que las varianzas de las muestras que se comparan son homogéneas. Para que ambas condiciones se cumplan se ha empleado la transformación $\arcsin\sqrt{p}$, aplicando por tanto el test t al arco-seno de la raíz cuadrada de las frecuencias génicas. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en 14 *loci* que se muestran en la tabla 9 junto con las probabilidades asociadas al test t correspondientes a cada alelo. En la mayor parte de los casos, las diferencias significativas se encuentran asociadas a alelos frecuentes, excepto en el *locus* 46, en el que la probabilidad significativa aparece asociada al alelo 1, que es un alelo raro. Los resultados del test t coinciden, en líneas generales, con lo observado en las distribuciones de frecuencias génicas.

Tabla 9.- Loci que mostraron diferencias estadísticamente significativas en las medias de sus frecuencias alélicas entre las regiones atlántica y mediterránea según el test t (se empleó la transformación arco-seno de la raíz cuadrada de las frecuencias alélicas). Se indican los valores de probabilidad del test.

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
5	0,0156	0,0191	0,3559				
9	0,0109	0,0042	0,3559				
10	0,3559	0,0012	0,0006	0,8452			
16	0,0144	0,7920	0,1125	0,9713			
17	0,0023	0,0023					
30	0,3559	0,0038	0,0046	0,9680			
33	0,0235	0,0033	0,1443	0,0368	0,3559	0,0010	0,3559
35	0,3559	0,0064	0,0115	0,3559			
39	0,9698	0,0001	0,0002	0,1565			
45	0,00002	0,00002					
46	0,0136	0,0634	0,5340				
110	0,0003	0,0003					
127	0,1789	0,0147	0,0100	0,4166			
130	0,8785	0,0287	0,0204				

Las estimas de heterozigosis esperada para cada *locus*, así como sus valores medios por *locus* y por población, se muestran en la tabla 10. Los valores medios de heterozigosis por *locus* son muy heterogéneos, variando entre $0,013 \pm 0,009$ (*locus* 67) y $0,663 \pm 0,026$ (*locus* 33). Muestran una distribución en la que la mayor parte de los valores se concentran en el intervalo 0 – 0,05, siendo menos numerosos en intervalos mayores (véase figura 16).

Tabla 10.- Estimaciones de la heterocigosis esperada por locus en cada una de las muestras de *Mytilus galloprovincialis* analizadas. También se muestran los valores medios por locus y por población, así como el número medio de alelos por locus (A).

Locus	Santander	Ribadeo	Sintra	Marbella	Aguilas	Cullera	Valencia	Vilanova	Media
5	0,510	0,496	0,507	0,503	0,484	0,477	0,321	0,448	0,468 ± 0,022
7	0,539	0,575	0,418	0,382	0,356	0,356	0,427	0,568	0,453 ± 0,033
8	0,649	0,673	0,659	0,649	0,670	0,582	0,592	0,463	0,617 ± 0,025
9	0,000	0,000	0,000	0,036	0,160	0,068	0,070	0,171	0,063 ± 0,025
10	0,363	0,363	0,454	0,324	0,541	0,499	0,411	0,518	0,434 ± 0,029
14	0,468	0,481	0,488	0,513	0,502	0,425	0,382	0,449	0,464 ± 0,015
16	0,402	0,349	0,338	0,390	0,260	0,300	0,205	0,363	0,326 ± 0,024
17	0,235	0,210	0,160	0,208	0,462	0,503	0,313	0,503	0,324 ± 0,051
26	0,068	0,062	0,068	0,068	0,000	0,066	0,000	0,033	0,046 ± 0,011
30	0,210	0,232	0,325	0,195	0,399	0,484	0,503	0,509	0,357 ± 0,048
32	0,066	0,095	0,000	0,068	0,066	0,068	0,034	0,000	0,050 ± 0,012
33	0,662	0,672	0,517	0,609	0,758	0,688	0,685	0,714	0,663 ± 0,026
35	0,098	0,091	0,227	0,103	0,299	0,363	0,267	0,216	0,208 ± 0,036
39	0,129	0,228	0,186	0,127	0,581	0,389	0,288	0,459	0,298 ± 0,058
42	0,242	0,127	0,107	0,249	0,183	0,068	0,100	0,068	0,143 ± 0,026
45	0,407	0,411	0,305	0,321	0,440	0,345	0,305	0,325	0,357 ± 0,019
46	0,066	0,036	0,132	0,117	0,000	0,000	0,036	0,068	0,057 ± 0,017
47	0,499	0,508	0,532	0,507	0,509	0,283	0,390	0,497	0,466 ± 0,030
50	0,188	0,062	0,129	0,252	0,101	0,076	0,202	0,159	0,146 ± 0,023
54	0,033	0,000	0,000	0,098	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016 ± 0,012
60	0,066	0,031	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,066	0,025 ± 0,010
61	0,066	0,031	0,033	0,000	0,033	0,000	0,000	0,066	0,029 ± 0,010
62	0,000	0,031	0,000	0,033	0,036	0,033	0,000	0,000	0,017 ± 0,006
65	0,265	0,282	0,301	0,362	0,331	0,246	0,216	0,230	0,279 ± 0,018
66	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,105	0,000	0,017 ± 0,013
67	0,000	0,000	0,036	0,000	0,066	0,000	0,000	0,000	0,013 ± 0,009
71	0,000	0,033	0,000	0,033	0,033	0,000	0,066	0,033	0,025 ± 0,008
76	0,033	0,235	0,034	0,036	0,000	0,070	0,033	0,000	0,055 ± 0,027
78	0,361	0,479	0,354	0,388	0,500	0,509	0,337	0,470	0,425 ± 0,025
80	0,000	0,062	0,000	0,033	0,000	0,070	0,000	0,034	0,025 ± 0,010
86	0,183	0,381	0,235	0,371	0,210	0,066	0,155	0,183	0,223 ± 0,038
87	0,160	0,146	0,033	0,127	0,183	0,066	0,210	0,210	0,142 ± 0,023
88	0,262	0,148	0,404	0,370	0,393	0,382	0,386	0,187	0,317 ± 0,036
110	0,493	0,500	0,511	0,501	0,384	0,274	0,381	0,340	0,423 ± 0,032
126	0,523	0,503	0,521	0,456	0,508	0,406	0,111	0,501	0,441 ± 0,049
127	0,503	0,479	0,501	0,455	0,494	0,547	0,494	0,522	0,499 ± 0,010
130	0,042	0,091	0,098	0,043	0,228	0,254	0,363	0,083	0,150 ± 0,041
134	0,097	0,121	0,097	0,166	0,068	0,097	0,070	0,097	0,102 ± 0,011
Media	0,234 ± 0,037	0,243 ± 0,036	0,229 ± 0,038	0,239 ± 0,034	0,271 ± 0,039	0,238 ± 0,038	0,223 ± 0,034	0,251 ± 0,038	
A	2,263 ± 0,134	2,316 ± 0,131	2,237 ± 0,153	2,447 ± 0,172	2,263 ± 0,140	2,132 ± 0,132	2,184 ± 0,145	2,184 ± 0,130	

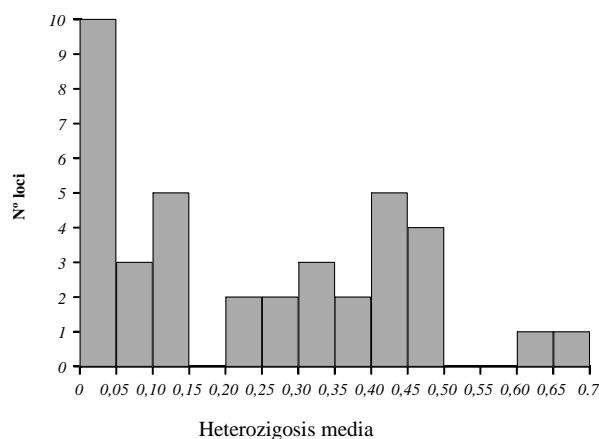


Figura 16.- Distribución de las estimas de heterozigosis media por locus en las ocho poblaciones de mejillón analizadas.

Todos los *loci* excepto 4 son, en base a los valores medios de todas las poblaciones, polimórficos bajo el criterio del 99%. Los 4 *loci* que no lo son, esto es, los *loci* 54, 62, 66 y 67, son monomórficos en varias poblaciones. Los valores medios de heterozigosis por población son en cambio muy homogéneos a lo largo de toda el área estudiada, registrándose valores ligeramente más elevados en Águilas y Vilanova i la Geltrú, las únicas poblaciones que se muestrearon en el fondo marino. Este resultado es coherente con el estudio realizado por Levinton y Koehn (1976) en el que detectaron la existencia de una correlación negativa entre el nivel mareal en el que viven los mejillones y su nivel de heterozigosis. También se indican el número medio de alelos por *locus* en cada población analizada, que osciló entre $2,132 \pm 0,132$ (Cullera) y $2,447 \pm 0,172$ (Marbella), siendo también muy similar en las ocho poblaciones.

3.3.- DISTANCIA GENÉTICA Y FILOGENIA

El grado de divergencia genética entre las ocho poblaciones de mejillón analizadas se estimó mediante las medidas de distancia D , D_A y D_θ (véase Material y Métodos) cuyos valores obtenidos a partir del estudio de 38 *loci* de 2-DE se muestran en la tabla 11.

Tabla 11.- Estimaciones de distancia genética entre 8 poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica. En la primera línea se muestra la distancia estándar de Nei, en la segunda D_A y en la tercera D_θ .

	Santander	Ribadeo	Sintra	Marbella	Aguilas	Cullera	Valencia	Vilanova
Santander								
Ribadeo	0,0000 0,0118 0,0000							
Sintra	0,0000 0,0105 0,0000	0,0000 0,0115 0,0000						
Marbella	0,0000 0,0102 0,0000	0,0000 0,0113 0,0000	0,0000 0,0103 0,0000					
Aguilas	0,0141 0,0229 0,0581	0,0118 0,0228 0,0505	0,0148 0,0221 0,0622	0,0190 0,0252 0,0713				
Cullera	0,0544 0,0408 0,1731	0,0539 0,0390 0,1682	0,0581 0,0419 0,1862	0,0647 0,0469 0,1976	0,0065 0,0183 0,0370			
Valencia	0,0772 0,0530 0,2380	0,0766 0,0521 0,2312	0,0796 0,0545 0,2489	0,0875 0,0578 0,2618	0,0211 0,0240 0,0801	0,0000 0,0144 0,0175		
Vilanova	0,0412 0,0333 0,1347	0,0402 0,0341 0,1289	0,0462 0,0365 0,1504	0,0527 0,0413 0,1628	0,0000 0,0135 0,0186	0,0000 0,0117 0,0057	0,0033 0,0156 0,0309	

Estos valores oscilan entre 0,0000 y 0,0875, 0,0102 y 0,0578 y 0,0000 y 0,2618 para D , D_A y D_θ , respectivamente, con valores medios de $0,0294 \pm 2 \times 10^{-7}$, $0,0281 \pm 1 \times 10^{-8}$ y $0,0969 \pm 1 \times 10^{-5}$. En la tabla de distancias mostrada también se puede observar que las estimas más bajas son aquellas obtenidas a partir de parejas de muestras procedentes de la región atlántica. Las estimas de D en esta zona son negativas debido a error de muestreo, aunque se han transformado a cero para posibilitar la creación de dendrogramas (Nei, 1978), mientras que las estimas de D_A oscilan entre 0,0102 y 0,0118 con un valor medio de $0,0109 \pm 9 \times 10^{-14}$, siendo el valor de D_θ 0,0000 en todos los casos. Aunque entre las poblaciones de la región mediterránea se observa un grado de divergencia mayor que entre las poblaciones de la región atlántica, sigue tratándose de estimas bajas, que oscilan entre 0,0000 y 0,0211 (valor medio $0,0052 \pm 2 \times 10^{-9}$), 0,0117 y 0,0240 (valor medio $0,0163 \pm 2 \times 10^{-10}$) y 0,0057 y 0,0801 (valor medio $0,0316 \pm 2 \times 10^{-7}$) para D , D_A y D_θ , respectivamente. La mayor parte de la divergencia genética observada se encuentra por tanto entre las poblaciones de la región atlántica y las de la región mediterránea, cuyos valores de D oscilan entre 0,0118 y 0,0875, con valores medios de $0,0495 \pm 9 \times 10^{-8}$. Los valores de D_A y D_θ para estas parejas de poblaciones varían entre 0,0221 y 0,0578 (valor medio $0,0390 \pm 5 \times 10^{-9}$) y 0,0505 y 0,2618 (valor medio $0,1577 \pm 6 \times 10^{-6}$) respectivamente. El test U de Mann-Whitney indica que las diferencias observadas entre los promedios de las distancias entre poblaciones de la misma región (atlántica o mediterránea) y los promedios de las distancias entre poblaciones de distintas regiones son significativas al 0,1%. Un patrón muy similar se observó a partir de datos de 9 alozimas analizados en 21 poblaciones de mejillón de toda la

costa de la Península Ibérica, aunque con valores medios de distancia ligeramente inferiores (Quesada, 1992; Quesada et al., 1995a). Este es un dato llamativo, ya que la electroforesis bidimensional y la electroforesis de alozimas se han empleado con anterioridad en varios estudios de especies animales en los que las estimas de distancias evolutivas obtenidas mediante 2-DE, aunque proporcionales a las obtenidas mediante electroforesis de alozimas, siempre eran inferiores a ellas (Janczewski et al., 1990).

A partir de los datos de distancias genéticas, se construyeron árboles filogenéticos mediante los métodos UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y NJ (Saitou y Nei 1987) que se muestran en las figuras 17 y 18. Los árboles obtenidos mediante UPGMA a partir de los tres estimadores de distancia (D , D_A y D_θ) muestran resultados similares, pudiendo diferenciarse dos grandes grupos: el primero muy homogéneo y con una significación estadística según el método bootstrap muy elevada incluye a las poblaciones de la región atlántica; el segundo, menos homogéneo, incluye a las poblaciones del Mediterráneo y en él, la población de Águilas parece ser la más divergente. Las más similares son Cullera y Vilanova i la Geltrú, ocupando la población de Valencia una posición intermedia entre Águilas y éstas dos últimas. Mediante el método NJ, se obtienen resultados similares, observándose dos grandes grupos, aunque en este caso, la población de Águilas, se agrupa con las poblaciones del Atlántico. Las longitudes de las ramas del árbol filogenético ponen de manifiesto una mayor divergencia entre las poblaciones de la región mediterránea que entre las poblaciones de la región atlántica.

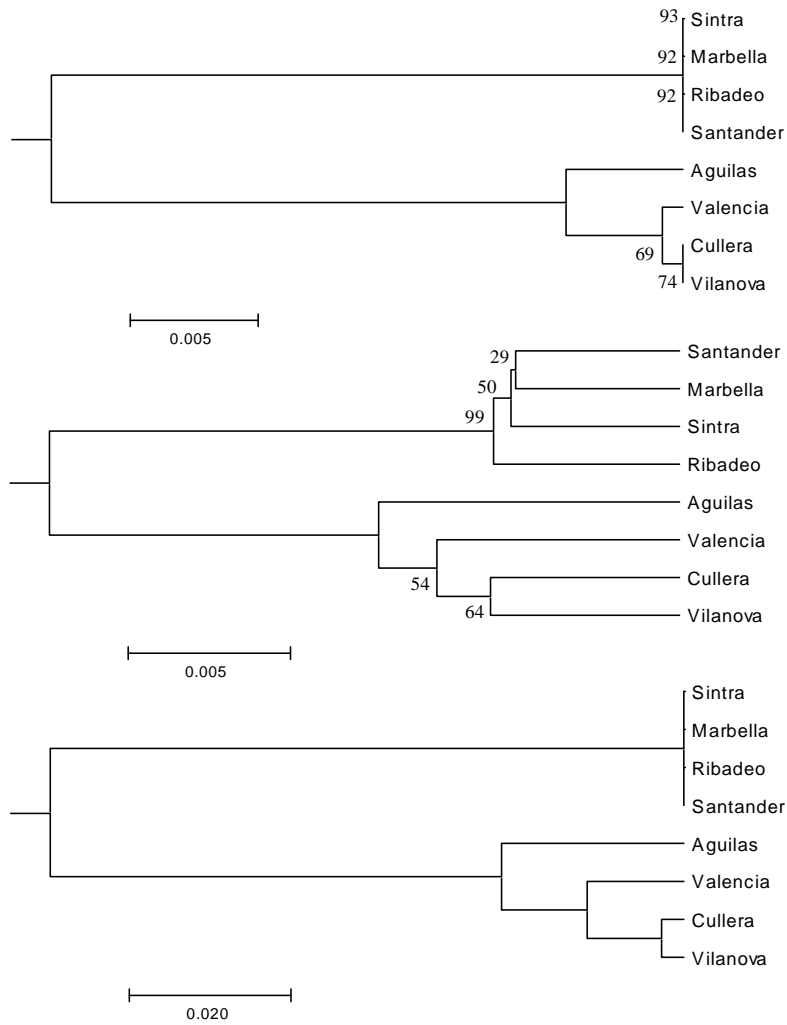


Figura 17.- Árboles filogenéticos obtenidos mediante el método UPGMA a partir de las estimas de distancia genética D , D_A y D_θ (de arriba abajo) para 8 poblaciones y 38 loci. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap.

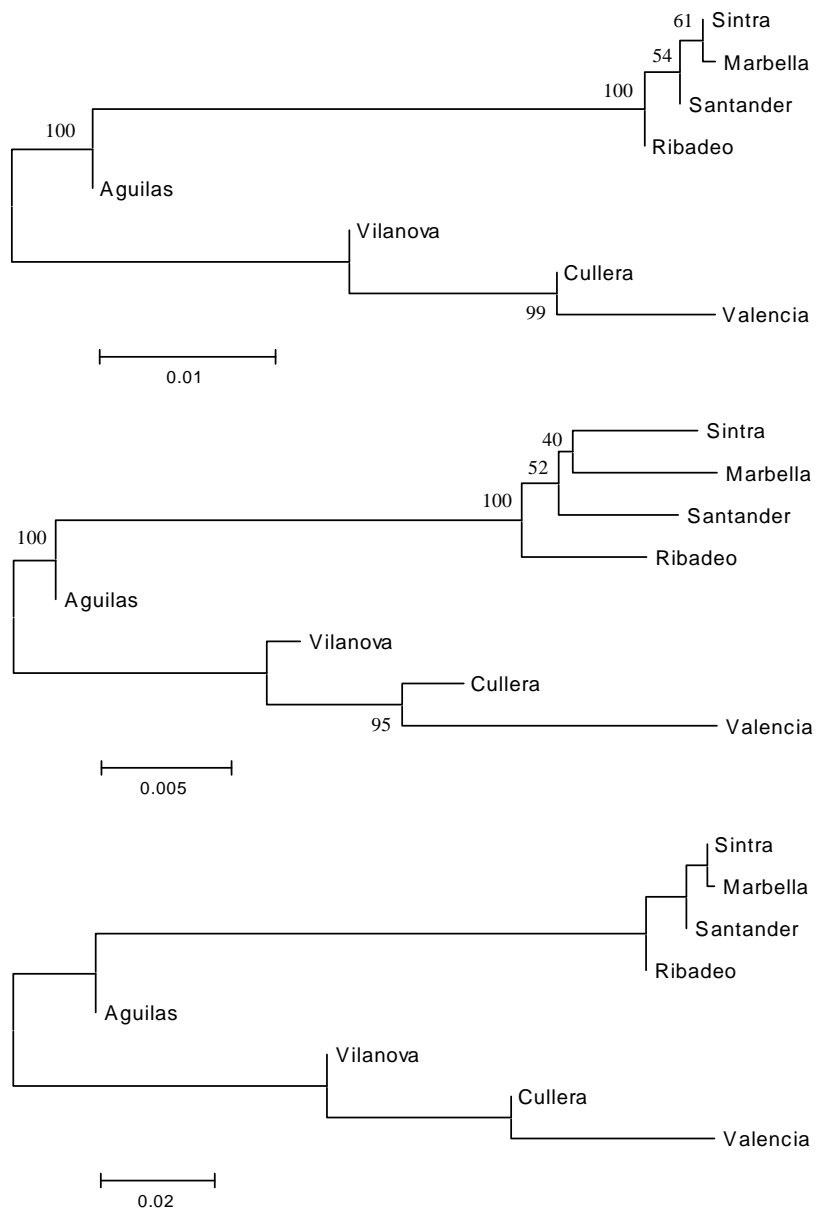


Figura 18.- Árbol filogenético obtenido por el método NJ a partir de las estimas de distancia genética D , D_A y D_θ (de arriba a abajo) para 8 poblaciones y 38 loci. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap.

3.4.- AJUSTE A LAS PROPORCIONES HARDY-WEINBERG

En la tabla 12 se indica la magnitud de las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg para 38 *loci* de 2-DE en las ocho poblaciones de mejillón analizadas según los estadísticos f_C y f_T . Al final de la tabla se indican los valores medios de f_T y f_C para cada población. En general los valores medios varían entre $f_C = -0,025 \pm 0,034$; $f_T = -0,015 \pm 0,032$ (población de Sintra) y $f_C = 0,048 \pm 0,023$; $f_T = 0,043 \pm 0,021$ (población de Santander), siendo de signo positivo en la mayor parte de los casos (excepto en Sintra y Vilanova i la Geltrú).

También se muestra la significación estadística de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg mediante el test de probabilidad exacta y el test asociado al estadístico f_T .

Las frecuencias genotípicas se encuentran en líneas generales en concordancia con las proporciones esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg, aunque se detectan desviaciones significativas en *loci* específicos. Es el caso de los *loci* 8 (población de Ribadeo, $f_T = +0,314$, $P < 0,05$; test exacto: $P = 0,104$ y población de Valencia, $f_T = +0,317$, $P < 0,05$; $P = 0,009$), 14 (población de Ribadeo, $f_T = +0,435$, $P < 0,05$ $P = 0,082$), 16 (población de Santander, $f_T = +0,265$, $P < 0,05$; $P = 0,013$), 33 (población de Ribadeo, $f_T = +0,250$, $P < 0,05$; $P = 0,020$, población de Marbella, $f_T = +0,250$, $P < 0,01$; $P = 0,061$ y población de Cullera, $f_T = +0,227$, $P < 0,05$; $P = 0,138$), 35 (población de Valencia, $f_T = +0,366$, $P < 0,05$; $P = 0,106$), 45 (población de Sintra, $f_T = +0,695$, $P < 0,001$; $P = 0,002$), 87 (población de Santander, $f_T = +0,367$, $P < 0,05$; $P = 0,171$), 110

(población de Ribadeo, $f_T = -0,387$, $P < 0,05$; $P = 0,039$ y población de Marbella, $f_T = +0,528$, $P < 0,05$; $P = 0,032$) y 127 (población de Valencia, $f_T = +0,602$, $P < 0,01$; $P = 0,002$). Como se puede observar, en todos los casos menos en uno, las desviaciones significativas están asociadas a defectos de heterocigotos, fenómeno detectado comúnmente en varias especies de moluscos marinos, y que ya se describió para marcadores alozímicos en *Mytilus galloprovincialis* con anterioridad a este trabajo (Sanjuan et al., 1990, 1994; Raymond et al., 1997).

