

Análisis de la estructura genética mediante marcadores microsatélites del cromosoma X humano en población gallega

E. SANDE

*Departamento de Biología Fundamental, Área de Genética. Universidad de Santiago
15782 Santiago de Compostela, A Coruña. e-mail:essala@usc.es*

(Recibido, febrero de 2001. Aceptado, Marzo de 2001)

Resumen

SANDE, E. (2001). Análisis de la estructura genética mediante marcadores microsatélites del cromosoma X humano en población gallega. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **11**:

El conocer al ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg que presentan las poblaciones podría ayudarnos a comprender los agentes evolutivos que pueden estar actuando sobre dicha población. Además, este tipo de análisis adquiere gran relevancia en estudios de genética clínica, ya que en la mayoría de sus aplicaciones se requiere asumir ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg, así como la ausencia de asociaciones no al azar entre ellos en cada uno de los marcadores empleados. En el presente trabajo se ha estudiado mediante el estadístico f de Robertson y Hill, el ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg que presentan 10 loci microsatélites comprendidos entre las regiones Xq26 y Xq28 del cromosoma X humano en una población de mujeres de Galicia. Así mismo, se ha analizado el nivel de variabilidad existente en esta región del cromosoma, comparándolo con el del cromosoma 11 en esta misma población, lo cual ha permitido comprobar la existencia de un menor grado de polimorfismo en los marcadores del cromosoma X respecto a los autosomas.

Palabras clave: Cromosoma X, Hardy-Weinberg, heterocigosis, microsatélites, Robertson y Hill.

Abstract

SANDE, E. (2001). Genetic structure analysis employing chromosome X microsatellite markers in galician population. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **11**:

Knowledge of deviations from Hardy-Weinberg proportions in natural populations can help us to understand different evolutionary agents that can be acting in those populations. Moreover, this analysis gets high relevance in clinic genetic because adjustment to Hardy-Weinberg proportions is required in most of its applications, besides the lack of non-random associations between the studied markers. In the present work, deviations from Hardy-Weinberg proportions of 10 microsatellite loci spanned between Xq26 and Xq28 regions of human chromosome X, in a galician women population, has been studied employing the Robertson and Hill f statistic. Variability of this chromosome region has been also studied, and it has been compared with variability of the chromosome 11 in this same population. This comparison has allowed to verify the lower polymorphism of markers located in the chromosome X than autosomes ones.

Key words: DNA, chromosome X, Hardy-Weinberg, heterozygosity, microsatellite, Robertson y Hill.

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios llevados a cabo en el campo de la genética de poblaciones se han centrado en el análisis de diferentes aspectos de la estructura poblacional, tales como los niveles de polimorfismo en diferentes marcadores genéticos o el ajuste a las proporciones genotípicas Hardy-Weinberg en las poblaciones. Los resultados de estos trabajos pueden ser importantes para ayudar a comprender los agentes evolutivos que podrían estar actuando sobre dicha población (LEWONTIN, 1974; HEDRICK, 1985). Este tipo de análisis cobra además gran importancia cuando se estudian microsátélites, repeticiones en tándem de entre 2 y 