Los valores medios de f_C y f_T por locus muestran valores especialmente elevados en los loci 7 ($f_C = 0,122 \pm 0,068$; $f_T = 0,125 \pm 0,069$), 33 ($f_C = 0,143 \pm 0,052$; $f_T = 0,124 \pm 0,046$), 35 ($f_C = 0,125 \pm 0,054$; $f_T = 0,119 \pm 0,053$) y 47 ($f_C = 0,136 \pm 0,031$; $f_T = 0,115 \pm 0,028$), coincidiendo algunos de estos loci (33 y 35) con loci en los que se detectó una diferencia estadísticamente significativa en las medias de las frecuencias de sus alelos entre las regiones atlántica y mediterránea según el test t (tabla 9).

En la figura 19 se representan las distribuciones de los valores medios de f_T por locus en todas las poblaciones analizadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las de la región mediterránea.

Tabla 12.- Estimaciones de las desviaciones de las proporciones Hardy Weinberg para 38 loci según los valores de los estadísticos f_C (primera línea) y f_T (segunda línea), se señalan con asteriscos los casos significativos) y probabilidad del test exacto (tercera línea, entre paréntesis).

Población	Locus													
	5	7	8	9	10	14	16	17	26	30	32	33	35	
Santander	-0,057 -0,059 (1)	-0,061 -0,062 (0,652)	0,031 0,019 (1,000)	Un alelo (-)	0,116 0,119 (0,604)	-0,069 -0,047 (0,455)	0,231 0,265* (0,013)	0,151 0,154 (0,414)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,115 -0,117 (1,000)	-0,018 -0,018 (1,000)	0,164 0,191 (0,490)	-0,024 -0,010 (1)	
	-0,202 -0,205 (0,297)	-0,056 -0,070 (0,626)	0,314 0,314* (0,104)	Un alelo (-)	0,116 0,119 (0,604)	0,423 0,435* (0,082)	0,318 0,197 (0,111)	0,208 0,212 (0,325)	-0,016 -0,017 (1,000)	-0,114 -0,059 (1,000)	-0,023 -0,009 (1,000)	0,259 0,250* (0,020)	-0,033 -0,034 (1,000)	
	0,182 0,186 (0,433)	0,002 0,024 (0,670)	-0,077 -0,059 (0,540)	Un alelo (-)	-0,293 -0,298 (0,200)	-0,112 -0,114 (0,683)	-0,155 -0,095 (1,000)	-0,077 -0,078 (1,000)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,234 -0,237 (0,560)	Un alelo (-)	-0,086 -0,069 (0,878)	0,215 0,136 (0,347)	
Marbella	0,208 0,213 (0,420)	0,067 0,014 (0,610)	-0,068 -0,101 (0,415)	0,000 0,000 (-)	0,050 0,036 (1,000)	0,225 0,118 (0,279)	-0,227 -0,135 (0,714)	0,265 0,271 (0,276)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,102 -0,104 (1,000)	-0,018 -0,019 (1,000)	0,274 0,250** (0,061)	-0,039 -0,039 (1,000)	
	-0,103 -0,052 (0,805)	0,200 0,130 (0,219)	0,230 0,253 (0,207)	-0,077 -0,078 (1,000)	0,175 0,091 (0,296)	-0,370 -0,375 (0,186)	-0,126 -0,066 (1,000)	0,338 0,347 (0,104)	Un alelo (-)	0,198 0,202 (0,349)	-0,018 -0,018 (1,000)	0,211 0,159 (0,363)	0,286 0,293 (0,176)	
	0,028 0,028 (1,000)	0,064 0,061 (0,573)	0,044 0,045 (0,460)	-0,009 -0,003 (1,000)	0,103 0,106 (0,709)	0,130 0,133 (0,646)	-0,162 -0,085 (1,000)	0,268 0,274 (0,243)	-0,018 -0,018 (1,000)	0,006 0,006 (1,000)	0,006 0,006 (1,000)	0,307 0,227* (0,138)	0,116 0,119 (0,604)	
Valencia	0,225 0,231 (0,253)	-0,031 -0,103 (0,686)	0,055 0,317* (0,009)	-0,019 -0,019 (1,000)	-0,171 -0,174 (0,625)	-0,109 -0,111 (1,000)	0,280 0,181 (0,267)	-0,217 -0,220 (0,550)	Un alelo (-)	0,005 -0,0004 (0,754)	0,000 0,000 (-)	0,028 0,014 (0,595)	0,358 0,366* (0,106)	
	0,315 0,319 (0,198)	-0,006 -0,053 (0,696)	-0,120 -0,092 (0,844)	-0,083 -0,085 (1,000)	-0,359 -0,189 (0,061)	0,058 0,059 (1,000)	-0,084 -0,085 (1,000)	0,042 0,042 (1,000)	0,000 0,000 (-)	-0,017 -0,017 (1,000)	Un alelo (-)	-0,014 -0,028 (0,103)	0,120 0,122 (1,000)	
	0,075 ±0,065	0,022 ±0,031	0,051 ±0,054	-0,038 ±0,018	-0,033 ±0,074	0,022 ±0,086	0,009 ±0,080	0,122 ±0,068	-0,015 ±0,003	-0,047 ±0,045	-0,016 ±0,003	-0,016 ±0,003	0,143 ±0,052	0,125 ±0,054
f_T medio	0,083 ±0,064	-0,007 ±0,028	0,087 ±0,064	-0,037 ±0,019	-0,024 ±0,060	0,012 ±0,084	0,022 ±0,057	0,125 ±0,069	-0,015 ±0,003	-0,041 ±0,045	-0,014 ±0,003	0,124 ±0,046	0,119 ±0,053	

Tabla 12.- continuación

Población	Locus													
	39	42	45	46	47	50	54	60	61	62	65	66	67	
Santander	-0,036 0,019 (1,000)	0,147 0,150 (0,427)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,009 -0,0003 (1,000)	0,067 0,068 (1,000)	0,295 0,162 (0,241)	0,000 0,000 (-)	-0,018 -0,018 (1,000)	-0,018 -0,018 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	-0,163 -0,166 (1,000)	Un alelo (-)	Un alelo (-)
	Ribadeo	0,181 0,131 (0,392)	-0,055 -0,055 (1,000)	0,242 0,247 (0,204)	0,000 0,000 (-)	0,226 0,229 (0,278)	-0,016 -0,017 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	0,296 0,502 (0,155)	Un alelo (-)	Un alelo (-)
Sintra		-0,077 -0,039 (1,000)	-0,040 -0,041 (1,000)	0,675 0,695*** (0,002)	-0,042 -0,020 (1,000)	0,235 0,131 (0,289)	-0,036 -0,019 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	-0,200 -0,203 (0,558)	Un alelo (-)	Un alelo 0,000 0,000 (-)
	Marbella	-0,055 -0,055 (1,000)	0,143 0,146 (0,440)	0,227 0,231 (0,549)	-0,029 -0,012 (1,000)	0,233 0,239 (0,401)	-0,070 -0,012 (1,000)	-0,018 -0,001 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	-0,282 -0,286 (0,282)	Un alelo (-)	Un alelo (-)
Aguilas		0,276 0,105 (0,085)	-0,094 -0,096 (1,000)	0,016 0,016 (1,000)	Un alelo (-)	0,059 0,060 (1,000)	0,024 0,010 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	-0,009 -0,009 (1,000)	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)
	Cullera	0,059 0,038 (0,728)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,063 -0,064 (1,000)	Un alelo (-)	0,085 0,087 (0,549)	-0,010 -0,0004 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	-0,143 -0,145 (1,000)	Un alelo (-)	Un alelo (-)
Valencia		-0,162 -0,085 (1,000)	-0,037 -0,038 (1,000)	-0,208 -0,211 (0,551)	0,000 0,000 (-)	0,028 0,029 (1,000)	-0,062 -0,022 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	-0,116 -0,118 (1,000)	-0,025 -0,010 (1,000)	Un alelo (-)
	Vilanova	0,056 -0,031 (0,140)	-0,018 -0,019 (1,000)	-0,234 -0,237 (0,560)	-0,009 -0,0003 (1,000)	0,151 0,075 (0,393)	-0,047 -0,014 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	Un alelo 0,000 (-)	-0,130 -0,133 (1,000)	Un alelo (-)	Un alelo (-)
f_C medio		0,030 ± 0,051	0,004 ± 0,032	0,080 ± 0,105	-0,015 ± 0,007	0,136 ± 0,031	0,010 ± 0,042	-0,009 ± 0,009	-0,009 ± 0,005	-0,007 ± 0,004	-0,007 ± 0,004	0,000 ± 0,000	-0,093 ± 0,062	-0,013 ± 0,013
f_T medio	0,006 ± 0,028	0,004 ± 0,033	0,082 ± 0,108	-0,005 ± 0,004	0,115 ± 0,028	0,011 ± 0,022	-0,001 ± 0,001	-0,001 ± 0,005	-0,009 ± 0,005	-0,007 ± 0,004	0,000 ± 0,000	-0,095 ± 0,063	-0,005 ± 0,005	-0,009 ± 0,009

Tabla 12.- continuación

Población	Locus													Media
	71	76	78	80	86	87	88	110	126	127	130	134		
Santander	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,129 (-)	0,247 0,444 (-)	Un alelo 0,000 (-)	0,275 0,281 (-)	0,359 0,367* (-)	-0,134 -0,069 (1,000)	0,059 0,081 (1,000)	0,153 0,081 (0,439)	0,042 0,001 (0,219)	0,000 0,000 (-)	-0,036 -0,036 (1,000)	0,048 ± 0,023 0,043 ± 0,021	
Ribadeo	0,000 0,000 (-)	-0,137 -0,139 (1,000)	-0,112 -0,045 (0,506)	-0,008 -0,0003 (1,000)	0,016 0,016 (1,000)	-0,069 -0,070 (1,000)	-0,054 -0,027 (1,000)	-0,383 -0,387* (0,039)	-0,183 -0,185 (0,473)	0,087 0,040 (0,402)	-0,033 -0,034 (1,000)	-0,038 -0,018 (1,000)	0,034 ± 0,030 0,033 ± 0,028	
Sintra	Un alelo 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	-0,273 -0,276 (0,287)	Un alelo 0,000 (-)	0,151 0,154 (0,414)	0,000 0,000 (-)	-0,201 -0,090 (0,859)	0,066 0,067 (1,000)	-0,219 -0,118 (0,201)	-0,065 -0,032 (1,000)	-0,024 -0,010 (1,000)	-0,036 -0,036 (1,000)	-0,025 ± 0,034 -0,015 ± 0,032	
Marbella	0,000 0,000 (-)	0,000 0,000 (-)	-0,159 -0,075 (0,293)	0,000 0,000 (-)	0,104 0,063 (0,685)	-0,055 -0,055 (1,000)	-0,042 -0,055 (0,738)	0,508 0,528* (0,032)	-0,177 -0,180 (0,425)	-0,100 -0,049 (1,000)	0,000 0,000 (-)	-0,080 -0,081 (1,000)	0,023 ± 0,028 0,024 ± 0,026	
Aguilas	0,000 0,000 (-)	Un alelo 0,060 (-)	0,106 0,060 (0,811)	Un alelo 0,000 (-)	0,208 0,212 (0,325)	0,275 0,281 (0,241)	-0,106 -0,071 (0,276)	-0,068 -0,069 (1,000)	0,051 0,052 (1,000)	-0,149 -0,151 (0,472)	-0,100 -0,051 (1,000)	-0,018 -0,019 (1,000)	0,042 ± 0,027 0,036 ± 0,025	
Cullera	Un alelo 0,000 (-)	-0,019 -0,019 (1,000)	0,018 0,019 (1,000)	-0,019 -0,019 (1,000)	-0,018 -0,018 (1,000)	-0,018 -0,018 (1,000)	0,090 0,023 (0,254)	0,173 0,178 (0,430)	0,333 0,344 (0,270)	-0,045 -0,031 (0,234)	-0,130 -0,135 (1,000)	-0,036 -0,036 (1,000)	0,035 ± 0,021 0,034 ± 0,020	
Valencia	-0,009 -0,0003 (1,000)	0,000 0,000 (-)	0,011 0,011 (1,000)	Un alelo 0,000 (-)	-0,074 -0,075 (1,000)	0,208 0,212 (0,325)	0,140 0,110 (0,358)	-0,139 -0,141 (0,640)	0,000 0,000 (-)	0,585 0,602** (0,002)	-0,200 -0,212 (1,000)	-0,019 -0,019 (1,000)	0,011 ± 0,031 0,017 ± 0,032	
Vilanova	0,000 0,000 (-)	Un alelo 0,104 (-)	0,102 0,104 (0,697)	0,000 0,000 (-)	-0,094 -0,096 (1,000)	-0,115 -0,117 (1,000)	0,363 0,242 (0,198)	0,212 0,217 (0,288)	0,163 0,168 (0,643)	-0,193 -0,105 (0,338)	0,000 0,000 (-)	-0,036 -0,036 (1,000)	-0,0004 ± 0,026 -0,001 ± 0,021	
f_C medio	-0,002 ± 0,002	-0,026 ± 0,022	-0,008 ± 0,059	-0,007 ± 0,005	0,071 ± 0,048	0,073 ± 0,064	0,007 ± 0,065	0,054 ± 0,093	0,015 ± 0,070	0,020 ± 0,087	-0,061 ± 0,026	-0,037 ± 0,007		
f_T medio	-0,0001 ± 0,0001	-0,026 ± 0,023	-0,009 ± 0,045	-0,005 ± 0,005	0,067 ± 0,048	0,075 ± 0,065	0,008 ± 0,041	0,057 ± 0,096	0,020 ± 0,065	0,034 ± 0,084	-0,055 ± 0,028	-0,035 ± 0,007		

* P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001

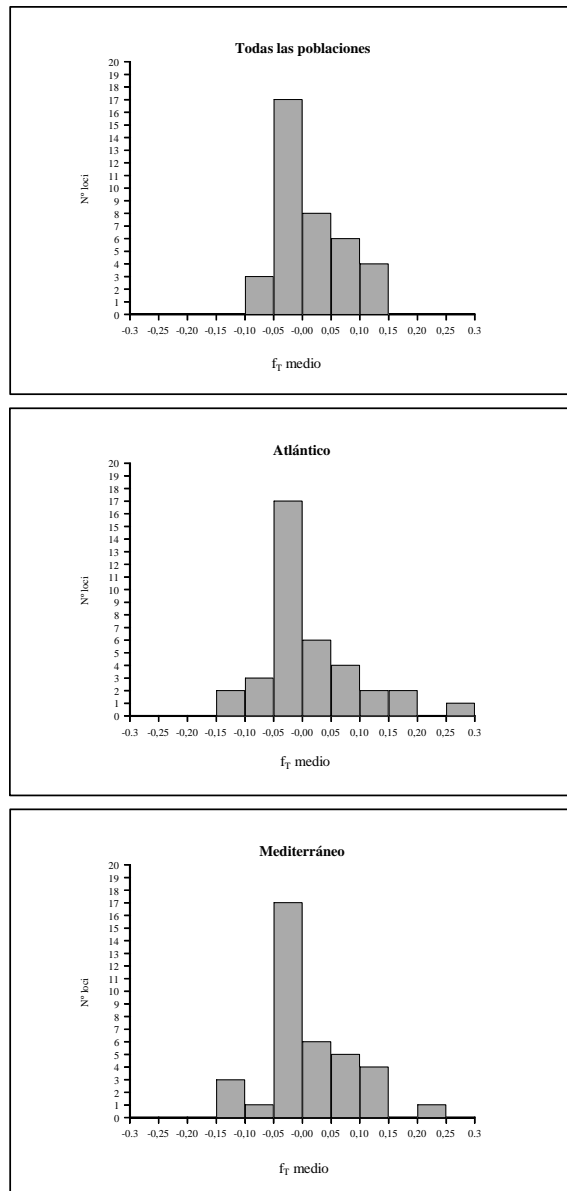


Figura 19.- Distribución de las estimas medias de f_T por locus en el total de las poblaciones estudiadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las de la región mediterránea.

En el total de las poblaciones, los valores de f_T se distribuyen en un rango de $-0,10$ a $0,15$, concentrándose la mayor parte de los valores en el intervalo $-0,05 - 0,00$. Tanto en la región mediterránea como en la región atlántica, el rango se amplía desde $-0,15$ a $0,30$ y de $-0,15$ a $0,25$, respectivamente, aunque la mayor parte de los valores en ambos casos siguen concentrándose en el intervalo $-0,05$ a $0,00$.

3.5.- DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

En la tabla 13 se muestran las estimas de F_{ST} para 38 *loci* de 2-DE según los estadísticos G_{ST} y θ . Ambos estimadores mostraron resultados muy similares. También se indican los resultados del test de probabilidad exacta que se empleó con el fin conocer la significación estadística de la diferenciación genética entre poblaciones para cada *locus*.

El grado de diferenciación detectado al considerar todas las poblaciones analizadas (G_{ST} global $0,099$; θ global $0,096$) fue bajo en la mayor parte de los *loci*, mostrando valores de G_{ST} entre $0,005$ y $0,078$ y valores de θ entre $-0,011$ y $0,062$. No obstante, en algunos *loci* (10, 17, 30, 33, 39 y 45) se detectó un grado de diferenciación mayor, con estimas de G_{ST} entre $0,114$ y $0,423$ y valores de θ entre $0,106$ y $0,454$. Estos últimos coinciden con algunos de los *loci* en los que el test t detectó diferencias estadísticamente significativas en las medias de sus frecuencias alélicas entre las poblaciones de la región atlántica y las de la región mediterránea. Esta distribución asimétrica de las estimas de F_{ST} puede observarse en la figura 20. En 17 de los 38 *loci* analizados (44,7%)

la magnitud de la diferenciación resultó ser estadísticamente significativa según el test de probabilidad exacta (tabla 13).

Tabla 13.- Estimaciones de F_{ST} para 38 loci en el global de las poblaciones analizadas y en las poblaciones de las regiones atlántica y mediterránea, según los estadísticos G_{ST} (primera línea) y θ (segunda línea). En la tercera línea, entre paréntesis, probabilidad del test exacto para diferenciación de frecuencias génicas. También se indican la diversidad genética (H_T), la diversidad promedio dentro de las poblaciones (H_s) y las estimaciones de diferenciación genética (G_{ST}) entre y dentro de las regiones atlántica y mediterránea.

Locus	H_T	H_s	Área total	Entre regiones	Dentro de regiones	Atlántico	Mediterráneo
Todos los loci	0,263	0,237	0,099 0,096	0,075	0,024	0,012 -0,002	0,039 0,028
5	0,482	0,460	0,046 0,034 (0,004)	0,030	0,016	0,011 -0,005 (0,508)	0,023 0,014 (0,148)
7	0,456	0,444	0,025 0,011 (0,186)	0,003	0,023	0,020 0,008 (0,508)	0,025 0,015 (0,088)
8	0,629	0,605	0,038 0,024 (0,001)	0,014	0,024	0,014 -0,002 (0,358)	0,035 0,028 (0,016)
9	0,065	0,062	0,039 0,029 (0,007)	0,025	0,015	0,014 0,001 (0,476)	0,016 0,004 (0,236)
10	0,495	0,426	0,140 0,137 (0,000)	0,121	0,018	0,016 0,002 (0,354)	0,025 0,014 (0,109)
14	0,461	0,454	0,015 -0,004 (0,628)	0,003	0,012	0,004 -0,017 (0,898)	0,020 0,007 (0,282)
16	0,324	0,319	0,015 -0,003 (0,225)	0,004	0,011	0,006 -0,016 (0,751)	0,017 0,006 (0,277)
17	0,448	0,318	0,290 0,310 (0,000)	0,229	0,061	0,003 -0,016 (0,884)	0,110 0,124 (0,000)

Tabla 13.- continuación

26	0,045	0,044	0,009 -0,006 (0,666)	0,005	0,004	0,0001 -0,017 (1,000)	0,015 0,004 (0,622)
30	0,442	0,351	0,207 0,215 (0,000)	0,154	0,052	0,012 0,002 (0,449)	0,086 0,094 (0,0001)
32	0,049	0,048	0,013 -0,002 (0,313)	0,002	0,012	0,010 -0,004 (0,639)	0,014 0,003 (0,148)
33	0,735	0,651	0,114 0,106 (0,000)	0,094	0,020	0,020 0,005 (0,185)	0,023 0,011 (0,013)
35	0,213	0,204	0,039 0,026 (0,006)	0,027	0,012	0,015 0,002 (0,408)	0,012 -0,005 (0,494)
39	0,509	0,293	0,423 0,454 (0,000)	0,390	0,034	0,009 -0,005 (0,452)	0,073 0,073 (0,002)
42	0,144	0,141	0,023 0,009 (0,189)	0,007	0,016	0,017 0,004 (0,277)	0,014 0,002 (0,497)
45	0,500	0,351	0,298 0,313 (0,000)	0,288	0,009	0,011 -0,005 (0,463)	0,015 0,005 (0,323)
46	0,057	0,056	0,017 0,002 (0,608)	0,008	0,009	0,008 -0,007 (0,852)	0,013 -0,0001 (0,741)
47	0,492	0,457	0,071 0,062 (0,000)	0,032	0,039	0,008 -0,010 (0,562)	0,078 0,082 (0,001)
50	0,145	0,143	0,014 -0,002 (0,628)	0,001	0,014	0,017 0,005 (0,153)	0,009 -0,005 (0,891)
54	0,017	0,016	0,024 0,011 (0,233)	0,006	0,018	0,018 0,008 (0,293)	- - (-)
60	0,025	0,024	0,017 0,003 (0,231)	0,0003	0,017	0,018 0,008 (0,172)	0,015 0,004 (0,620)
61	0,029	0,028	0,015 0,001 (0,222)	0,001	0,014	0,014 0,002 (0,170)	0,015 0,004 (0,615)
62	0,017	0,017	0,011 -0,005 (0,667)	0,002	0,009	0,008 -0,006 (1,000)	0,009 -0,005 (0,610)

Tabla 13.- continuación

65	0,277	0,274	0,009 -0,007 (0,814)	0,002	0,007	0,006 -0,010 (0,768)	0,009 -0,006 (0,642)
66	0,018	0,017	0,030 0,016 (0,061)	0,006	0,024	- - (-)	0,024 0,013 (0,182)
67	0,013	0,012	0,022 0,007 (0,242)	0,001	0,021	0,014 0,001 (0,240)	0,025 0,015 (0,246)
71	0,025	0,025	0,009 -0,007 (0,998)	0,001	0,008	0,009 -0,006 (1,000)	0,007 0,007 (1,000)
76	0,058	0,055	0,060 0,055 (0,0001)	0,010	0,051	0,061 0,066 (0,001)	0,020 0,009 (0,058)
78	0,437	0,417	0,046 0,035 (0,011)	0,016	0,030	0,012 0,002 (0,648)	0,047 0,039 (0,021)
80	0,025	0,025	0,017 0,003 (0,146)	0,002	0,016	0,012 -0,001 (1,000)	0,020 0,010 (0,024)
86	0,228	0,219	0,041 0,029 (0,006)	0,019	0,021	0,027 0,017 (0,084)	0,013 -0,0001 (0,384)
87	0,142	0,140	0,017 0,001 (0,286)	0,003	0,013	0,012 -0,001 (0,352)	0,014 0,0004 (0,304)
88	0,318	0,310	0,023 0,009 (0,128)	0,002	0,020	0,021 0,014 (0,171)	0,020 0,005 (0,224)
110	0,443	0,415	0,063 0,050 (0,001)	0,057	0,006	0,005 -0,014 (0,837)	0,008 -0,011 (0,670)
126	0,469	0,433	0,078 0,029 (0,023)	0,015	0,063	0,011 -0,002 (0,518)	0,127 0,084 (0,002)
127	0,495	0,491	0,008 -0,008 (0,747)	0,005	0,003	0,004 -0,012 (0,860)	0,002 -0,015 (0,789)
130	0,153	0,144	0,058 0,030 (0,040)	0,031	0,027	0,008 -0,008 (0,644)	0,034 0,001 (0,593)
134	0,100	0,100	0,005 -0,011 (0,968)	0,002	0,004	0,005 -0,009 (0,831)	0,001 -0,015 (1,000)

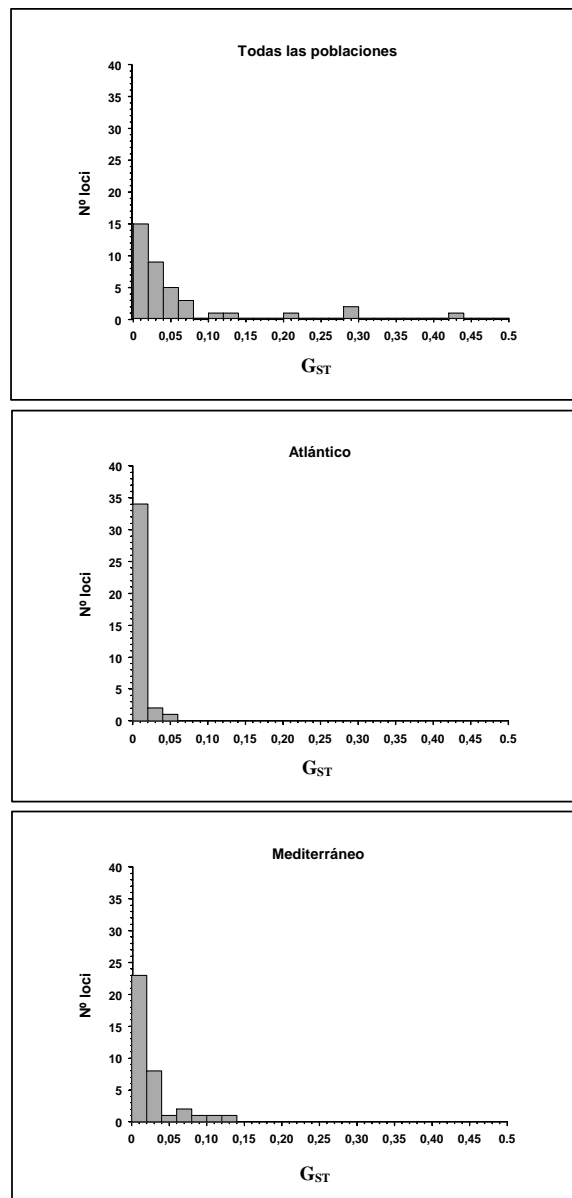


Figura 20.- Distribución de las estimas de G_{ST} para 38 loci analizados mediante 2-DE en el total de las poblaciones estudiadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las de la región mediterránea.

Los valores de G_{ST} y θ en las regiones atlántica y mediterránea son más bajos que en el total, indicando una mayor homogeneidad dentro de ambas regiones. Esta homogeneidad parece ser mayor en las poblaciones de la región atlántica (G_{ST} global = 0,012; θ global = -0,002) que en las de la región mediterránea (G_{ST} global = 0,039; θ global = 0,028) lo cual se aprecia claramente en la distribución de las estimas de G_{ST} de ambas zonas que se muestra en la figura 20. En las poblaciones de la región atlántica sólo 1 de los 38 *loci* analizados (2,63%) mostraron un grado de diferenciación estadísticamente significativo, frente a 9 (23,68%) en las poblaciones de la región mediterránea.

La mayor parte de la diferenciación genética detectada corresponde al componente de diferenciación entre regiones (G_{ST} global 0,075), en el cual las estimas de G_{ST} oscilaron entre 0,0003 y 0,390 en los diferentes *loci* (tabla 13) mientras que sólo una pequeña parte se debe a la diferenciación detectada dentro de regiones (G_{ST} global 0,024), con estimas de G_{ST} entre 0,003 y 0,063. Los *loci* que mostraron un mayor grado de diferenciación entre regiones fueron el 10 (G_{ST} = 0,121), 17 (G_{ST} = 0,229), 30 (G_{ST} = 0,154), 39 (G_{ST} = 0,390) y 45 (G_{ST} = 0,288). Esta distribución de la diferenciación genética detectada entre y dentro de regiones también se puede apreciar en la figura 21.

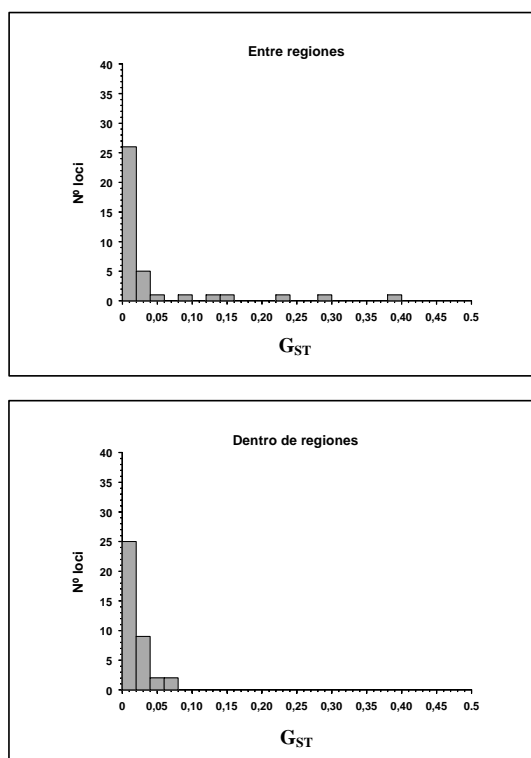


Figura 21.- Distribución de las estimas de G_{ST} entre y dentro de las regiones atlántica mediterránea para 38 loci analizados mediante 2-DE.

En la tabla 14 se comparan las distribuciones de G_{ST} por *locus* de poblaciones de mejillón de la Península Ibérica obtenidas en este trabajo para 38 *loci* de 2-DE con las obtenidas para 13 *loci* alozímicos (Quesada, 1992; Quesada et al., 1995a). Se puede observar que el grado de diferenciación detectado mediante 2-DE casi triplica en la mayor parte de los casos el detectado mediante alozimas. No obstante, la distribución de la diferenciación genética detectada mediante ambos marcadores es similar. Así, los valores de G_{ST} medio para todas las poblaciones obtenidos

mediante análisis de marcadores de 2-DE (0,063) y mediante el análisis de alozimas (0,023), son más altos que los obtenidos para las poblaciones de la región atlántica (2-DE: 0,013; alozimas : 0,007) y poblaciones de la región mediterránea (2-DE : 0,028; alozimas : 0,007) por separado. La mayor parte de esta diferenciación (un 68,25% en el caso de marcadores de 2-DE y un 69,57% en el caso de alozimas) corresponde al componente de diferenciación entre regiones (0,043 en el estudio de 2-DE y 0,016 en el de alozimas). El resto de la diferenciación corresponde al componente dentro de regiones.

Tabla 14.- Medias y varianzas de las distribuciones de G_{ST} para 38 marcadores de 2-DE y 13 marcadores alozímicos (datos de Quesada, 1992). También se indican los valores del estadístico k de Lewontin y Krakauer (1973).

	Todas las poblaciones	Entre regiones	Dentro regiones	Atlántico	Mediterráneo
2-DE (este estudio)					
n	8	2	4	4	4
\overline{G}_{ST}	0.063	0.043	0.020	0.013	0.028
$s^2 (x10^{-4})$	85.361	74.241	2.275	0.992	8.548
$s^2 / \overline{G}_{ST}^2$	2.151	4.015	0.569	0.587	1.090
k	15.055	4.015	1.706	1.761	3.271
ALOZIMAS (Quesada, 1992)					
n	21	2	10.5	13	8
\overline{G}_{ST}	0.023	0.016	0.007	0.007	0.007
$s^2 (x10^{-4})$	10.399	9.883	0.058	0.056	0.161
$s^2 / \overline{G}_{ST}^2$	1.966	3.861	0.118	0.114	0.329
k	39.316	3.861	1.125	1.371	2.300

Lewontin y Krakauer (1973) propusieron que, bajo un modelo de evolución neutral, $s^2 = \frac{k \cdot \bar{F}^2}{(n-1)}$, donde s^2 es la varianza de las estimas de F_{ST} para los diferentes *loci*, k es una constante dependiente de la distribución de las frecuencias alélicas en las distintas subpoblaciones cuyo valor para *loci* neutrales en los que sólo actúa la deriva ha de ser menor o igual a 2 y \bar{F} es el valor medio de F_{ST} . Aunque el test de Lewontin y Krakauer no es válido para testar selección, (Robertson, 1975a, b; Nei y Maruyama, 1975; Nei y Chakravarti, 1977; Nei et al., 1977) es un test heurístico útil para comprobar la existencia de efectos específicos de *locus* (selección y/o mutación). Baer (1999) utilizó el estadístico k para detectar efectos específicos de *locus* en datos publicados de poblaciones de peces con diferentes grados de restricción del flujo génico (según consideraciones *a priori* de índole geográfica y biológica), teniendo en cuenta que estos efectos, y por tanto el valor de k , serán mayores en poblaciones con bajos valores de flujo génico. En la tabla 14, se presenta el valor del estadístico k de Lewontin y Krakauer junto con otras características de la distribución de G_{ST} por *locus* para 38 *loci* polimórficos analizados mediante 2-DE y para 13 *loci* alozímicos (valores calculados a partir de los datos de Quesada, 1992). El valor de k entre las regiones atlántica y mediterránea es superior a 2 (2-DE: 4,015; alozimas: 3,861), siendo la media de ambos valores $3,938 \pm 0,077$. En cambio, el valor de k dentro de dichas regiones es inferior a 2 en ambos estudios (2-DE: 1,706; alozimas: 1,125), siendo su valor medio $1,416 \pm 0,291$. Esta mayor heterogeneidad en los valores de G_{ST} por *locus* entre las dos regiones en relación a la heterogeneidad dentro de cada región ha de ser debida a

efectos específicos de *locus*, tales como la selección y/o mutación, más fuertes entre regiones que dentro de regiones y podría estar indicando indirectamente la existencia de una mayor restricción al flujo génico entre ambas regiones que dentro de cada una de ellas.

También se observa que los *loci* que mostraron una desviación promedio de las proporciones Hardy-Weinberg entre todas las poblaciones más acusada (que siempre eran de signo positivo, indicando por tanto un defecto de heterocigotos) coinciden con algunos de los *loci* en los que se detectó un grado de diferenciación significativo (*locus* 17, 33, 35 y 47). Parece existir por tanto una correlación entre los valores de F_{IS} y los valores de F_{ST} al menos en algunos *loci*. Por este motivo, y con el fin de profundizar un poco más en el estudio de las fuerzas que provocan dicha diferenciación, se analizaron las correlaciones de rango τ de Kendall y ρ de Spearman entre los valores de G_{ST} y los valores de f_T obtenidos en este estudio para el total de las poblaciones analizadas, para las poblaciones de la región atlántica y para las de la región mediterránea. Los resultados se pueden observar en la tabla 15 y muestran una correlación positiva y estadísticamente significativa en el total de las poblaciones analizadas ($\tau = 0,118$, $P < 0,01$; $\rho = 0,161$, $P = 0,01$) y en las poblaciones de la región mediterránea ($\tau = 0,167$, $P < 0,01$; $\rho = 0,245$, $P < 0,01$) mientras que la correlación en las poblaciones de la región atlántica, donde el grado de diferenciación detectado es muy bajo, no es significativa ($\tau = 0,013$, $P > 0,05$; $\rho = 0,019$, $P > 0,05$). Este efecto se puede observar gráficamente en la figura 22, donde se representa la asociación entre las estimas de f_T y las estimas de G_{ST} en el total de las poblaciones, en las poblaciones de la región atlántica y en las de la región mediterránea.

Tabla 15.- Correlaciones de rango τ de Kendall y ρ de Spearman y su significación (entre paréntesis) entre los valores de G_{ST} y f_T estimados para cada *locus* en el total de las poblaciones estudiadas, en las poblaciones del Atlántico y en las poblaciones del Mediterráneo a partir de marcadores de 2-DE y marcadores alozímicos (calculadas a partir de los datos de Quesada, 1992). También se indica el número de pares de valores (N) analizados.

		2-DE						ALOZIMAS					
		Total	N	Area atlantica.	N	Area mediterr.	N	Total	N	Area atlántica	N	Área mediterr.	N
G_{ST} vs. f_T	τ	0.118 (0.006)	304	0.013 (0.826)	152	0.167 (0.007)	152	0.151 (0.001)	273	-0.004 (0.952)	156	0.120 (0.088)	117
	ρ	0.161 (0.010)	304	0.019 (0.829)	152	0.245 (0.006)	152	0.204 (0.001)	273	-0.005 (0.950)	156	0.167 (0.088)	117
G_{ST} vs. $ f_T $	τ	0.215 (0.000)	304	-0.066 (0.275)	152	0.095 (0.122)	152	0.063 (0.182)	273	0.032 (0.607)	156	0.076 (0.284)	117
	ρ	0.313 (0.000)	304	-0.107 (0.228)	152	0.141 (0.117)	152	0.089 (0.167)	273	0.040 (0.642)	156	0.103 (0.293)	117

Se confirma por tanto, que los *loci* que presentan valores de f_T elevados (y por tanto desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg con defectos de heterocigotos) contribuyen en mayor medida al grado de diferenciación entre regiones. Esto puede ser debido a efectos de mezcla de poblaciones (efecto Wahlund) o bien a otros factores tales como la selección. Si ocurre un efecto de mezcla de poblaciones, los *loci* más diferenciados (con G_{ST} más elevados) son los que más contribuyen a generar un defecto de heterocigotos (valores de F_{IS} positivos). La diferenciación provocada por selección puede causar defectos de heterocigotos en unos *loci* y excesos de heterocigotos en otros (valores de F_{IS} positivos o negativos). Por tanto, la comparación entre la correlación de

los valores de F_{IS} y G_{ST} y la correlación entre los valores absolutos de F_{IS} y los valores de G_{ST} puede ser una herramienta útil para diferenciar entre ambos procesos. Si la principal causante de la diferenciación es la selección, ha de observarse un incremento de la correlación al considerar los valores absolutos de F_{IS} . Como se puede observar en la tabla 15, al considerar el total de las poblaciones analizadas, la correlación entre los valores de f_T y G_{ST} aumenta si se consideran los valores absolutos de f_T en el caso de los datos de 2-DE ($\tau = 0.215$, $P < 0.001$; $\rho = 0.313$, $P < 0.001$), pero en el caso de alozimas desciende, dejando de ser significativa ($\tau = 0.063$, $P > 0.05$; $\rho = 0.089$, $P > 0.05$). En las poblaciones de la región atlántica tanto para los datos de 2-DE como para los de alozimas, la correlación se incrementa al considerar los valores de f_T absolutos, aunque no llega a ser significativa en ningún caso. En las poblaciones de la región mediterránea, la correlación desciende en ambos casos al considerar los valores absolutos de f_T alejándose de la significación. Estos efectos se pueden observar gráficamente comparando las figuras 22 y 23 para los datos de 2-DE y 24 y 25 para los datos de alozimas, donde se muestran las distribuciones de las estimas de f_T y $|f_T|$ respectivamente, en relación a las estimas de G_{ST} . Parece claro que pueden estar actuando varios agentes evolutivos (selección y efecto Wahlund) en las poblaciones estudiadas.

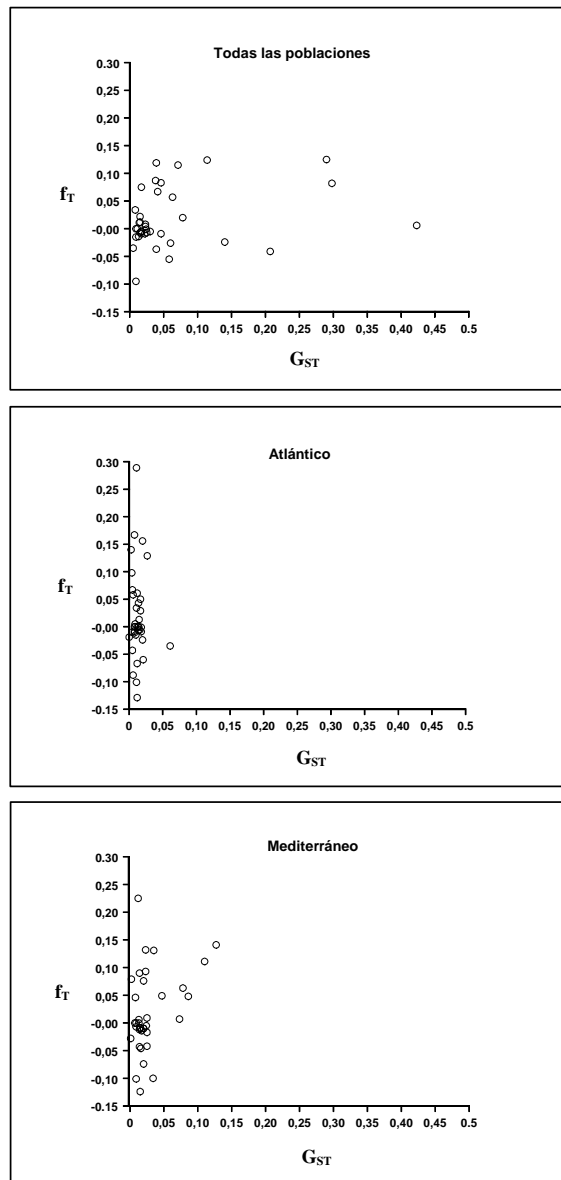


Figura. 22.- Asociación entre las estimas de f_T y G_{ST} para 38 loci de 2-DE en el total de las poblaciones analizadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las poblaciones de la región mediterránea.

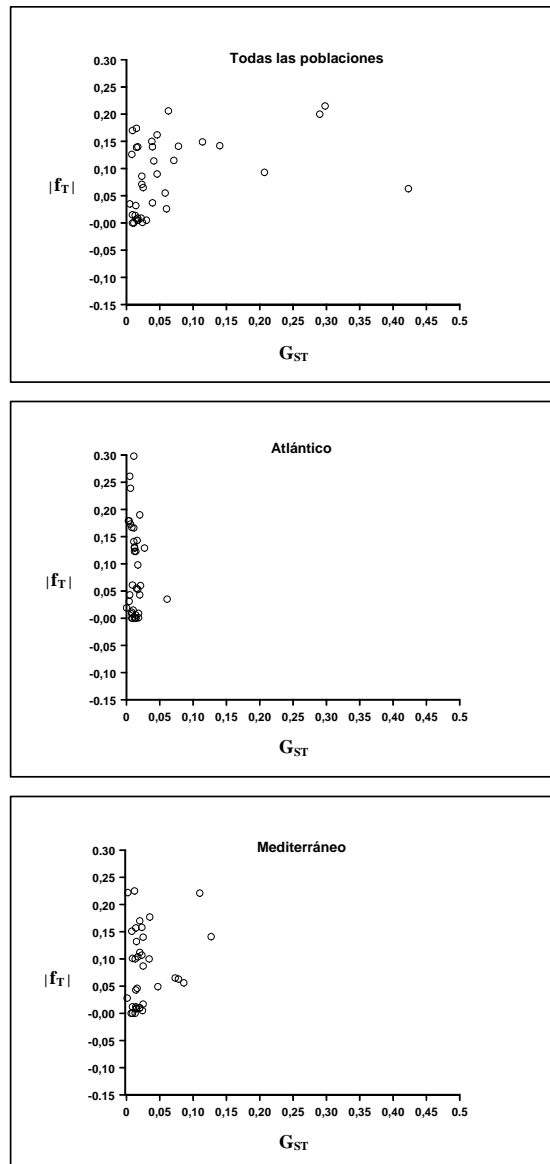


Figura. 23.- Asociación entre las estimas de $|f_T|$ y G_{ST} para 38 loci de 2-DE en el total de las poblaciones analizadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las poblaciones de la región mediterránea.

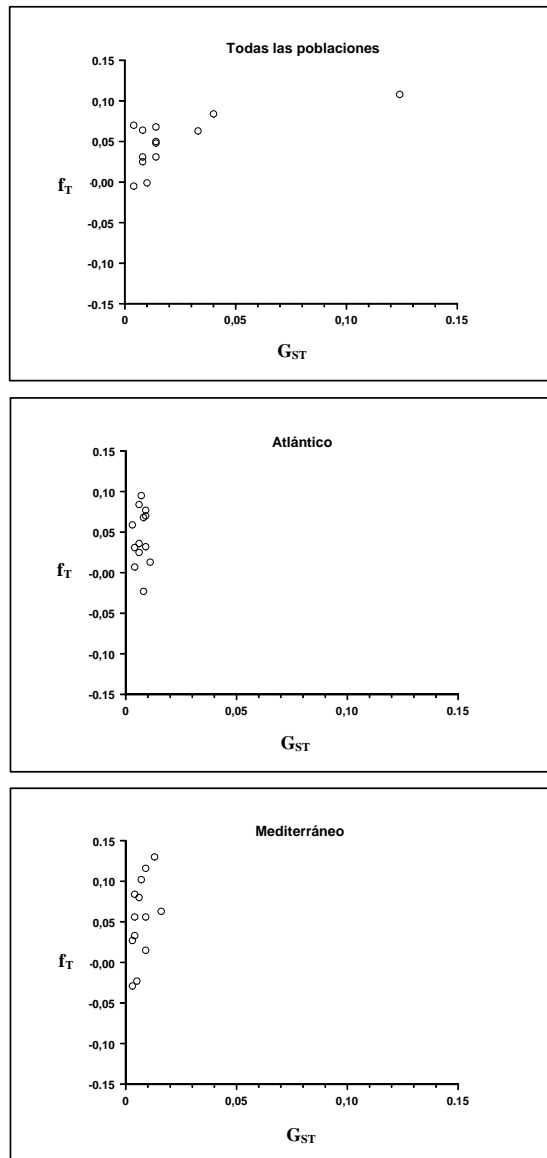


Figura 24.- Asociación entre las estimas de f_T y G_{ST} para 13 *loci* alozímicos en el total de las poblaciones estudiadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las poblaciones de la región mediterránea.

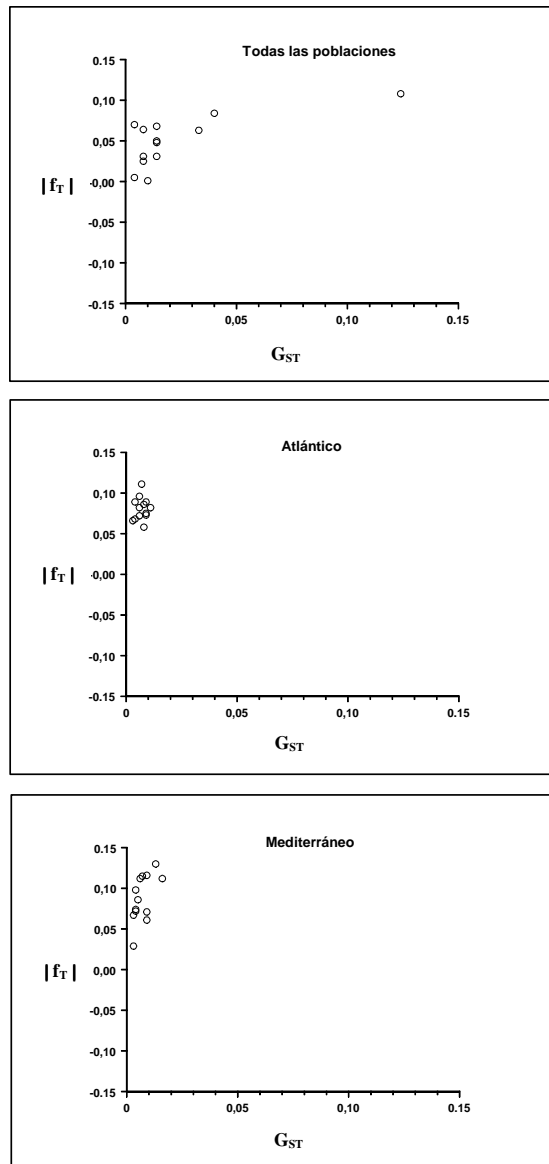


Figura 25.- Asociación entre las estimas de $|f_T|$ y G_{ST} para 13 *loci* alozímicos en el total de las poblaciones estudiadas, en las poblaciones de la región atlántica y en las poblaciones de la región mediterránea.

Para profundizar en el análisis de los mismos, se ha realizado un análisis pormenorizado de estas correlaciones recurriendo en esta ocasión a los *loci* multialélicos y considerando tan solo los alelos frecuentes. En la tabla 16 se muestran los resultados de este análisis en el que se ha estudiado la correlación de los valores de G_{ST} por alelo en cada *locus* con los valores correspondientes de f_{ii} y $|f_{ii}|$ así como con los valores de f_{ii} y $|f_{ii}|$ medios para cada *locus*. En el *locus* 7 existe una correlación positiva y significativa entre los valores de G_{ST} por alelo y los valores tanto de f_{ii} , como de f_{ii} medio. Esta correlación baja y se convierte en no significativa al considerar los valores absolutos de f_{ii} y f_{ii} medio, lo cual podría estar indicando la existencia de un efecto de mezcla de poblaciones (efecto Wahlund). En el *locus* 8 se observa un patrón similar aunque en ningún caso las correlaciones llegan a ser estadísticamente significativas. En los *locus* 16 y 88 las correlaciones aumentan al considerar los valores absolutos de los f_{ii} individuales pero disminuyen al con los valores absolutos de los f_{ii} medios, mientras que en los *loci* 39 y 127 aumentan al considerar los valores absolutos de los f_{ii} individuales pero permanecen iguales con los valores absolutos de los f_{ii} medios. Por último, en los *loci* 33 y 50, se puede observar en ambos casos (con los valores individuales y con los valores medios de f_{ii}) un aumento de las correlaciones al considerar los valores absolutos de las estimas de f_{ii} respecto a las estimas de f_{ii} con signo, lo cual podría estar indicando la actuación de la selección natural sobre estos *loci*.

Tabla 16.- Estimaciones de F_{IS} por alelo (f_{ii}) y G_{ST} por alelo para loci multialélicos detectados mediante 2-DE en 8 poblaciones de *Mytilus galloprovincialis*. Correlaciones de rango τ de Kendall y ρ de Spearman y su significación (entre paréntesis) entre los valores de G_{ST} por alelo y f_{ii} , $|f_{ij}|$, f_{ij} medio y $|f_{ij}|$ medio. También se indica el número de pares de valores (N) analizados.

Locus	Alelo	f_{ii}								f_{ij} medio	$ f_{ij} $ medio	G_{ST}	τ	ρ	G_{ST} vs. f_{ii}	N	G_{ST} vs. $ f_{ij} $ medio	N	G_{ST} vs. f_{ii} medio	N	G_{ST} vs. $ f_{ij} $ medio
		Sant.	Riba.	Sint.	Marb.	Agui.	Cull.	Vale.	Vila.												
7	1	-0,169	-0,169	0,189	0,045	0,293	0,274	-0,118	-0,127	0,027	0,173	0,027	0,363	0,153	29	1,000	0,333	4	1,000	0,333	
	2	0,028	0,060	-0,092	0,119	0,173	-0,009	0,087	0,122	0,061	0,086	0,036	(0,012)	(0,292)		(0,042)	(0,497)				
	3	-0,081	-0,127	-0,071	-0,039	-0,019	-0,041	-0,145	-0,081	-0,076	0,076	0,017	0,469	0,251		1,000	0,600				
	4	0,000	0,000	0,000			-0,020		-0,039	-0,012	0,012	0,021	(0,010)	(0,189)		(0,000)	(0,400)				
8	1	-0,054	0,324	-0,041	-0,182	0,380	-0,151	0,815	-0,038	0,132	0,248	0,076	0,022	0,004	24	0,333	0,333	3	0,333	0,333	
	2	0,052	0,427	-0,254	0,144	0,100	-0,151	-0,020	-0,112	0,023	0,158	0,042	(0,895)	(0,979)		(0,602)	(0,602)				
	3	0,076	0,203	0,086	-0,223	0,251	0,146	-0,149	-0,154	0,030	0,161	0,017	0,048	0,011		0,500	0,500				
16	1	0,657	-0,022	-0,031	-0,026	0,000	0,000			0,096	0,123	0,033	0,298	-0,413	22	1,000	-0,333	3	1,000	-0,333	
	3	0,269	0,276	-0,219	-0,295	-0,153	-0,193	0,274	-0,085	-0,016	0,221	0,014	(0,085)	(0,017)		(0,117)	(0,602)				
	4	-0,145	0,655	-0,137	-0,216	-0,124	-0,161	0,365	-0,085	0,019	0,236	0,015	0,333	-0,495		1,000	-0,500				
													(0,130)	(0,019)		(0,000)	(0,667)				
33	1	0,038	0,615	-0,093	-0,062	0,341	0,361	0,168	0,236	0,201	0,239	0,041	-0,078	-0,170	32	-0,333	-1,000	4	-0,333	-1,000	
	2	0,274	0,346	-0,118	0,316	0,066	0,287	-0,055	0,168	0,161	0,204	0,094	(0,568)	(0,214)		(0,497)	(0,042)				
	4	0,288	-0,109	-0,068	0,814	0,104	0,370	0,015	-0,370	0,131	0,267	0,036	-0,089	-0,201		-0,400	-1,000				
	6	0,131	0,143	-0,084	0,189	0,341	-0,022	-0,036	-0,122	0,068	0,134	0,288	(0,627)	(0,269)		(0,600)	(0,000)				
39	2	-0,055	0,161	-0,096	-0,055	0,409	0,087	-0,162	-0,103	0,023	0,141	0,519	-0,085	0,455	22	0,333	0,333	3	0,333	0,333	
	3	-0,018	0,285	-0,075	-0,055	0,251	0,040	-0,186	0,227	0,059	0,142	0,310	(0,628)	(0,009)		(0,602)	(0,602)				
	4	-0,018	-0,017		-0,042	-0,042	0,000	0,000	-0,055	-0,022	0,022	0,023	-0,123	0,585		0,500	0,500				
													(0,586)	(0,004)		(0,667)	(0,667)				

3.6.- FLUJO GÉNICO

Se ha estimado el número medio de individuos migrantes por generación (Nm) a fin de determinar la importancia relativa del flujo génico sobre la diferenciación de las poblaciones. Se empleó la conocida expresión de Wright (1951) para un modelo de isla en equilibrio

$$F_{ST} = 1/(1+4Nm)$$

Para que un estimador del promedio de Nm sea útil, debería ser insensible factores como la tasa de mutación y la intensidad de la selección. Slatkin y Barton (1989) demostraron que este procedimiento se encuentra poco afectado por la selección, mutación o la variación en la estructura de las poblaciones. Se ha utilizado como estimador de F_{ST} el valor del estadístico G_{ST} y cuando se disponía de él, también el de θ . Los resultados obtenidos con ambos estimadores son muy similares, tal como puede observarse en la tabla 17.

Tabla 17.- Estimaciones de Nm calculadas a partir de los valores globales de G_{ST} y θ para el área total, las regiones atlántica y mediterránea, dentro y entre dichas regiones según la fórmula de Wright $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$.

	2-DE				Alozimas	
	G_{ST}	Nm	θ	Nm	G_{ST}	Nm
Área total	0,099	2,275	0,096	2,354	0,029	8,371
Entre regiones	0,075	3,083			0,022	11,114
Dentro de regiones	0,024	10,167			0,007	35,464
Atlántico	0,012	20,583	-0,002	-	0,0065	38,212
Mediterráneo	0,039	6,160	0,028	8,679	0,007	35,464

Aunque dichos valores se encuentran reflejados en la tabla, en el texto, para una mayor claridad, vamos a referirnos tan solo a las estimas realizadas a partir de los valores de G_{ST} . En el área total el valor de N_m es muy bajo (2,275), mientras que al considerar ambas regiones por separado, se obtienen estimas de N_m claramente superiores (20,583 en la región atlántica y 6,160 en la región mediterránea). La magnitud de N_m entre ambas regiones (3,083) también es inferior a la estimada dentro de regiones (10,167). Estos resultados podrían ser indicativos de la existencia de una restricción al flujo génico entre ambas regiones. Las estimas de N_m para los datos de alozimas de Quesada (1992) muestran un patrón muy similar aunque detectan un mayor grado de migración tanto al considerar el total de las poblaciones (8,371) como entre regiones (11,114), dentro de regiones (35,464) y en cada región por separado (38,212 en la región atlántica y 35,464 en la región mediterránea). Otra diferencia destacable es que mientras con los datos de 2-DE, parece existir mucha menos migración en la región mediterránea que en la región atlántica, con los datos de alozimas, la migración parece ser muy similar en ambas zonas.

La regresión lineal del \log_{10} de M ($M = 1/4(1/G_{ST} - 1)$) sobre el logaritmo de la distancia geográfica para pares de poblaciones (véase tabla 18) permiten detectar la existencia de aislamiento por distancia en el área estudiada (Slatkin, 1993). Cuando se consideran todas las combinaciones de poblaciones de la Península Ibérica analizadas, la pendiente de la regresión es negativa y estadísticamente significativa tanto en los datos de 2-DE (-0,450; $P < 0,05$) como con los datos de alozimas (-0,757 $P < 0,001$). Esto parece indicar la existencia de aislamiento por distancia entre las poblaciones de mejillón de la Península Ibérica. Sin

embargo, al observar las rectas de regresión (figuras 26 y 27) se puede ver un elevado grado de dispersión entre los valores representados, debido a la existencia de una heterogeneidad asociada a dos grupos de datos con valores de flujo bastante diferentes.

Tabla 18.- Análisis de aislamiento por distancia en poblaciones de mejillón de la Península Ibérica mediante la regresión del \log_{10} de M sobre el \log_{10} de la distancia según la ecuación $\log_{10} M = a + b \log_{10} d$. Entre paréntesis se indica la significación estadística de b.

	n	a	b	r ²	Nm
2-DE					
Área total	8	2,118	-0,450 (0,032)	0,165	-
Atlántico	4	1,960	-0,162 (0,097)	0,538	91,201
Mediterráneo	4	1,186	-0,072 (0,783)	0,021	15,346
ALOZIMAS					
Área total	21	3,649	-0,757 (0,000)	0,546	-
Atlántico	13	2,114	-0,096 (0,005)	0,098	130,017
Mediterráneo	8	1,968	-0,068 (0,641)	0,008	92,897

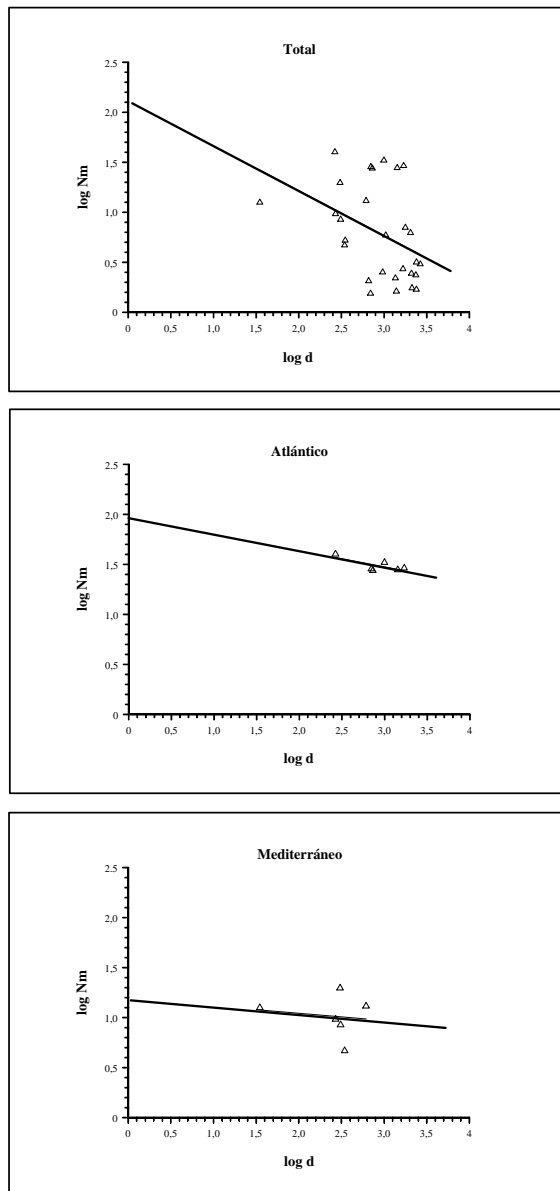


Figura 26.- Rectas de regresión correspondientes al análisis de aislamiento por distancia en poblaciones de mejillón de la Península Ibérica mediante 38 marcadores de 2-DE.

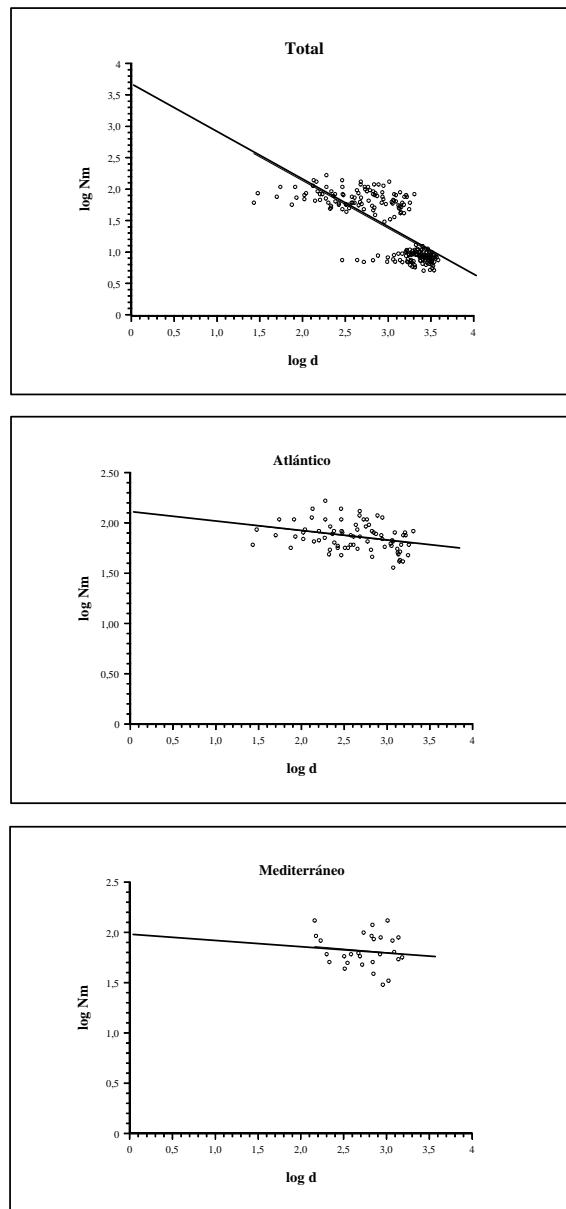


Figura 27.- Rectas de regresión correspondientes al análisis de aislamiento por distancia en poblaciones de mejillón de la Península Ibérica mediante 13 marcadores de alozimas.

En cambio, al considerar por separado las poblaciones de ambas regiones, la pendiente es mucho más baja (véanse figuras 26 y 27), no encontrándose una regresión significativa ni en la región atlántica (2-DE: -0,162 $P > 0,05$; alozimas: -0,096 $P = 0,05$) ni en la región mediterránea (2-DE: -0,072 $P > 0,05$; alozimas: -0,068 $P > 0,05$). El grado de aislamiento por distancia entre las poblaciones de la región atlántica y entre las poblaciones de la región mediterránea es por tanto muy pequeño. Este hecho indica que la regresión estadísticamente significativa que se obtiene al considerar todas las poblaciones de la Península Ibérica analizadas en conjunto, no se debe al aislamiento por distancia sino a la existencia de una barrera o restricción al flujo génico entre las poblaciones de ambas regiones.

Las estimas de Nm por unidad de distancia (Km) obtenidas tanto en el estudio de 2-DE como en el de alozimas son elevadas, tal y como cabe esperar de un organismo que posee una fase larvaria pelágica, durante la cual puede recorrer grandes distancias a merced de las corrientes marinas. Estas estimas se mostraron superiores en la región atlántica (2-DE: 91,201; alozimas: 130,017) que en la región mediterránea (2-DE: 15,346; alozimas: 92,897), indicando un grado de migración más elevado en esta zona.

3.7.- DESEQUILIBRIO GAMÉTICO

El conocimiento de la existencia de desequilibrio gamético entre pares de *loci* provee de información muy útil acerca de la historia de una

población y de las fuerzas evolutivas que actúan sobre esos *loci*. La deriva genética, la selección o la mezcla de poblaciones pueden provocar asociaciones no al azar entre genotipos de diferentes *loci*. Se testó la existencia de dicha asociación mediante el test exacto de Fisher. Este test computa mediante el método de cadena de Markov estimas insesgadas de las probabilidades exactas de la asociación no al azar para todas las tablas de contingencia correspondientes a cada par de *loci* en cada población. Se analizó cada población por separado para evitar distorsiones provocadas por efecto Wahlund. Las probabilidades obtenidas para cada par de *loci* en las ocho poblaciones analizadas se combinaron para obtener una única estima de probabilidad para cada par de *loci* mediante el método de combinación de probabilidades de Fisher (Fisher, 1950; Sokal y Rohlf, 1995). Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa GENEPOP. En la tabla 19 se muestran los 16 pares de *loci* en los que se detectó un valor de probabilidad del test de combinación de probabilidades estadísticamente significativo. Se indican las probabilidades del test exacto de Fisher para cada par de *locus* en cada población analizada y el valor del test de combinación de probabilidades. Muchos de los *loci* que integran estos pares coinciden con *loci* en los cuales se ha detectado a lo largo de este estudio un grado de diferenciación elevado. Estos pares de *loci* se analizaron con mayor detalle mediante el estadístico D' cuyos valores se muestran en la tabla 20 (calculados sólo para aquellos casos en donde no se detectó una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg en ninguno de los dos *locus* que componen el par). La magnitud del desequilibrio gamético detectado en el total de las poblaciones analizadas es elevada ($D' = 0,556 \pm 0,061$) y también lo es considerando sólo las

poblaciones del Atlántico ($D' = 0,542 \pm 0,071$) y sólo las poblaciones del Mediterráneo ($D' = 0,533 \pm 0,057$), mostrando en todos los casos valores muy similares.

El 77,4% de los desequilibrios significativos detectados es debido a alelos frecuentes y sólo el 22,6% a alelos raros. Los valores de D'_{ij} para los alelos frecuentes de estos pares de *loci* se muestran en la tabla 21. El estudio de los desequilibrios gaméticos interalélicos permite un análisis detallado de las asociaciones no aleatorias, ya que proporciona información sobre las asociaciones existentes entre todos los posibles pares de alelos de cada par de *loci*. Los valores de D'_{ij} se distribuyen a lo largo de todo el rango de D'_{ij} (-1 a 1), no observándose diferencias mediante el test U de Mann-Whitney entre los correspondientes a las regiones atlántica y mediterránea.

Tabla 19.- Probabilidades del test exacto de asociación entre genotipos para cada par de loci en cada población analizada. En la última fila se muestran los resultados del test de combinación de probabilidades de Fisher (probabilidad en la línea superior y grados de libertad en la línea inferior) para todas las poblaciones analizadas. Sólo se han incluido en la tabla aquellos pares de loci cuya asociación resulta significativa según el test de combinación de probabilidades de Fisher.

Población	Par de loci															
	7-8	7-10	7-14	7-33	7-42	8-10	8-87	10-45	10-65	16-88	33-127	35-54	39-45	39-47	60-61	66-88
Santander	0,665	0,762	0,521	0,045	0,137	0,779	0,766	0,761	0,014	0,093	0,806	1,000	0,149	0,028	0,002	-
Ribadeo	0,881	0,310	0,909	0,336	0,470	0,351	0,104	0,276	0,668	0,039	0,0001	-	0,001	0,848	0,034	-
Sintra	0,064	0,011	0,883	0,872	0,011	0,006	0,040	0,029	0,131	0,047	0,064	-	0,000	0,106	-	-
Marbella	0,416	0,048	0,837	0,121	1,000	0,521	1,000	0,344	0,059	0,616	0,882	0,008	0,543	1,000	-	-
Aguilas	0,345	0,757	0,015	0,980	0,009	0,006	0,017	0,056	0,046	0,353	0,663	-	0,000	0,648	0,034	1,000
Cullera	0,066	0,392	0,036	0,021	1,000	0,141	1,000	0,785	0,394	0,364	0,779	-	0,000	1,000	-	-
Valencia	0,856	0,814	0,017	0,743	0,694	0,940	0,700	0,298	0,198	0,127	0,581	-	0,000	0,218	-	0,008
Vilanova	0,003	0,049	0,447	0,047	0,410	0,959	0,051	0,007	0,859	0,242	0,701	-	0,0001	0,001	0,002	-
P (-2ΣlnP) (g. l.)	0,032 (16)	0,042 (16)	0,041 (16)	0,036 (16)	0,048 (16)	0,027 (16)	0,050 (16)	0,014 (16)	0,015 (16)	0,021 (16)	0,039 (16)	0,045 (4)	0,000 (16)	0,021 (16)	0,000 (8)	0,046 (4)

Tabla 20.- Valores de D' para los pares de loci que mostraron una asociación estadísticamente significativa según el test de combinación de probabilidades de Fisher. Se indican para cada par de loci, los valores medios y errores estándar de D' (junto con el número de poblaciones, N) en todas las poblaciones analizadas, en las poblaciones del Atlántico y en las del Mediterráneo. En la última fila, los valores medios de D' para todas las combinaciones alélicas junto con sus errores estándar, calculados a partir de las medias de D' de cada par de loci.

Par de loci	Sant.	Riba.	Sint.	Marb.	Agui.	Cull.	Vale.	Vila.	Todas las poblaciones	N	Atlántico	N	Mediterráneo	N
7-8	0,374	-	0,530	0,578	0,485	0,283	-	0,495	0,458 ± 0,045	6	0,494 ± 0,062	3	0,421 ± 0,069	3
7-10	0,475	0,350	0,094	0,473	0,417	0,208	0,491	0,353	0,358 ± 0,050	8	0,348 ± 0,089	4	0,367 ± 0,060	4
7-14	0,658	-	0,292	1,000	0,515	0,469	0,271	0,213	0,488 ± 0,104	7	0,650 ± 0,204	3	0,367 ± 0,074	4
7-33	0,251	-	0,296	-	0,296	-	0,481	0,393	0,343 ± 0,042	5	0,274 ± 0,023	2	0,390 ± 0,053	3
7-42	0,572	0,396	0,933	1,000	0,700	0,297	1,000	0,790	0,711 ± 0,096	8	0,725 ± 0,145	4	0,697 ± 0,148	4
8-10	0,360	-	0,402	0,318	0,347	0,180	-	0,274	0,314 ± 0,032	6	0,360 ± 0,024	3	0,267 ± 0,048	3
8-87	-	-	1,000	0,323	0,654	0,608	-	0,772	0,671 ± 0,110	5	0,662 ± 0,339	2	0,678 ± 0,049	3
10-45	0,138	0,205	-	0,326	0,686	0,016	0,132	1,000	0,358 ± 0,135	7	0,223 ± 0,055	3	0,459 ± 0,232	4
10-65	0,048	0,074	0,000	0,533	0,624	0,391	0,578	0,361	0,326 ± 0,089	8	0,164 ± 0,125	4	0,489 ± 0,065	4
16-88	-	0,617	0,317	0,548	0,487	0,181	0,522	0,453	0,446 ± 0,057	7	0,494 ± 0,091	3	0,411 ± 0,078	4
33-127	0,162	-	0,326	-	0,305	-	-	0,213	0,252 ± 0,039	4	0,244 ± 0,082	2	0,259 ± 0,046	2
35-54	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	1,000 ± 0,000	2	1,000 ± 0,000	2	-	-
39-45	1,000	1,000	-	0,474	1,000	0,898	0,787	0,885	0,863 ± 0,072	7	0,825 ± 0,175	3	0,893 ± 0,044	4
39-47	1,000	0,117	0,524	1,000	0,433	0,507	1,000	0,645	0,653 ± 0,115	8	0,660 ± 0,213	4	0,646 ± 0,126	4
60-61	1,000	1,000	-	-	1,000	-	-	1,000	1,000 ± 0,000	4	1,000 ± 0,000	2	1,000 ± 0,000	2
66-88	-	-	-	-	0,475	-	0,833	-	0,654 ± 0,179	2	-	-	0,654 ± 0,179	2
									0,556 ± 0,061		0,542 ± 0,071		0,533 ± 0,057	

(Sant: Santander; Riba: Ribadeo; Sint: Sintra; Mar: Marbella; Agu: Aguilas; Cull: Cullera; Val: Valencia; Vila: Vilanova i la Geltrú)

Nota: No se han considerado aquellos pares en los que alguno de los loci mostró desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 21.- Valores de D'_{ij} para todas las combinaciones de alelos frecuentes de los pares de loci que mostraron un grado de asociación genotípica estadísticamente significativa según el test exacto de Fisher en el global de las poblaciones analizadas (test de combinación de probabilidades). Se resalta en negrita la combinación de alelos más frecuentes. Se ha testado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los D'_{ij} de cada par alélico de las poblaciones del Atlántico y las del Mediterráneo mediante el test U de Mann-Whitney, cuyas significaciones se muestran en la última columna.

Nota: La combinación de los dos alelos más frecuentes se resalta en negrita. Sant: Santander; Riba: Ribadeo; Sint: Sintra; Marb: Marbella; Agui: Aguilas; Cull: Cullera; Vale: Valencia; Vila: Vilanova i la Geltrú

Par de loci	Par alélico	Sant.	Rib.	Sint.	Marb.	Agui.	Cull.	Vale.	Vila.	Total	Atlántico	Mediterráneo	U
7-8	1 1	0,465**	-	0,462*	-1,000*	0,286	0,214	-	0,385	0,135 ± 0,231	-0,024 ± 0,488	0,295 ± 0,050	0,700
	1 2	-0,274	-	-0,050	0,356	0,194	-0,381	-	-0,250	-0,068 ± 0,119	0,011 ± 0,184	-0,146 ± 0,174	0,700
	1 3	-0,555	-	-1,000	0,236	-1,000*	0,048	-	0,149	-0,354 ± 0,234	-0,440 ± 0,361	-0,268 ± 0,367	1,000
	2 1	-0,365	-	-0,530***	1,000**	-0,429*	-0,135	-	-0,231	-0,115 ± 0,230	0,035 ± 0,485	-0,265 ± 0,087	1,000
	2 2	-0,026	-	0,430	-0,268	-0,032	0,629**	-	0,484**	0,203 ± 0,146	0,045 ± 0,205	0,360 ± 0,201	0,400
	2 3	0,515	-	0,661	-0,383*	1,000*	-0,429*	-	-0,538**	0,138 ± 0,271	0,264 ± 0,326	0,011 ± 0,496	0,700
	3 1	-1,000	-	0,633*	-1,000	1,000*	-1,000	-	-1,000	-0,395 ± 0,386	-0,456 ± 0,544	-0,333 ± 0,667	1,000
	3 2	1,000*	-	-1,000	0,034	-1,000	-1,000*	-	-1,000***	-0,494 ± 0,343	0,011 ± 0,578	-1,000 ± 0,000	0,200
	3 3	-1,000	-	-0,153	0,464	-1,000	1,000**	-	1,000***	0,052 ± 0,375	-0,230 ± 0,424	0,333 ± 0,667	0,400
7-10	1 2	-0,441	-0,374	0,155	0,323*	-0,249	-0,618	-0,560*	0,711**	-0,132 ± 0,168	-0,084 ± 0,190	-0,179 ± 0,307	0,686
	1 3	0,441	0,374	-0,155	-0,260	0,300	0,618	0,560*	-0,699**	0,147 ± 0,165	0,100 ± 0,180	0,195 ± 0,306	0,686
	2 2	0,392	-0,279	-0,058	-0,593**	0,374	0,466	0,044	-0,033	0,039 ± 0,129	-0,135 ± 0,207	0,213 ± 0,123	0,200
	2 3	-0,392	0,279	0,058	0,488**	-0,417	-0,466	-0,044	0,096	-0,050 ± 0,124	0,108 ± 0,188	-0,208 ± 0,139	0,200
	3 2	-1,000	0,508*	0,051	0,573*	-1,000	0,246	0,848	-1,000*	-0,097 ± 0,277	0,033 ± 0,363	-0,227 ± 0,463	0,886
	3 3	1,000	-0,508*	-0,051	-0,562*	1,000	-0,246	-0,848	0,639	0,053 ± 0,259	-0,030 ± 0,362	0,136 ± 0,420	0,886
	1 2	-1,000**	-	-1,000	-1,000*	0,455	0,524	0,068	0,117	-0,262 ± 0,268	-1,000 ± 0,000	0,291 ± 0,116	0,057
	1 3	1,000**	-	1,000	1,000*	-0,455	-0,524	-0,068	-0,117	0,262 ± 0,268	1,000 ± 0,000	-0,291 ± 0,116	0,057
	2 2	0,501	-	-0,125	1,000**	-0,515	0,167	-0,469**	-0,170	0,056 ± 0,206	0,459 ± 0,326	-0,247 ± 0,158	0,114
2 3	-0,531*	-	0,125	-1,000**	0,515	-0,167	0,469**	0,170	-0,060 ± 0,208	-0,469 ± 0,326	0,247 ± 0,158	0,114	
3 2	0,442	-	1,000*	-1,000	1,000	-1,000	-1,000	0,755***	0,110 ± 0,340	0,147 ± 0,596	0,082 ± 0,477	1,000	
3 3	-0,426	-	-1,000*	1,000	-1,000	1,000	-0,755***	0,429	-0,107 ± 0,340	-0,142 ± 0,595	-0,082 ± 0,477	1,000	

Tabla 21.- continuación

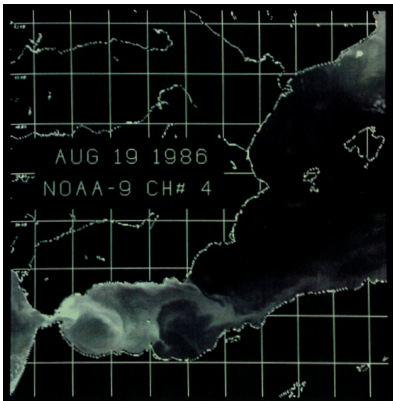
7 -33	1	1	-0,384	-	0,136	-	0,018	-	-1,000	-1,000	-0,446 ± 0,242	-0,124 ± 0,260	-0,661 ± 0,339	0,400
	1	2	0,487*	-	-1,000	-	0,385*	-	0,181	-0,033	0,004 ± 0,266	-0,257 ± 0,744	0,178 ± 0,121	1,000
	1	4	0,090	-	0,406*	-	-1,000	-	0,324	0,430**	0,050 ± 0,269	0,248 ± 0,158	-0,082 ± 0,460	1,000
	1	6	-0,318	-	-0,346	-	-0,384	-	-1,000	-1,000	-0,610 ± 0,160	-0,332 ± 0,014	-0,795 ± 0,205	0,200
	2	1	0,012	-	0,050	-	0,121	-	0,338	-0,319	0,040 ± 0,106	0,031 ± 0,019	0,047 ± 0,193	0,800
	2	2	-0,396	-	-0,056	-	-0,254	-	0,060	0,420*	-0,045 ± 0,140	-0,226 ± 0,170	0,075 ± 0,195	0,400
7 -42	2	4	-0,100	-	-0,582*	-	0,481	-	-0,377*	-0,159	-0,147 ± 0,179	-0,341 ± 0,241	-0,018 ± 0,258	0,800
	2	6	0,225	-	0,254	-	0,195	-	1,000	0,229	0,381 ± 0,155	0,240 ± 0,015	0,475 ± 0,263	1,000
	3	1	0,257	-	-1,000	-	-1,000	-	0,081	0,770***	-0,178 ± 0,354	-0,372 ± 0,629	-0,050 ± 0,515	0,800
	3	2	-1,000	-	-0,007	-	-1,000	-	-0,309	-1,000*	-0,663 ± 0,212	-0,504 ± 0,497	-0,770 ± 0,230	0,800
	3	4	-1,000	-	0,115	-	0,404	-	0,220	-1,000	-0,252 ± 0,309	-0,443 ± 0,558	-0,125 ± 0,441	0,400
	3	6	0,168	-	0,081	-	0,300	-	-1,000	0,081	-0,074 ± 0,235	0,125 ± 0,044	-0,206 ± 0,402	0,800
8 -10	1	1	0,271	-1,000	0,600*	-1,000	0,559**	-1,000	-1,000	0,341	-0,279 ± 0,275	-0,282 ± 0,420	-0,275 ± 0,421	1,000
	1	2	-0,271	1,000	-0,600*	1,000	-0,559**	1,000	1,000	-0,341	0,279 ± 0,275	0,282 ± 0,420	0,275 ± 0,421	1,000
	2	1	-0,726**	-0,132	-1,000**	1,000	-0,745***	1,000	-0,182	-1,000	-0,223 ± 0,291	-0,215 ± 0,444	-0,232 ± 0,445	0,886
	2	2	0,726**	0,132	1,000**	-1,000	0,745***	-1,000	0,182	1,000	0,223 ± 0,291	0,215 ± 0,444	0,232 ± 0,445	0,886
	3	1	0,281	0,396*	-1,000	-1,000	0,424	-1,000	0,297	0,449*	-0,144 ± 0,252	-0,331 ± 0,387	-0,043 ± 0,349	0,343
	3	2	-0,281	-0,396*	1,000	1,000	-0,424	1,000	-0,297	-0,449*	0,144 ± 0,252	0,331 ± 0,387	0,043 ± 0,349	0,343
8 -87	1	2	-0,246	-	-1,000**	-0,543	-0,603*	-0,648*	-	-1,000*	-0,673 ± 0,118	-0,596 ± 0,219	-0,750 ± 0,126	0,400
	1	3	0,246	-	1,000**	0,589	0,619**	0,648*	-	1,000*	0,684 ± 0,116	0,612 ± 0,218	0,756 ± 0,123	0,400
	2	2	-0,417	-	0,313	-0,182	0,309*	0,020	-	0,295	0,056 ± 0,125	-0,095 ± 0,215	0,208 ± 0,094	0,700
	2	3	0,417	-	-0,313	0,024	-0,284	-0,020	-	-0,219	-0,066 ± 0,112	0,043 ± 0,211	-0,174 ± 0,079	0,700
	3	2	0,360	-	0,102	0,353*	0,078	0,433	-	-0,154	0,195 ± 0,092	0,272 ± 0,085	0,119 ± 0,171	0,700
	3	3	-0,360	-	-0,102	-0,292*	-0,165	-0,433	-	0,063	-0,215 ± 0,075	-0,251 ± 0,077	-0,178 ± 0,143	1,000
10 -45	1	1	-	-	-1,000	-0,161	-0,654*	1,000	-	1,000	0,037 ± 0,415	-0,581 ± 0,420	0,449 ± 0,551	0,400
	1	2	-	-	1,000	0,161	0,654*	-1,000	-	-1,000	-0,037 ± 0,415	0,581 ± 0,420	-0,449 ± 0,551	0,400
	2	1	-	-	1,000	-0,161	0,386	-1,000	-	0,755**	0,196 ± 0,357	0,420 ± 0,581	0,047 ± 0,534	0,800
	2	2	-	-	-1,000	0,161	-0,386	1,000	-	-0,755**	0,204 ± 0,356	0,581 ± 0,420	-0,047 ± 0,534	0,800
	3	1	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-0,772***	0,646 ± 0,354	1,000 ± 0,000	0,409 ± 0,591	0,800
	3	2	-	-	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-	0,772***	-0,646 ± 0,354	-1,000 ± 0,000	-0,409 ± 0,591	0,800
10 -45	2	1	0,138	-0,205	-	-0,242	-0,738***	-0,132	0,016	-1,000***	-0,309 ± 0,155	-0,103 ± 0,121	-0,464 ± 0,242	0,629
	2	2	-0,138	0,205	-	0,242	0,738***	0,132	-0,016	1,000***	0,309 ± 0,155	0,103 ± 0,121	0,464 ± 0,242	0,629
	3	1	0,138	0,205	-	0,326*	0,667***	0,132	-0,016	1,000***	0,350 ± 0,136	0,223 ± 0,055	0,446 ± 0,236	1,000
	3	2	-0,138	-0,205	-	-0,326*	-0,667***	-0,132	0,016	-1,000***	-0,350 ± 0,136	-0,223 ± 0,055	-0,446 ± 0,236	1,000

Tabla 21.- continuación

10 - 65	2 1	0,048	0,074	0,000	0,475**	-0,592*	-0,578	-0,391	-0,341	-0,163 ± 0,132	0,149 ± 0,110	-0,476 ± 0,063	0,029
	2 2	-0,048	-0,074	-0,000	-0,475**	0,592*	0,578	0,391	0,341	0,163 ± 0,132	-0,149 ± 0,110	0,476 ± 0,063	0,029
	3 1	-0,048	-0,074	-0,000	-0,533***	0,624*	0,578	0,391	0,361	0,162 ± 0,139	-0,164 ± 0,125	0,489 ± 0,065	0,029
	3 2	0,048	0,074	0,000	0,533***	-0,624*	-0,578	-0,391	-0,361	-0,162 ± 0,139	0,164 ± 0,125	-0,489 ± 0,065	0,029
16 - 88	3 2	-	-0,640**	-0,172	0,170	-0,570***	-0,522*	-0,088	-0,317	-0,306 ± 0,111	-0,214 ± 0,235	-0,374 ± 0,110	0,857
	3 3	-	0,640**	0,291	-0,447	0,422*	0,503*	0,188	0,453*	0,293 ± 0,135	0,161 ± 0,320	0,392 ± 0,070	0,857
	4 2	-	0,397*	-1,000	-1,000	0,390**	0,442	-0,542	0,317	-0,142 ± 0,256	-0,534 ± 0,466	0,152 ± 0,233	0,400
	4 3	-	-0,397*	-0,007	1,000	-0,326	-0,420	-0,025	-0,453*	-0,090 ± 0,195	0,199 ± 0,416	-0,306 ± 0,098	0,229
33 - 127	1 2	0,133	-	1,000	-	0,424	-	-	-	0,519 ± 0,255	0,567 ± 0,434	0,424 ± 0,000	1,000
	1 3	-0,037	-	-1,000	-	-0,424	-	-	-	-0,487 ± 0,280	-0,519 ± 0,482	-0,424 ± 0,000	1,000
	2 2	0,133	-	-0,167	-	-0,423*	-	-	-0,170	-0,157 ± 0,114	-0,017 ± 0,150	-0,297 ± 0,127	0,333
	2 3	-0,037	-	-0,123	-	0,423*	-	-	-0,429	-0,042 ± 0,176	-0,080 ± 0,043	-0,003 ± 0,426	1,000
	3 2	-	-	-	-	1,000	-	-	0,170	0,585 ± 0,415	-	0,585 ± 0,415	-
	3 3	-	-	-	-	-1,000	-	-	0,429	-0,286 ± 0,715	-	-0,286 ± 0,715	-
35 - 54	4 2	-0,350	-	-1,000*	-	0,108	-	-	-	-0,414 ± 0,322	-0,675 ± 0,325	0,108 ± 0,000	0,667
	4 3	0,082	-	1,000**	-	-0,108	-	-	-	0,325 ± 0,342	0,541 ± 0,459	-0,108 ± 0,000	0,667
	6 2	0,133	-	0,167	-	0,119	-	-	-	0,140 ± 0,014	0,150 ± 0,017	0,119 ± 0,000	0,667
	6 3	-0,037	-	-0,093	-	-0,119	-	-	-	-0,083 ± 0,024	-0,065 ± 0,028	-0,119 ± 0,000	0,667
	2 2	1,000	-	-	-1,000	-	-	-	-	0,000 ± 1,000	0,000 ± 1,000	-	-
	3 2	-1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	0,000 ± 1,000	0,000 ± 1,000	-	-
39 - 45	2 1	1,000***	1,000***	-	0,474	1,000***	0,787**	1,000***	0,885***	0,878 ± 0,074	0,825 ± 0,175	0,918 ± 0,051	1,000
	2 2	-1,000***	-1,000***	-	-0,474	-1,000***	-0,787**	-1,000***	-0,885***	-0,878 ± 0,074	-0,825 ± 0,175	-0,918 ± 0,051	1,000
	3 1	-1,000*	-1,000***	-	-0,474	-1,000***	-0,782***	-0,878***	-0,874***	-0,858 ± 0,071	-0,825 ± 0,175	-0,884 ± 0,045	0,857
	3 2	1,000*	1,000***	-	0,474	1,000***	0,782***	0,878***	0,874***	0,858 ± 0,071	0,825 ± 0,175	0,884 ± 0,045	0,857
39 - 47	2 1	-1,000*	0,064	-0,476	1,000	0,353*	-1,000	0,452*	0,731***	0,016 ± 0,270	-0,103 ± 0,427	0,134 ± 0,386	0,686
	2 2	1,000*	-0,064	0,450	-1,000	-0,353*	1,000	-0,452*	-0,722***	-0,018 ± 0,269	0,097 ± 0,425	-0,132 ± 0,385	0,686
	3 1	1,000	0,266	1,000	-1,000	-0,407**	1,000*	-0,507**	-0,556***	0,100 ± 0,291	0,317 ± 0,472	-0,118 ± 0,374	0,486
	3 2	-1,000	-0,266	-1,000	1,000	0,407**	-1,000*	0,507**	0,651***	-0,088 ± 0,295	-0,317 ± 0,472	0,141 ± 0,384	0,686
60 - 61	2 3	1,000	1,000	-	-	1,000	-	-	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000	
66 - 88	2 2	-	-	-	-	1,000	-	-0,188	-	0,406 ± 0,594	-	0,406 ± 0,594	-
	2 3	-	-	-	-	-0,304	-	1,000	-	0,348 ± 0,652	-	0,348 ± 0,652	-

Proteins embody the active life of cells, while nucleic acids represents only plans: There is more to paella than the recipe, more to Bach than ink on paper, and more to a society than its code of laws”.

Anderson y Anderson, 1998



DISCUSIÓN



“La problemática de la genética de poblaciones es la descripción y explicación de la variación genética dentro y entre poblaciones”.

Theodosius Dobzhansky



Todo lo que existe en el universo es fruto del azar y la necesidad.
Demócrito de Abdera

1.- DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA ENTRE MEJILLONES DE CULTIVO Y MEJILLONES DEL INTERMAREAL

Se empleó la técnica de electroforesis bidimensional con anfolitos (técnica clásica) para el estudio de las diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones cultivados en bateas y mejillones del intermareal. El pie de mejillón, además de ser el tejido con el que se obtienen los patrones proteicos bidimensionales de mayor calidad, no se encuentra sujeto a cambios estacionales (como el manto con el ciclo gonadal) ni a contaminantes externos (como la branquia) por lo cual se consideró apropiado para este estudio. Debido a que los procesos de extracción proteica, congelado y descongelado de las muestras, tinción de los geles etc. pueden influir en los resultados (*Dunn, 1987; Klose & Kobalz, 1995*), se realizó previamente un análisis de reproducibilidad cuantitativa. Los resultados de este análisis muestran que la técnica es reproducible y fiable para llevar a cabo estudios comparativos. Otros autores aplicaron este mismo análisis en otras especies y obtuvieron resultados similares (*Higginbotham et al., 1991; Heinke et al., 1998; Tsuji et al., 1999; Vasseur et al., 1999*).

La técnica de electroforesis bidimensional ha permitido separar en un solo gel un promedio de 750 "spots" proteicos reproducibles. Gracias a la elevada sensibilidad de esta técnica, se han podido detectar diferencias en los niveles de expresión entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal en aproximadamente la mitad de los "spots" analizados (45 de 92). Encontrar diferencias en los niveles de expresión entre ambas poblaciones es previsible si se tienen en cuenta las condiciones ecológicas

tan dispares de las que ambas provienen. Los mejillones del intermareal viven en un ambiente estresante con cambios permanentes y cíclicos en la temperatura, exposición al aire, disponibilidad de alimento, etc., los cultivados en bateas crecen en cambio en un ambiente mucho más estable. Los mejillones se adaptan a ambos ambientes alterando su comportamiento fisiológico, de manera que los mejillones de cultivo poseen una mayor capacidad excretora de amonio y una eficiencia de absorción de alimentos también mayor que los mejillones del intermareal (*Labarta et al.*, 1997). Por lo tanto, se espera que existan entre ambos diferencias en la expresión proteica, fruto de estas diferentes adaptaciones fisiológicas. Sin embargo, lo que resulta sorprendente es el elevado número de proteínas que presentan cambios en sus niveles de expresión. Esto demuestra el enorme potencial y sensibilidad de una aproximación de índole proteómico, ya que estos cambios no podrían detectarse mediante un análisis exclusivamente genómico.

3 de los 6 “spots” proteicos que presentan mayores diferencias en los niveles de expresión entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal han sido identificados mediante espectrometría de masas (*López et al.*, 2001), resultando ser actina (“spot” 80), miosina (“spot” 20) y Hsp70 (“spot” 8). Los niveles de proteínas citoesqueléticas (actina y miosina), superiores en mejillones de cultivo que en mejillones del intermareal son difíciles de explicar. En cambio, los niveles de Hsp70 (Heat-shock protein 70), más elevados en los mejillones del intermareal pueden ocurrir como respuesta a los cambios bruscos de temperatura a los que se ven sometidos estos individuos durante la marea baja. Tanto la fisiología como la distribución de los organismos intermareales están muy

influenciados por distintos tipos de estrés físico. Temperatura, radiación ultravioleta y desecación en condiciones de bajamar se suelen considerar los más importantes. Dichos factores ejercen su impacto sobre el metabolismo celular y la capacidad del organismo de adaptarse rápidamente a condiciones ambientales alteradas establece sus límites de distribución mareal. Aunque dichas adaptaciones suelen ser de naturaleza metabólica o por cambios en el comportamiento, otro mecanismo importante es el ajuste de la expresión génica en respuesta a un cambio ambiental. Se ha demostrado de forma general el papel de la familia de proteínas Hsp70 (proteínas de estrés) en las respuestas al estrés térmico (*Hofman y Somero 1996; Feder y Hofman, 1999; Buckley et al., 2001*). Las condiciones de estrés físico pueden ocasionar daños importantes en las estructuras celulares y en las proteínas. Uno de los mecanismos más utilizados por la célula para paliar estos efectos es incrementar la expresión de proteínas de estrés (Hsps) presentes en prácticamente todos los organismos (*Feder y Hofmann, 1999*). Estas proteínas se clasifican en 7 familias atendiendo únicamente a su peso molecular, que varía entre 10 y 110 kDa. Sus funciones son numerosas y muchas de ellas todavía se desconocen pero la más importante es su actividad como chaperona. Cumple esta función uniéndose a las proteínas parcialmente desnaturalizadas y ayudando a su correcto plegamiento tridimensional, disociando agregados proteicos, contribuyendo a la señalización de proteínas dañadas irreversiblemente para su degradación y cooperando en el transporte de los polipéptidos recién sintetizados a sus orgánulos de destino (*Sarto et al., 2000; Buckley et al., 2001*).

Los niveles de Hsp70 en especies del género *Mytilus* se han analizado en numerosos estudios ecológicos de niveles de polución, empleándose como índices bioquímicos de daño celular provocado por la temperatura y también para estudiar la adaptación al ambiente y tolerancia a la temperatura (Hofman y Somero, 1996; Roberts et al., 1997; Chapple et al., 1998).

2.- LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE MEJILLÓN DETECTADA MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Se ha medido el grado de variabilidad genética de *loci* que codifican proteínas abundantes de *Mytilus galloprovincialis* utilizando la técnica de electroforesis bidimensional de alta resolución con anfolitos (técnica clásica). De los 1.200 polipéptidos de pie de mejillón separados en el gel, se seleccionaron de forma insesgada 86 para llevar a cabo el que, para nuestro conocimiento es el primer análisis de variabilidad que se realiza en mejillón haciendo uso de la técnica de electroforesis bidimensional. Se detectó variabilidad genética en 32 (37,2%) de ellos en la población de Ribadeo, obteniéndose un valor de heterozigosis media de $0,101 \pm 0,018$. En la población cultivada en Vilagarcía se encontraron resultados similares, detectándose 26 (30,2%) *loci* polimórficos y una heterozigosis media de $0,114 \pm 0,021$. Ambas son las estimas de heterozigosis media más elevadas que se han detectado hasta la fecha en poblaciones animales mediante electroforesis bidimensional (tabla 4). Son del orden de 5 a 7 veces superiores a las estimadas en estudios anteriores para

Drosophila (el promedio de estimas procedentes de diversos estudios ponderado por el número de *loci* estudiados en cada uno de ellos es 0,021 y 0,023 para *D. melanogaster* y *D. simulans*, respectivamente), ratón (0,020), guepardo (0,013) y hombre (promedio ponderado de estudios en diversos tejidos 0,017). Estos datos muestran claramente la necesidad de extender los análisis de variabilidad genética mediante 2-DE a un mayor número de especies, para poder obtener una visión más amplia de la variabilidad genética de las proteínas abundantes en las poblaciones naturales.

Cuando se comparan las estimas de heterozigosis obtenidas en diferentes especies animales mediante 2-DE con las obtenidas mediante electroforesis de alozimas (1-DE), hay dos aspectos que llaman la atención (tabla 4). Por una parte, aunque los datos de 2-DE disponibles todavía son escasos, se observa en ellos que el rango de variación de las estimas de heterozigosis media para diferentes especies es mucho menor que el encontrado en los datos alozímicos. En mamíferos, por ejemplo, las estimas de heterozigosis varían entre 0 y 22% en 321 especies revisadas por Makarieva (2001). Se ha demostrado que estas variaciones se pueden explicar fundamentalmente por diferencias en el número de *loci* estudiados (Makarieva, 2001). Desde esta perspectiva, el mayor número de *loci* analizados en los estudios de 2-DE podría ser una de las razones por las cuales se detecta en ellos un menor grado de variación de las estimas de heterozigosis en diferentes especies. Por otra parte, aunque el grado de variabilidad genética detectado mediante 2-DE es en general menor que el detectado mediante 1-DE, las especies que muestran un mayor grado de variabilidad genética según los estudios de 1-DE también son más

variables según los análisis de 2-DE (véase tabla 4). De hecho, existe una correlación estadísticamente significativa ($r = 0,838$, g.l. 4, $P < 0,05$) entre las estimas de heterozigosis obtenidas mediante ambas técnicas en las especies incluidas en la tabla 4.

Se han propuesto dos explicaciones para este hecho, no excluyentes mutuamente (*Edwards y Hopkinson, 1980; Aquadro y Avise, 1981; Wanner et al., 1982; Mc Lellan et al., 1983; De Vienne et al., 1996*). Para algunos, el tipo de proteínas analizadas en los geles bidimensionales es intrínsecamente menos variable que las enzimas solubles analizadas en los estudios de 1-DE. Un hecho bien documentado es que la heterozigosis, el número de alelos y el grado de polimorfismo pueden tener cierta correlación con las características funcionales y estructurales de las proteínas. El grado de variabilidad de una proteína puede depender de un gran número de factores diferentes, tales como la agregación de subunidades (*Harris et al., 1977*), el tamaño de las subunidades (*Koehn y Eanes, 1978*), la abundancia relativa de la proteína (*Singh y Coulthard, 1982; Edwards y Hopkinson, 1980*), la integración en membranas o estructuras quinarias (*Klose y Feller, 1981; Mc Conkey, 1982*), la localización subcelular (*Jungblut y Klose, 1985*) y, en el caso de los enzimas, el origen del sustrato (*Gillespie y Kojima., 1968*), la implicación directa en el metabolismo de la glucosa (*Kojima et al., 1970*) y el hecho de que tengan o no función reguladora (*Johnson, 1974*). En la electroforesis bidimensional, se analizan proteínas desnaturalizadas y se emplea un método de tinción inespecífico para visualizarlas por lo que se puede analizar una gran cantidad de proteínas abundantes (solubles o insolubles), entre las cuales normalmente no se detectarán muchas

enzimas, debido a las concentraciones tan bajas a las que éstas suelen encontrarse en las células (*Racine y Langley, 1980; Leigh Brown y Langley, 1979*). Muchas de esas proteínas abundantes forman parte probablemente de componentes estructurales de la célula y las interacciones que establecen con otras moléculas hacen que el número de mutaciones que pueden tener sea limitado (*Mc Conkey, 1982*). Esto es debido a que muchas de las mutaciones que pueden ocurrir en los *loci* que codifican esas proteínas, son probablemente letales, ya que las proteínas defectuosas que producen inactivarían toda la estructura. Esta idea se ve apoyada por varios estudios, entre los cuales destacan, por una parte el realizado por Klose y Feller (1981) en el que se empleó la técnica de 2-DE para analizar el grado de variabilidad genética en ratón, no hallándose variabilidad alguna en las proteínas de membrana pero sí en las proteínas procedentes del citosol. Por otro lado, Singh y Coulthard (1982) demostraron en estudios realizados en *Drosophila* que las proteínas abundantes solubles (que no se encuentran formando parte de estructuras celulares) también tienen un grado de variabilidad menor que los enzimas. Para otros, el menor grado de variabilidad genética detectado en los estudios de 2-DE con respecto a los estudios de 1-DE se debe a que la técnica de 2-DE no es capaz de separar muchas variantes que sí se detectan mediante la electroforesis convencional (1-DE), porque las proteínas que se analizan se encuentran desnaturalizadas, no pudiéndose detectar diferencias conformacionales. En 1982, Wanner et al., testaron la capacidad de la 2-DE para separar variantes alélicas de 5 *loci* previamente analizados mediante 1-DE. Se detectaron mediante electroforesis bidimensional más del 90% (16 de 17) de las variantes alélicas

previamente detectadas mediante 1-DE. La única variante alélica que la 2-DE no fue capaz de separar, era una variante conformacional. Análisis de secuencias de DNA de diferentes clases electroforéticas de varios *loci* enzimáticos (Adh, Gpdh, Sod, Est-5, Est-6 y Xdh) en *Drosophila* confirmaron que la mayor parte de las diferencias en movilidad proteica detectadas por la electroforesis convencional (75-100%) son debidas a cambios en la carga neta de la proteína (Riley *et al.*, 1992; Veuille y King, 1995; Barbadilla *et al.*, 1996). Por tanto, las grandes reducciones en los niveles de variabilidad genética detectados por la electroforesis bidimensional respecto a los detectados por la electroforesis convencional, que varían entre 58 (*Mytilus galloprovincialis*) y 85,2% (hombre) según los datos de la tabla 4, no pueden ser atribuidos a cambios conformacionales no detectables mediante 2-DE. Esto sugiere que la causa más probable es que el tipo de proteínas analizables mediante 2-DE sea intrínsecamente menos variable que las analizables mediante 1-DE. Podría decirse que los estudios de 2-DE permiten obtener una visión más global de la variabilidad existente a lo largo del genoma (Aquadro y Avise, 1981). Esto no quiere decir que las proteínas que analiza esta técnica constituyan una muestra insesgada a la hora de analizar la variabilidad genética. El sesgo existe y está ocasionado en gran medida porque se analizan proteínas que se encuentran dentro de un rango determinado de pH y peso molecular, y porque sólo se analizan las proteínas abundantes de la célula.

De los 406 pares de *loci* analizados para detectar desequilibrio gamético en la población de Ribadeo, 92 mostraron asociaciones estadísticamente significativas. Se trata de una proporción bastante elevada (22,7%) teniendo en cuenta que el tamaño de muestra estudiado

no es muy grande ($2N = 60$) y que la potencia estadística de los tests empleados para detectar desequilibrio gamético es baja cuando las frecuencias alélicas son extremas o el desequilibrio no es relativamente intenso (*Brown, 1975; Zapata y Alvarez, 1992*).

A partir de los análisis realizados se puede extraer además información de ligamiento físico entre algunos *loci* proteicos. Se han detectado grupos de *loci* en los que todos los pares presentan desequilibrio estadísticamente significativo (tablas 6 y 7). En algunos casos, el desequilibrio estadísticamente significativo se encuentra asociado a alelos raros y probablemente se trata de un desequilibrio surgido recientemente y no a ligamiento físico entre dos *loci*, ya que lo más probable es que los alelos raros hayan surgido de manera reciente en la población mediante la introducción de nuevas mutaciones. Son más interesantes aquellos casos en los que el desequilibrio estadísticamente significativo se encuentra asociado a los alelos más frecuentes, ya que se espera que éstos sean alelos antiguos de la población. Aunque existen varios agentes evolutivos que pueden provocar asociaciones entre alelos de diferentes *loci*, se espera que el desequilibrio gamético decaiga a lo largo de las generaciones de forma más lenta cuanto más fuerte sea el ligamiento físico, lo cual permite inferir ligamiento físico a partir de desequilibrio gamético (*Jorde, 1995; Kaplan et al., 1995; Weir 1996; Wu y Zeng, 2001*). En base a esto, se han detectado un grupo de 4 *loci* (58, 76, 79 y 80, tabla 7) y varios grupos de 3 *loci* (39, 79 y 80, tabla 6 etc.) en donde se encuentra un grado de asociación estadísticamente significativo entre todos los pares de alelos frecuentes. Es muy posible que exista ligamiento físico entre los *loci* proteicos que forman parte de dichos grupos. El

conocimiento previo de grupos de *loci* proteicos entre los que existe ligamiento físico provee de una información muy útil a la hora de seleccionar familias informativas para el análisis tradicional de ligamiento (Weir, 1996). Hasta la fecha, la información disponible acerca de ligamiento en marcadores genéticos en mejillones marinos es muy escasa (Beaumont, 1994), de manera que las investigaciones en este campo serán de gran interés.

3.- DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE MEJILLÓN DE LA PENÍNSULA IBÉRICA Y EL FRENTE OCEANOGRÁFICO ALMERÍA - ORÁN.

Todavía más que en el caso del análisis de la variabilidad genética intrapoblacional, el uso de marcadores de 2-DE en los estudios de diferenciación genética entre poblaciones ha estado muy restringido. La complejidad de la técnica, la falta de reproducibilidad entre laboratorios (debido al uso de anfolitos formadores del gradiente en la primera dimensión) y el reducido nivel de variabilidad genética detectado por este tipo de marcadores han sido las principales causas. Los dos primeros inconvenientes se han superado con el desarrollo de la tecnología que emplea IPGs como agentes formadores de gradiente en la primera dimensión. En cuanto al reducido nivel de variabilidad que es capaz de detectar, ya se discutió en la sección anterior la necesidad de extender los análisis de variabilidad genética mediante 2-DE a un mayor número de especies para poder obtener una visión más amplia de la variabilidad genética de las proteínas abundantes en las poblaciones naturales. El

grado de variabilidad intrapoblacional encontrado en este trabajo en poblaciones del mejillón *Mytilus galloprovincialis* es el más alto detectado hasta la fecha en poblaciones animales mediante electroforesis bidimensional. Además, el estudio de la estructura de poblaciones naturales mediante este nuevo tipo de marcadores puede aportar información adicional a la obtenida hasta la fecha mediante el análisis de marcadores de DNA y alozimas. Por todo ello, se ha considerado que este tipo de marcadores son apropiados y podrían ser de gran utilidad para el estudio de la diferenciación genética de poblaciones de mejillón.

Se ha estudiado la diferenciación genética existente entre poblaciones naturales de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis* para 38 *loci* de 2-DE (técnica de IPGs) a lo largo de la Península Ibérica. Para ello se analizaron 8 muestras procedentes de diferentes localidades de la costa española y portuguesa. Se detectó así la existencia de un cambio genético abrupto en el sureste de la Península Ibérica coincidente con el encontrado con anterioridad mediante marcadores alozímicos (Sanjuan *et al.*, 1994, 1997; Quesada *et al.*, 1995a) y de DNA mitocondrial (Quesada *et al.*, 1995b; Sanjuan *et al.*, 1996) en esta misma especie y que aparece asociado geográficamente al frente oceanográfico Almería – Orán.

En los dendrogramas de relaciones filogenéticas obtenidos se observa la existencia de dos grupos claramente diferenciados, uno que agrupa a las poblaciones situadas al oeste de dicho frente oceanográfico (poblaciones de la región atlántica: Santander, Ribadeo, Sintra y Marbella) y otro que agrupa a las poblaciones situadas al este del mismo (poblaciones de la región mediterránea: Aguilas, Cullera, Valencia y Vilanova i la Geltrú), observándose en ocasiones (árbol obtenido mediante

el método NJ) una posición ambigua para la población de Águilas. Cabe destacar, que los valores de distancias genéticas obtenidos en este estudio son más elevados que los detectados por Quesada (1992) y Quesada *et al.*, (1995a) mediante el análisis de marcadores alozímicos en poblaciones de mejillón del mismo área, aunque ambos revelan un patrón de relaciones filogenéticas muy similar. Este resultado contrasta con los obtenidos anteriormente por varios autores en estudios de diferentes especies, en los que las distancias genéticas obtenidas mediante 2-DE eran siempre inferiores a las obtenidas mediante 1-DE (Janczewski *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 1985; Goldman *et al.*, 1989; O'Brien *et al.*, 1987; Slattery *et al.* 1994). Se asume que los *loci* alozímicos, que presentan un mayor número de alelos que los *loci* de 2-DE y un mayor grado de polimorfismo producirán estimas más precisas de distancias genéticas, especialmente en poblaciones íntimamente relacionadas. En cambio, en un estudio reciente, Kalinowski (2002) demostró que se pueden obtener estimas de igual precisión analizando muchos *loci* con pocos alelos que analizando pocos *loci* con muchos alelos. La precisión de dicha estima depende del número total de alelos independientes que se analizan. El número de alelos independientes analizados en este estudio es superior al analizado por Quesada (1992) por lo cual no es de esperar que las estimas de distancia obtenidas en él sean menos precisas que las de aquél. Aunque el número de individuos analizados por Quesada (1992) es superior al analizado aquí, en un estudio de varianza de muestreo, Nei y Roychoudhury (1974) concluyeron que para estimar tanto heterozigosis como distancias genéticas, es preferible estudiar un mayor número de *loci* que un mayor número de individuos. Además, cuando la heterozigosis es

elevada se hace preciso estudiar un mayor número de individuos (Nei, 1978).

El grado de diferenciación detectado entre las poblaciones de mejillón de la Península Ibérica es moderado ($G_{ST}= 0,099$; $\theta= 0,096$) y corresponde en su mayor parte a diferencias entre las poblaciones de la región atlántica y las poblaciones de la región mediterránea (G_{ST} entre regiones: 0,075). Sólo un pequeño porcentaje de la diferenciación total detectada es debida a la diferenciación entre poblaciones de la misma región ($G_{ST}= 0,024$). A pesar del menor grado de variabilidad detectado por la electroforesis bidimensional respecto a la electroforesis de alozimas, la diferenciación genética encontrada entre poblaciones de mejillón de la Península Ibérica en el presente estudio mediante el análisis de marcadores de 2-DE ($G_{ST}= 0,099$ en el área total y $G_{ST}= 0,075$ entre regiones) es del orden de 3 veces superior a la detectada mediante marcadores de alozimas ($G_{ST}= 0,029$ en el área total y $G_{ST}= 0,022$ entre regiones; Quesada *et al.*, 1995a). Todo ello sugiere que el análisis de este nuevo tipo de marcadores puede ser de gran utilidad en el estudio de la diferenciación genética de las poblaciones de mejillón de la Península Ibérica.

Las poblaciones situadas antes y después de dicho frente oceanográfico (poblaciones de la región atlántica y poblaciones de la región mediterránea, respectivamente) se mostraron en general bastante homogéneas genéticamente, tal y como indican los bajos valores de distancias genéticas (poblaciones de la región atlántica: D media = $0,0000 \pm 0,0000$, D_A media = $0,0109 \pm 9 \times 10^{-14}$, D_θ media = $0,0000 \pm 0,0000$; poblaciones de la región mediterránea: D media = $0,0052 \pm 2 \times 10^{-9}$, D_A

media = $0,0163 \pm 2 \times 10^{-10}$, D_{θ} media = $0,0316 \pm 2 \times 10^{-7}$) y de F_{ST} (poblaciones de la región atlántica: $G_{ST}= 0,012$; $\theta= -0,002$; poblaciones de la región mediterránea $G_{ST}= 0,039$; $\theta= 0,028$). Dicha homogeneidad es mayor entre las poblaciones de la región atlántica que entre las poblaciones de la región mediterránea, posiblemente debido a que la distribución de las poblaciones de mejillón en el Atlántico es más continua y menos fragmentada que en el Mediterráneo. Además, las características oceanográficas de la costa atlántica, donde ocurre una gran mezcla de masas de agua (Bowden, 1975) promueven el intercambio larvario evitando la diferenciación entre las poblaciones de toda la costa de la Península Ibérica. Esta elevada homogeneidad afecta incluso a la población de Marbella, que se encuentra dentro del mar de Alborán, en donde las condiciones ecológicas son más características del océano Atlántico que del mar Mediterráneo (Estrada et al., 1985).

El grado de diferenciación detectado es similar al encontrado en las poblaciones ibéricas del molusco *Sepia officinalis* ($F_{ST}= 0,100$), en las cuales también se detectó la existencia de un cambio genético asociado al frente oceanográfico Almería-Orán mediante el análisis de marcadores alozímicos (Pérez-Losada et al., 1999; 2002) aunque en ese caso la diferenciación encontrada en las poblaciones de la región atlántica y en las de la región mediterránea fue mayor (F_{ST} región atlántica=0,063; F_{ST} región mediterránea= 0,061). En vieira, se detectaron mediante el análisis de marcadores alozímicos (Ríos et al., 2002), niveles de diferenciación muy inferiores ($F_{ST}= 0,025$ en el área total) que en un 63% son debidas a diferencias entre ambas regiones. Las poblaciones situadas a ambos lados del frente se mostraron también muy homogéneas ($F_{ST}= 0,009$ en la región

atlántica y $F_{ST}= 0,008$ en la región mediterránea), pero a diferencia del caso de mejillón y sepia, corresponden a dos especies distintas, *Pecten jacobaeus* en el Atlántico y *Pecten maximus* en el Mediterráneo. También se detectó un patrón de diferenciación asociado al frente Almería – Orán en poblaciones naturales de los crustáceos *Meganyctiphanes norvegica* (Zane et al., 2000), *Chthamalus montagui* (Dando y Southward, 1981; Pannacciulli et al., 1997) y *Chthamalus stellatus* (Pannacciulli et al., 1997) y en poblaciones naturales de peces de las especies *Dicentrarchus labrax* (Naciri et al., 1999) y *Gobius paganellus* (Amores et al., 1990). En otras especies, se ha detectado un grado de diferenciación elevado entre poblaciones atlánticas y mediterráneas aunque no se ha determinado su asociación con dicho frente (*Sardinella aurita*: Chikhi et al., 1997; *Platichthys flesus*: Galleguillos y Ward, 1982, Borsa et al., 1997; *Platichthys stellatus*: Borsa et al., 1997; *Merluccius merluccius*: Pla et al., 1991, Roldán et al., 1998; *Aphanius iberus*: Perdices et al., 2001).

El cambio genético entre las regiones atlántica y mediterránea se observó en más de la mitad de los *loci* analizados con una magnitud variable tal y como se refleja en la gran heterogeneidad de los valores de F_{ST} entre *loci*, encontrándose en general asociado a *loci* con un elevado grado de variabilidad genética. Esto sugiere la intervención de factores históricos según los cuales las poblaciones situadas a ambos lados del frente oceanográfico han estado separadas en el pasado y durante el tiempo que estuvieron en situación de alopatría los distintos *loci* experimentaron distintos grados de diferenciación. Según un estudio realizado mediante marcadores de DNA mitocondrial en poblaciones de mejillón de la Península Ibérica (Quesada et al., 1995b), la divergencia

existente entre las poblaciones de la región atlántica y las poblaciones de la región mediterránea data de 2 millones de años atrás. En el Pleistoceno (2 a 1,8 millones de años atrás) y más concretamente durante el Cuaternario, series de períodos glaciares e interglaciares con regresiones y transgresiones marinas asociadas, afectaron el área de conexión entre el Atlántico y el Mediterráneo reduciendo e incluso cerrando totalmente el estrecho de Gibraltar (Maldonado, 1985). Se sabe que estos eventos fueron responsables de extinciones o cambios en la distribución de muchos bivalvos marinos (Raffi et al., 1985). Las poblaciones atlánticas y mediterráneas de *Mytilus galloprovincialis* pudieron estar físicamente aisladas durante esos ciclos y se diferenciaron genéticamente.

Sin embargo, el cambio genético abrupto detectado en el sureste de la Península Ibérica no podría persistir desde entonces en un organismo como *Mytilus galloprovincialis*, caracterizado por la presencia en su desarrollo de una fase larvaria pelágica, sin la intervención de una fuerte selección o la presencia de factores ambientales que limitasen la dispersión larvaria y el flujo génico. Con el tiempo, los valores de F_{ST} deberían converger hacia una situación de equilibrio genético entre el tamaño efectivo de población y el flujo génico. Al estudiar la distribución de los valores de G_{ST} , se observa que el valor del estadístico k de Lewontin y Krakauer (1973) entre las regiones atlántica y mediterránea es superior a 2, tanto en el análisis de alozimas como en el de 2-DE (media de ambos valores $3,938 \pm 0,077$), mientras que dentro de dichas regiones es inferior a 2 en ambos estudios (media: $1,416 \pm 0,291$). Teniendo en cuenta que los efectos específicos de *locus* (selección y/o mutación), y por tanto el valor de k , han de ser mayores en poblaciones con bajos valores de flujo génico

(Baer, 1999), esto podría estar indicando la existencia de una notable restricción al flujo génico entre las regiones atlántica y mediterránea y tal vez la intervención de efectos específicos de *locus* tales como la selección en la diferenciación de las poblaciones a ambos lados del frente Almería - Orán. El flujo génico entre ambas regiones sería, tal y como fue sugerido anteriormente por otros autores (Quesada *et al.*, 1995 a, b; Ladoukakis *et al.*, 2002), insuficiente para contrarrestar los efectos de la selección, mutación y deriva genética. La diferenciación genética detectada de forma concurrente mediante el estudio de tres tipos diferentes de marcadores, así como el que ésta se encuentre asociada geográficamente a la presencia de una barrera oceanográfica entre las regiones atlántica y mediterránea (Frente Almería - Orán) y la existencia de una región de 200-300Km entre Almería y Alicante con asentamientos de mejillón muy limitados (Quesada *et al.*, 1995a), también sugieren la existencia de una restricción actual del flujo génico entre ambas regiones. Se ha tratado de cuantificar la magnitud del flujo génico mediante la estimación del número medio de individuos migrantes por generación (N_m), según el método basado en el valor de F_{ST} (Slatkin, 1985). Al considerar ambas regiones por separado, se obtuvieron estimas de N_m elevadas (20,583 en la región atlántica y 6,160 en la región mediterránea) aunque inferiores a las detectadas por Quesada (1992), sobre todo en la región mediterránea. Este resultado, junto con los valores de N_m por unidad de distancia obtenidos para la región atlántica (2-DE: 91,201; alozimas: 130,017) y para la región mediterránea (2-DE: 15,346; alozimas: 92,897) se encuentran en conformidad con lo esperado en una especie con una elevada capacidad dispersiva, basada en la presencia de una fase en su desarrollo de larva pelágica. Asimismo, explica la gran

homogeneidad genética interna observada dentro de cada una de las dos regiones, y el hecho de que ésta sea superior dentro de la región atlántica que dentro de la región mediterránea. Estos elevados valores de Nm , son comparables a los encontrados en muchas especies de aves, en las que la dispersión a largas distancias es también un fenómeno común. Ambos casos (mejillón y aves) se incluyen en la primera categoría sugerida por Slatkin (1994) que estaría formada por especies con una gran capacidad dispersiva y que presentan unos elevados niveles de flujo génico. En las dos restantes categorías se incluyen respectivamente las especies con una pequeña capacidad de dispersión y unos niveles de flujo génico bajos (muchas especies de salamandra, el roedor subterráneo *Thomomys bottae*, etc) y aquellas especies en las que la dispersión ocurre sobre distancias muy cortas pero en las que ocurre un flujo génico sustancial sobre distancias mucho más grandes (*Drosophila pseudoobscura*, la mariposa *Euphydryas editha* etc.). En mejillón, la magnitud de Nm entre las regiones atlántica y mediterránea (3,083) es inferior a la estimada dentro de dichas regiones (10,167). Estos resultados podrían ser indicativos de la existencia de una restricción al flujo génico entre ambas regiones. El patrón de aislamiento por distancia detectado en las regiones atlántica y mediterránea revela una mínima restricción al flujo génico con la distancia geográfica, tanto para el análisis de alozimas como en el de 2-DE.

Todo parece indicar, que la historia del Mar Mediterráneo, combinada con el patrón hidrográfico actual, pudieron promover y mantener la diferenciación genética observada. Las barreras hidrográficas presentes hoy en día, en particular el frente oceanográfico Almería - Orán, podrían estar implicados en la diferenciación genética observada. El frente

oceanográfico Almería – Orán es una zona de turbulencia en el mar de Alborán que podría restringir la dispersión de larvas de mejillón en ambas direcciones. Se origina al converger el límite nordeste de uno de los dos torbellinos anticiclónicos presentes en el mar de Alborán (el más oriental) con las aguas superficiales mediterráneas más salinas y densas procedentes del sureste peninsular. En él se dan cambios en la temperatura del agua de 1,4°C, y en su salinidad de 2psu en apenas 2 Km (*Tintore et al., 1988*). Las corrientes en el mar de Alborán son fuertes y están sujetas a variaciones estacionales. Ni la composición ni el comportamiento de los dos giros (oriental y occidental) son estables. Las imágenes de satélite revelan que ambos pueden cambiar su dirección e incluso desaparecer. Una de las variaciones más comunes consiste en que el giro oriental desaparece, manteniéndose el occidental. Esto ocurre a final del año cuando el intercambio de agua a través del estrecho es escasa. El giro occidental es permanente pero su posición y tamaño son variables (*Cheney y Doblar, 1982*). El tamaño y la posición del frente está influenciada por el tamaño y posición de los dos giros de Alborán. Cuando el giro oriental está presente, el frente está más al este. Salat et al., 1990 demostraron que en invierno el frente puede llegar a desaparecer. Esta situación podría favorecer cierto intercambio larvario entre las poblaciones próximas al frente, siempre en la dirección de las corrientes marinas, es decir, desde el Atlántico hacia el Mediterráneo. Esto explicaría la posición intermedia que en ocasiones se observa para la población de Águilas. La duración de la fase está correlacionada con el grado de dispersión de las larvas (*Shanks et al., 2003*), especialmente si se trata de especies con una fecundidad muy alta y un elevado tamaño de población. La captura de

larvas procedentes de zonas costeras mar adentro y el bajo nivel de estructuración en las poblaciones marinas lo confirma (*Palumbi, 1994*). Sin embargo, varios estudios demuestran que en ocasiones las larvas no pueden desarrollar toda su capacidad dispersiva (*Burton y Feldman, 1982; Knowlton y Keller, 1986*), e incluso, algunos estudios recientes (*Swearer et al., 1999; Jones et al., 1999*) indican que los niveles de limitación de la dispersión larvaria pueden ser elevados. Además, la migración exitosa de individuos depende en gran medida de si la dispersión de las larvas ocurre sin que estas se mueran, de manera que puedan asentarse y reproducirse en nuevos ambientes (*Hedgecock, 1986*). La fase pelágica de *Mytilus galloprovincialis* dura de una a cuatro semanas durante las cuales las larvas se desplazan activamente en la columna de agua (*Bierne et al., 2002*). Es entonces cuando, si encuentran un sustrato apropiado, tiene lugar la metamorfosis y la fijación al sustrato. En caso de no encontrar un sustrato adecuado, las larvas pueden retrasar la metamorfosis por períodos superiores a un mes (*Gosling, 1992*). Los estadios embrionarios tempranos de los mejillones poseen una tolerancia limitada a cambios ambientales (*Bayne, 1976*). Los factores ambientales que más afectan en el desarrollo de las larvas de mejillón junto con la disponibilidad de alimento son la temperatura y salinidad, que como ya se ha comentado anteriormente, que en la zona del frente Almería - Orán sufren cambios importantes, pudiendo limitar la supervivencia de las larvas de mejillón que llegan a esta zona.

Aparte de la restricción al flujo génico entre ambas cuencas, otros factores pueden estar influyendo en la estructura genética actual de las poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* de la Península Ibérica. En teoría,

la deriva genética y el flujo génico afectan a todos los *loci* de manera similar, sin embargo, la selección y en menor medida la mutación, pueden influir la estructura geográfica de polimorfismos de *loci* concretos. Esto puede provocar heterogeneidad entre *loci* de manera que en algunos de ellos se detecten niveles elevados de diferenciación y en otros diferenciación muy baja o inexistente. Varios estudios en bivalvos han detectado la acción de la selección sobre ciertos *loci* alozímicos (Hilbish y Koehn, 1985; Karl y Avise, 1992; Moraga y Tanguy, 2000; Pogson, 1991; Sarver et al., 1992). El ejemplo más claro de la actuación de la selección natural en moluscos es el caso del *locus Lap-2* en las poblaciones de *Mytilus edulis* de la costa este de Norteamérica (Koehn et al., 1976; Hilbish, 1985) en la que ocurre una adaptación en respuesta a cambios en la salinidad del agua (Koehn, 1983; Koehn et al., 1980; Koehn e Immermann, 1981; Koehn y Siebenaller, 1981).

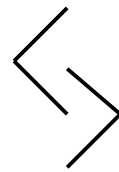
Se detectó la existencia de una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los valores de F_{IS} y los valores de F_{ST} de los *loci* en el total de las poblaciones analizadas y en menor medida en las poblaciones de la región mediterránea, mientras que en las poblaciones de la región atlántica, donde el grado de diferenciación detectado es muy bajo, no se detectó dicha correlación. Este resultado es debido a que los *loci* que presentan un grado de diferenciación mayor entre regiones presentan valores elevados de F_{IS} , y por tanto desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg con defectos de heterocigotos. El hecho de que se detecte una mayor correlación entre los valores absolutos de F_{IS} vs. los valores de F_{ST} (Tabla 15) para las poblaciones del área total sugiere la actuación de la selección natural, ya que ésta puede provocar defectos de

heterocigotos en unos loci y excesos de heterocigotos en otros (sin excluir la presencia de un efecto Wahlund debido a mezcla de poblaciones como el que se observa dentro de las regiones atlántica y mediterránea). Este efecto se observa sólo para los loci de 2-DE, en alozimas, donde el número de loci analizado es mucho más bajo, no se cumple este patrón.

La detección de defectos de heterocigotos en moluscos marinos es un fenómeno detectado comúnmente y que ya se describió para marcadores alozímicos en *Mytilus galloprovincialis* con anterioridad a este trabajo (Sanjuan et al., 1990; 1994; Raymond et al., 1997). Aunque no hay una explicación satisfactoria para este fenómeno, se ha sugerido que pueden estar implicados factores que actúan específicamente sobre algunos loci, como la selección o el efecto Wahlund (Raymond et al., 1997). El estudio comparativo de las correlaciones entre F_{IS} y F_{ST} y entre los valores absolutos de F_{IS} y los valores de F_{ST} confirman que ambos factores podrían estar actuando en las poblaciones ibéricas de mejillón.

Se ha podido detectar la existencia de asociaciones no al azar entre pares de loci de 2-DE, coincidiendo alguno de ellos con loci en los cuales se encontró a lo largo de este estudio un grado de diferenciación elevado. El conocimiento de la identidad de estos loci, mediante su identificación por espectrometría de masas, podría ser una fuente de información importante en futuras investigaciones.

CONCLUSIONES



Se ha empleado la electroforesis bidimensional (2-DE) y otras técnicas proteómicas para estudiar mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk. con el fin de detectar posibles diferencias en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal, así como para analizar la variabilidad genética intrapoblacional de dicha especie y su estructura genética poblacional a lo largo de la Península Ibérica. De los resultados de este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión proteica entre mejillones de cultivo y mejillones del intermareal en 45 de las 92 proteínas analizadas mediante 2-DE (48,9 %). Algunas de estas diferencias pueden interpretarse como adaptaciones a diferentes condiciones ecológicas. En concreto, la expresión de la proteína de estrés Hsp70, muy superior en mejillones del intermareal que en mejillones de cultivo, podría interpretarse como una adaptación a cambios bruscos de temperatura que tienen lugar durante la oscilación de las mareas.

2.- El uso de los marcadores de 2-DE para el estudio de la variabilidad genética se ha restringido hasta la fecha a un pequeño número de especies en las que se encontraron niveles de heterozigosis muy inferiores a los detectados con otros marcadores. Los niveles de variabilidad genética detectados en este estudio en dos poblaciones de mejillón, una natural (heterozigosis media: $0,101 \pm 0,018$) y otra cultivada (heterozigosis media: $0,114 \pm 0,021$) son las más elevadas descritas hasta la fecha en

poblaciones animales mediante electroforesis bidimensional. Es necesario por tanto, estudiar un mayor número de especies para obtener una visión más amplia de la variabilidad genética de las proteínas abundantes en las poblaciones naturales.

3.- El análisis de la estructura de las poblaciones ibéricas de mejillón mediante marcadores de 2-DE permite detectar un cambio genético abrupto en el sureste peninsular coincidente con el encontrado con anterioridad mediante marcadores alozímicos (Quesada, 1992; Sanjuan et al., 1994, 1997; Quesada et al., 1995a) y de DNA mitocondrial (Quesada et al., 1995b; Sanjuan et al., 1996) en poblaciones de esta misma especie. A pesar del menor grado de variabilidad detectado por la 2-DE respecto a la electroforesis de alozimas, la diferenciación genética encontrada en el presente estudio entre poblaciones de mejillón es del orden de 3 veces superior a la detectada mediante marcadores de alozimas.

4.- El cambio genético se observó en más de la mitad de los *loci* analizados con una magnitud variable, encontrándose en general asociado a *loci* con un elevado grado de variabilidad genética, lo cual sugiere la intervención de factores históricos según los cuales las poblaciones atlánticas y mediterráneas de *Mytilus galloprovincialis* estuvieron separadas en el Cuaternario durante series de períodos glaciares e interglaciares con regresiones y transgresiones marinas asociadas, que afectaron el área de conexión entre el Atlántico y el Mediterráneo reduciendo e incluso cerrando totalmente el estrecho de Gibraltar. Durante

el tiempo que estuvieron en situación de alopatria los distintos *loci* experimentaron distintos grados de diferenciación.

5.- Dicho cambio genético aparece asociado geográficamente al frente oceanográfico Almería – Orán, que, en base a las evidencias genéticas obtenidas en este trabajo parece actuar como una barrera que impide el flujo génico entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas de *Mytilus galloprovincialis* contribuyendo a mantener la diferenciación genética entre las mismas.

6.- La magnitud del flujo génico estimada según el número medio de individuos migrantes por generación (Nm) en la región atlántica y en la región mediterránea es elevada (20,583 y 6,160 respectivamente) tal y como se espera de una especie con una elevada capacidad dispersiva. El valor de Nm es inferior entre ambas regiones (3,083) que dentro de ellas (10,167), lo cual podría ser indicativo de la existencia de una restricción al flujo génico entre las regiones atlántica y mediterránea. En ambas, se ha detectado una mínima restricción al flujo génico con la distancia geográfica dentro del área estudiada (1700Km en la región atlántica y 970Km en la mediterránea).

7.- Se ha detectado la existencia de correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre los valores de F_{IS} y los valores de F_{ST} de los *loci* analizados que sugieren, además de un posible efecto de mezcla de poblaciones (efecto Wahlund), la actuación de la selección

CONCLUSIONES

natural entre las poblaciones situadas a ambos lados de dicho frente oceanográfico.

8.- El estudio de marcadores de 2-DE ha permitido detectar asociaciones no al azar o desequilibrio de ligamiento entre *loci* que codifican proteínas abundantes en poblaciones naturales de *Mytilus galloprovincialis*.

Anderson NL, Anderson NG (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19: 1853-1861.

Aquadro CF, Arise JC (1981). Genetic divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3784-3788.

Amores A, Giles V, Thode G, Alvarez C (1990). Adaptative character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Astius pasanellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* 65: 151-154.

Asakawa J, Takahashi N, et al. (1981). Two-dimensional gel studies of genetic divergence between Amerindians and Japanese. *Am J Phys Anthropol* 54: 1-10.

Barbadilla A, King LM (1981). Genetic divergence between Amerindians and Japanese: electrophoretic variation tell us. *Am J Phys Anthropol* 54: 427-432.

Bargelloni L, Ritchie PA, Pattarnello T, Battaglia B, Lambert DM, Meyer A (1994). Molecular evolution at subzero temperature: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. *Mol Biol Evol* 11: 854-863.

Barsotti G, Merluzzi C (1968) Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Conchiglie (Milan)*, 4: 50-58.

BIBLIOGRAFÍA



Anderson NG, Anderson NL (1996). Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* **17**: 443-453.

Anderson NL, Anderson NG (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**: 1853-1861.

Aquadro CF, Avise JC (1981). Genetic divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3784-3788.

Amores A, Giles V, Thode G, Alvarez C (1990). Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* **65**: 151-155.

Asakawa J, Takahashi N, Rosenblum BB, Neel JV (1985). Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum. Genet.* **70**: 222-230.

Baer CF (1999). Among-locus variation in F_{ST} : fish, allozymes and the Lewontin-Krakauer test revisited. *Genetics* **152**: 653-659.

Barbadilla A, King LM, Lewontin RC (1996). What does electrophoretic variation tell us about protein variation? *Mol Biol Evol* **13**: 427-432.

Bargelloni L, Ritchie PA, Pattarnello T, Battaglia B, Lambert DM, Meyer A (1994). Molecular evolution at subzero temperature: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. *Mol Biol Evol* **11**: 854-863.

Barsotti G, Merluzzi C (1968) Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Conchiglie* (Milan), **4**: 50-58.

Bayne BL (1976). The biology of mussel larvae. En: Bayne BL (ed) Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 81-120.

Beaumont AR (1994). Linkage studies in *Mytilus edulis*, the mussel. *Heredity* **72**: 557-562.

Bierne N, David P, Boudry P, Bonhomme F (2002). Assortative fertilization and selection at larval stage in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Evolution* **56**: 292-298.

Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermaier R, Postel W (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**: 317-339.

Bjellqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hochstrasser D (1993). Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* **14**: 1375-1378.

Bornans M, Garret C, Thompson KR (1986). Seasonal variability of the surface inflow through the Strait of Gibraltar. *Oceanol Acta* **9**:403-414.

Borsa P, Blanquer A, Berrebi P (1997). Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Mar Biol* **129**: 233-246.

Bowden KF (1975). Oceanic and estuarine mixing processes. Riley JP, Skirrow G (eds) *Chemical oceanography* vol. 1, Academic Press, London 1-41.

Brown AHD (1975). Samples sizes required to detect linkage disequilibrium between two of three loci. *Theor. Popul. Biol.* **8**: 184-201.

Buckley BA, Owen ME, Hofman GE (2001). Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J Exp Biol* **204**: 3571-3579.

Burton RS, Feldman MW (1982). Population genetics of coastal and estuarine invertebrates: does larval behaviour influence population structure?. *Estuarine Comparisons* (ed. Kenedy VS), pp. 537-551. Academic Press, New York.

Byrjalsen I, Mose Larsen P, Fey SJ, Nilas L, Larsen MR, Christiansen C (1999). Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: characterization of proteins with increased expression in hyperplasia and adenocarcinoma. *Mol. Human. Reprod.* **5**: 748-756.

Carballo JL, Naranjo S, García-Gómez JC (1997). Where does the Mediterranean sea begin? Zoogeographical affinities of litoral sponges of the Strait of Gibraltar. *J. Biogeography* **24**: 223-232.

Chakraborty R, Danker-Hopfe H (1991). Analysis of population structure: A comparative study of different estimators of Wright's fixation indices. En: Handbook of statistics, vol 8. Elsevier Science Publishers B.V. 203-254.

Chapple JP, Smerdon GR, Berry RJ, Hawkins AJS (1998). Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J Exp Mar Biol Ecol* **229**: 53-68.

Cheney RE, Dobljar RA (1982). Structure and variability of the Alboran sea frontal system. *J Geoph Res* **87**: 585-594.

Chikhi L, Agnese JF, Bonhomme F (1997). Strong differences of mitochondrial DNA between Mediterranean and Eastern Atlantic populations of *Sardinella aurita*. *CR Acad Sci III* **320**: 289-297.

Cockerham CC (1973). Analyses of gene frequencies. *Genetics* **74**: 679-700.

Comings DE (1982). Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. III. Genetic and non-genetic variations in 145 brains. *Clin. Chem.* **28**: 798-804.

Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Görg A (1994). Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* **15**:1205-1211.

Coulthart MB, Singh RS (1988). Low genic variation in male-reproductive-tract proteins of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 167-181.

Dando PR, Southward AJ (1981). Existence of "Atlantic" and "Mediterranean" forms of *Chthamalus montagui* (Crustacea, Cirripedia) in the western Mediterranean. *Mar Biol Lett* **2**: 239-248.

Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. R. Stat. Soc. B.* **39**: 1-38.

De Vienne D, Burstin J, Gerber S, Leonardi A, Le Guilloux M, Murigneux A (1996). Two-dimensional electrophoresis of proteins as a source of monogenic and codominant markers for population genetics and mapping the expressed genome. *Heredity* **76**: 166-177.

Dunn MJ (1987). Advances in electrophoresis volumen I. Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ (Ed.): VCH, Weinheim.

Edwards Y, Hopkinson DA (1980). Are abundant proteins less variable?. *Nature* **284**: 511-512.

Efron B (1982) The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. CBMS-NSF *Regional Conference Series in Applied Mathematics*, Philadelphia, PA.

Estrada M, Vives F, Alcaraz M (1985). Life and the productivity of the the open sea. Western Mediterranean. Margalef R (ed). Oxford: Pergamon 148-197.

Excoffier L, Slatkin M (1995). Maximum likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 921-927.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.

Feder ME, Hofmann GE (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* **61**: 243-282.

Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

Fisher RA (1950). *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, London.

Fuentes J, Gregorio V, Giráldez R, Molares J (2000). Within-raft variability of the growth rate of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultivated in the Ría de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* **189**: 39-52.

Galleguillos RA, Ward RD (1982). Genetic and morphological divergence between populations of the flatfish *Platichthys flesus* (L.) (Pleuronectidae). *Biol J Linn Soc* **17**: 395-408.

Gibbons JD (1992). *Nonparametric statistical inference*. McGraw-Hill.

Gillespie JH, Kojima K (1968). The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in non-specific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**:582-585.

Goldman D, Giri PR, O'Brien SJ (1987). A molecular phylogeny of the hominoid primates as indicated by two-dimensional protein electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3307-3311.

Goldman D, Giri PR, O'Brien SJ (1989). Molecular genetic-distance estimates among the Ursidae as indicated by one- and two- dimensional protein electrophoresis. *Evolution* **43**: 282-295.

Goldman D, Merrill CR (1983). Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* **35**: 827-837.

Goldman D, O'Brien SJ (1993). Two-dimensional protein electrophoresis in phylogenetic studies. Zimmer EA, White TJ, Cann RL, Wilson AC (eds) *Molecular evolution: producing the biochemical data. Methods in enzymology*, vol **224**:113-121.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**: 1037-1053.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W (1999). Recent developments in 2-D gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20**: 712-717.

Görg A, Postel W, Friedrich C, Kuick R, Strahler JR, Hanash SM (1991). Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. *Electrophoresis* **12**: 653-658.

Görg A, Postel W, Günther S (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546.

Gosling EM (1992). Genetics of *Mytilus*. En: Gosling EM (Ed.) The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier. Amsterdam. pp.309-373.

Grant WS, Cherry MI (1985). *Mytilus galloprovincialis* Lmk. In southern Africa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **90**: 179-191.

Guo SW, Thompson EA (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361-372.

Hamaguchi H, Ohta A, Mukai R, Yabe T, Yamada M (1981). Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional electrophoresis. 1. Detection of genetic variant polypeptides in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Hum. Genet.* **59**: 215-220.

Hanash SM, Baier LJ, Welch D, Kuick R, Galteau M (1986a). Genetic variants detected among 106 lymphocyte polypeptides observed in two-dimensional gels. *Am. J. Hum. Genet.* **39**: 317-328.

Hanash SM, Neel JV, Baier LJ, Rosenblum BB, Niezgoda W, Markel D (1986b). Genetic analysis of thirty-three platelet polypeptides detected in two-dimensional polyacrylamide gels. *Am. J. Hum. Genet.* **38**: 352-360.

Harris H, Hopkinson DA (1972). Average heterozygosity per locus in man: An estimate based on the incidence of enzyme polymorphisms. *Ann. Hum. Genet.* **36**: 9-20.

Harris H, Hopkinson DA, Edwards H (1977). Polymorphism and the subunit structure of enzymes: a contribution to the neutralist-selectionist controversy. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 698-701.

Hauschildt M, Rinna J, Rullkötter J (1999). Molecular indicators of the supply of marine and terrigenous organic matter to a pleistocene organic-matter-rich layer in the Alborán basin (Western Mediterranean Sea). *Proc Oc Drill Prog* **161**:391-400.

Hedgehock D (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bull Mar Sci* **39**: 550-564.

Hedrick PW (1987). Gametic disequilibrium measures; proceed with caution. *Genetics* **117**: 331-341.

Heinke MY, Wheeler CH, Chang D, Einstein R, Drake-Holland A, Dunn MJ, dos Remedios CG (1998). Protein changes observed in pacing-induced heart failure using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 2021-2030.

Hernández JL, Weir BS (1989). A disequilibrium coefficient approach to Hardy-Weinberg testing. *Biometrics* **45**: 53-70.

Heukeshoven J, Dernick R (1985). Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112.

Higginbotham JW, Smith JS, Smith OS (1991). Quantitative analysis of two-dimensional protein profiles of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Electrophoresis* **12**: 425-431.

Hilbish TJ (1985). Demographic and temporal structure of an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* **86**: 163-171.

Hilbish TJ, Koehn RK (1985). The physiological basis of natural selection at the Lap locus. *Evolution* **39**: 1302-1317.

Hill WG (1974). Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* **33**: 229-239.

Hochstrasser, DF (1998). Proteome in perspective. *Clin Chem Lab Med* **36**: 825-836.

Hofmann GE, Somero GN (1996). Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar Biol* **126**: 65-75.

Janczewski DN, Goldman D, O'Brien SJ (1990). Molecular genetic divergence of Orang Utan (*Pongo pygmaeus*) subspecies based on isozyme and two-dimensional gel electrophoresis. *J. Heredity* **81**: 375-387.

Johnson GB (1974). Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* **184**: 28-37.

Jones GP, Milicich MJ, Emslie MJ, Lunow C (1999). Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature* **402**: 802-804.

Jorde LB (1995). Linkage disequilibrium as a gene-mapping tool. *Am J Hum Genet* **56**: 11-14.

Jungblut P, Klose J (1985). Genetic variability of proteins from mitochondria and mitochondrial fractions of mouse. *Biochem Genet* **23**: 227-245.

Kalinowski ST (2002). How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**: 62-65.

Kaplan NL, Hill WG, Weir, BS (1995). Likelihood methods for locating disease genes in nonequilibrium populations. *Am J Hum Genet* **56**: 18-32.

Karl SA, Avise JC (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* **256**: 100-102.

Kirby GC (1975). Heterozygote frequencies in small subpopulations. *Theor. Popul. Biol.* **8**: 31-48.

Klose J (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik* **26**: 231-243.

Klose J, Feller M (1981). Genetic variability of proteins from plasma membranes and cytosols of mouse organs. *Biochem Genet* **19**: 859-870.

Klose J, Kobalz U (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**: 1034-1059.

Knowlton N, Keller BD (1986). Larvae which fall far short of their potential: highly localized recruitment in an alepid shrimp with extended larval development. *Bull Mar Sci* **39**: 213-223.

Koehn RK (1983). Biochemical genetics and adaptation in molluscs. En: Saleuddin, ASM, Wilbur KM (Ed.) *The mollusca*, vol.2: Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press. pp. 305-330.

Koehn RK, Eanes WF (1978). Molecular structure and protein variation within and among populations. *Evol Biol* **11**: 39-100.

Koehn RK, Immerman FW (1981). Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis* I. Dependence of enzyme activity on season, tissue and genotype. *Biochem Genet* **19**: 1115-1142.

Koehn RK, Milkman R, Mitton J (1976). Population genetics of marine pelecypods IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* **30**: 2-32.

Koehn RK, Newell RIE, Immermann FW (1980). Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5385-5389.

Koehn RK, Siebenaller JF (1981). Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis* II. Dependence of reaction rate on physical factors and enzyme concentration. *Biochem Genet* **19**: 1143-1162.

Kojima K, Gillespie J, Tobarí YN (1970). A profile of *Drosophila* species enzymes assayed by electrophoresis. I. Number of alleles, heterozygosities and linkage disequilibrium in glucose-metabolizing systems and some other enzymes. *Biochem Genet* **4**: 627-637.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* Vol.17, **12**: 1244-1245.

Labarta U (2000). Desarrollo e innovación empresarial en la acuicultura: una perspectiva gallega en un contexto internacionalizado. Documentos de Economía nº6 CIEF Caixa Galicia.

Labarta U (2004). El mejillón, un paradigma bioeconómico. En: Bateiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica. CIEF Caixa Galicia. Ed. Galaxia.

Labarta U, Fernández-Reiríz MJ, Babarro JMF (1997). Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* **152**: 167-173.

Ladoukakis ED, Saavedra C, Magoulas A, Zouros, E (2002). Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black sea. *Mol Ecol* **11**: 755.

Laemli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri – Graven Y (2002). Geographic Structure in the European Flat Oyster (*Ostrea edulis* L.) as Revealed by Microsatellite Polymorphism. *J Hered* **93**: 331-338.

Leigh Brown AJ, Langley CH (1979). Reevaluation of level of genic heterozygosity in natural populations of *Drosophila melanogaster* by two-dimensional electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 2381-2384.

Levinton JS, Koehn RK (1976). Population genetics of mussels. *Marine Mussels, Their Ecology and Physiology*. Editado por BL Bayne, Cambridge. University Press, Cambridge, págs. 357-384.

Lewontin RC (1964). The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* **49**: 49-67.

Lewontin RC, Krakauer J (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* **74**: 175-195.

Li CC (1976). *Population genetics*. Boxwood, Pacific Grove, California.

Long JC (1986). The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* **112**: 629-647.

López JL, Marina A, Álvarez G, Vázquez J (2002). Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics* **2**: 1658-1665

López JL, Mosquera E, Fuentes J, Marina A, Vázquez J, Alvarez G (2001). Two-dimensional gel electrophoresis of *Mytilus galloprovincialis*: differences in protein expression between intertidal and cultured mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **224**: 149-156.

Louis EJ, Dempster ER (1987). An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics* **43**: 805-811.

Makarieva AM (2001). Variance of protein heterozygosity in different species of mammals with respect to the number of loci studied. *Heredity* **87**: 41-51.

Maldonado A (1985). Evolution of the Mediterranean basins and a reconstruction of the Cenozoic palaeoceanography. Margalef R (ed) *Western Mediterranean*. Pergamon Press, London. 18-61.

Mc Conkey EH (1982). Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3236-3240.

Mc Lellan T, Ames GF, Nikaido K (1983). Genetic variation in proteins: Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Genetics* **104**: 381-390.

Moraga D, Tanguy A (2000). Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environ Toxicol Chem* **19**: 706-711.

Morrissey JH (1981). Silver stain proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**: 307-310.

Mosquera E (2000). Análisis de proteínas de *Mytilus galloprovincialis* mediante electroforesis bidimensional de alta resolución. Tesis de licenciatura. Santiago de Compostela.

Mosquera E, López JL, Alvarez G (2003). Genetic variability of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Heredity* **90**: 432-442.

Naciri M, Lemaire C, Borsa P, Bonhomme F (1999). Genetic Study of the Atlantic/Mediterranean Transition in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Hered* **90**: 591-596.

Neel JV (1990). Average locus differences in mutability related to protein "class" : a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2062-2066.

Nei M (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**:283-292.

Nei M (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* **41**: 225-233.

Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.

Nei M (1986). Definition and estimation of fixation indices. *Evolution* **40**: 643-645.

Nei M, Chakravarty A (1977). Drift variances of F_{ST} and G_{ST} statistics obtained from a finite number of isolated populations. *Theor Popul Biol* **11**:307-325.

Nei M, Chakravarty A, Tateno Y (1977). Mean and variance of F_{ST} in a finite number of incompletely isolated populations. *Theor Popul Biol* **11**: 291-306.

Nei M, Fuerst PA, Chakraborty R (1976). Testing the neutral mutation hypothesis by distribution of single locus heterozygosity. *Nature* **262**: 491-493.

Nei M, Graur D (1984). Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evol. Biol.* **17**: 73-118.

Nei M, Maruyama T (1975). Lewontin-Krakauer test for neutral genes. *Genetics* **80**: 395.

Nei M, Roychoudhury AK (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* **76**: 379-390.

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol* **19**: 153-170.

Nevo E (1978). Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.* **13**: 121-177.

O'Brien SJ, Collier GE, Benveniste RE, Nash WG, Newman AK, Simonson JM, Eichelburger MA, Seal US, Bush M, Wildt DE (1987). Setting the molecular clock in the Felidae: the great cats, panthera. Tilson RL (ed) *Tigers of the world*. Noyes publications, Park Ridge, NJ, 10-27.

O'Brien SJ, Nash WG, Wildt DE, Bush M, Benveniste RE (1985). A molecular solution to the riddle of the giant panda's phylogeny. *Nature* **317**: 140-144.

O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR, Bush M (1983). The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* **221**: 459-462.

O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1142.

Ohnishi S, Leigh Brown AJ, Voelker RA, Langley CH (1982). Estimation of genetic variability in natural populations of *Drosophila simulans* by two-dimensional and starch gel electrophoresis. *Genetics* **100**: 127-136.

Ota T (1993). DISPAN software. Genetic distance and phylogenetic analysis. University Park: Institute of Molecular and evolutionary genetics. The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA.

Palumbi SR (1994). Reproductive isolation, genetic divergence and speciation in the sea. *Ann Rev Ecol Syst* **25**: 547-572.

Pannacciulli FG, Bishop JDD, Hawkins SJ (1997). Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Mar Biol* **128**: 73-82.

Peña D (2001). Fundamentos de estadística. Alianza editorial.

Perdices A, Carmona JA, Fernández-Delgado C, Doadrio I (2001). Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killfish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity* **87**: 314-324.

Pérez-Losada M, Guerra A, Carvalho GR, Sanjuan A, Shaw PW (2002). Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity* **89**: 417-424.

Pérez-Losada M, Guerra A, Sanjuan A (1999). Allozyme differentiation in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) from the NE Atlantic and Mediterranean. *Heredity* **83**: 280-289.

Pla C, Vila A, García-Marin JL (1991). Differentiation de stocks de merlu (*Merluccius merluccius*) par l'analyse genetique: comparition de plusieurs populations Mediterraneennes et Atlantiques du littoral spagnol. FAO, *Rapport Peches* **447**:87-93.

Pogson GH (1991). Expression of overdominant for specific activity at the phosphoglucomutase-2 locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genetics* **128**: 133-141.

Quesada H (1992). Estructura genética de poblaciones naturales del mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Quesada H, Beynon CM, Skibinski DOF (1995b). A Mitochondrial DNA Discontinuity in the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Pleistocene Vicariance Biogeography and Secondary Intergradation. *Mol Biol Evol* **12**: 521-524.

Quesada H, Zapata C, Alvarez G (1995a). A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life - history factors. *Mar Ecol Prog Ser* **116**: 99-115.

Rabilloud T (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**: 3-10.

Rabilloud T, Valette C, Lawrence JJ (1994). Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**: 1552-1558.

Racine RR, Langley DH (1980). Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Nature* **283**: 855-857.

Raffi S, Stanley SM, Marasti R (1985). Biogeographic patterns and Plio-Pleistocene extinction of Bivalvia in the Mediterranean and southern North Sea. *Paleobiology* **11**: 368-388.

Ramagli LS, Rodríguez LV (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563.

Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecunemicism. *J. Heredity* **86**: 248-249.

Raymond M, Väöntö RL, Thomas F, Rousset F, Meeüs T, Renaud F (1997). Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **156**: 225-237.

Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983). Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* **105**: 767-779.

Riley MA, Kaplan SR, Veuille M (1992). Nucleotide polymorphism at the xanthine dehydrogenase locus in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol Biol Evol* **9**: 56-69.

Ríos C, Sanz S, Saavedra C, Peña JB (2002). Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almeria – Orán front. *J Exp Mar Biol Ecol* **267**: 223-244.

Ritchie PA, Lavoue S, Lecointre G (1997). Molecular phylogenetics and the evolution of Antarctic notothenioid fishes. *Comp Biochem Physiol* **118**: 1009-1025.

Roberts DA, Hofmann GE, Somero GN (1997). Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimatization/seasonal and tidal-height comparisons and acclimation effects. *Biol Bull* **192**: 309-320.

Robertson A (1975a). Remarks on the Lewontin-Krakauer test. *Genetics* **80**:396.

Robertson A (1975b). Gene frequency distributions as a test of selective neutrality. *Genetics* **81**: 775-785.

Robertson A, Hill WG (1984). Deviations from Hardy-Weinberg proportions sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* **107**: 703-718.

Roldán MI, García-Marín JL, Utter FM, Pla C (1998). Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity* **81**: 327-334.

Rosenblum BB, Neel JV, Hanash SM (1983). Two-dimensional electrophoresis of plasma polypeptides reveals "high" heterozygosity indices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 5002-5006.

Rosenblum BB, Neel JV, Hanash SM, Joseph JL, Yew N (1984). Identification of genetic variants in erythrocyte lysate by two-dimensional gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* **36**: 601-612.

Rousset F, Raymond M (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* **140**: 1413-1419.

Saavedra C, Zapata C, Alvarez G (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biol* **122**: 95-104.

Saavedra C, Zapata C, Guerra A, Alvarez G (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biol* **115**: 85-95.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Salat J, Castellón A, Font J (1990). Does the Almería-Orán Front disappear sometimes?. *Rapp Comm Int. Mer Medit* **32**: 172.

Sanjuan A, Comesaña AS, De Carlos A (1996). Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the SW European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *J Exp Mar Biol Ecol* **198**: 89-100.

Sanjuan A, Quesada H, Zapata C, Alvarez G (1990). On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on the N.W. coast of the Iberian Peninsula. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **143**: 1-14.

Sanjuan A, Zapata C, Alvarez G (1994). *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **113**: 131-146.

Sanjuan A, Zapata C, Alvarez G (1997). Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. throughout the world. *Ophelia* **47**: 13-31.

Sarto C, Binz PA, Mocarelli P (2000). Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* **21**: 1218-1226.

Sarver SK, Katoh M, Foltz DW (1992). Apparent overdominance of enzyme specific activity in two marine bivalves. *Genetica* **85**: 231-239.

Sawyer T (1987). Química de las aguas mediterráneas. El Mediterráneo Occidental (ed. por R. Margalef) pp128-150. Barcelona, Ed. Omega S.A.

Schneider S, Roesli D, Excoffier L (2000). Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Shanks AL, Grantham B, Carr M (2003). Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol Appl* **13**: S159-S169.

Siegel S (1988). Nonparametric statistics for the behavioural sciences. McGraw-Hill.

Singh RS, Choudhary M, David JR (1987). Contrasting patterns of geographic variation in cosmopolitan sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Biochem. Genet.* **25**: 27-40.

Singh RS, Coulthard MB (1982). Genic variation in abundant soluble proteins of *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura*. *Genetics* **102**: 437-453.

Slatkin M (1985). Gene flow in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst* **16**: 393-430.

Slatkin M (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**: 264-279.

Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*. Ed. L. Real, Princeton.

Slatkin M, Barton NH (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* **43**: 1349-1368.

Slatkin M, Excoffier L (1996). Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using de Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* **76**: 377-383.

Slattery JP, Johnson WE, Goldman D, O'Brien SJ (1994). Phylogenetic Reconstruction of Sout American Felids Defined by Protein Electrophoresis. *J Mol Evol* **39**: 296-305.

Smith SC, Racine RR, Langley CH (1980). Lack of genic variation in the abundant proteins of human kidney. *Genetics* **96**: 967-974.

Sneath PHA, Sokal RR (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco. Freeman.

Sokal RR, Rohlf FJ (1995). Biometry. W.H. Freeman y Co, San Francisco, California.

Stamatis C, Triantatyllidis A, Moutou KA, Mamuris Z (2004). Mitochondrial DNA variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Mol Ecol* **13**: 1377-1390.

Swearer SE, Caselle JE, Lea DW, Warner RR (1999). Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature* **402**: 799-802.

Takahashi N, Neel JV, Nagahata-Shimoichi, Asakawa J, Tanaka Y, Satoh C (1986). Inherited electrophoretic variants detected in a Japanese population with two-dimensional gels of erythrocyte lysates. *Ann. Hum. Genet.* **50**: 313-325.

Takehazi N, Nei M (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**: 389-399.

Tintore J, La Violette PE, Blade I, Cruzado A (1988). A Study of an Intense Density Front in the Eastern Alboran Sea: The Almeria-Oran Front. *J Phys Ocean* **18**: 1384-1397.

Tokita M, Ishii S, Iwami T, Miyazaki JI (2002). Phylogenetic analysis of Antarctic notothenioid fishes based on two-dimensional gel electrophoresis. *Polar Biol* **25**: 163-168.

Tsuji T, Shimohama S, Kamiya S, Sazuka T, Ohara O (1999). Analysis of brain proteins in Alzheimer's disease using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J. Neurol.* **166**:100 -106.

Vasseur C, Labadie J, Hebraud M (1999). Differential protein expression by *Pseudomonas fragi* submitted to various stresses. *Electrophoresis* **20**: 2204-2213.

Veuille M, King M (1995). Molecular basis of polymorphism at the esterase 5B locus in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **141**: 255-262.

Walton KE, Styer D, Gruenstein EI (1979). Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analysed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **254**: 7951-7960.

Ward RD, Skibinski DOF, Woodwark M (1992). Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evol Biol* **26**: 73-159.

Wanner LA, Neel JV, Meisler MH (1982). Separation of allelic variants by two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* **34**: 209-215.

Weir, BS (1996). Genetic data analysis. Sinauer, Sunderland, MA.

Weir BS, Cockerham CC (1978). Testing hypotheses about linkage disequilibrium with multiple alleles. *Genetics* **88**: 633-642.

Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**:1358-1370.

Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323-354.

Wright S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.

Wu R, Zeng ZB (2001). Joint linkage and linkage disequilibrium mapping in natural populations. *Genetics* **157**: 899-909.

Xu CF, Lewis K, Cantone KL, Khan P, Donnelly C, White N, Crocker N, Boyd PR, Zaykin DV, Purvis IJ (2002). *Hum. Genet.* **110**: 148-156.

Zane L, Ostellari L, Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cuzin-Roudy J, Buchholz F, Patarnello T (2000). Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphasiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. *Mar Biol* **136**: 191-199.

Zapata C, Alvarez G (1992). The detection of gametic disequilibrium between allozyme loci in natural populations of *Drosophila*. *Evolution* **46**: 1900-1917.

Zapata C, Rodríguez S, Visedo G, Sacristán F (2001). Spectrum of nonrandom associations between microsatellite loci on human chromosome 11p15. *Genetics* **158**: 1235-1251.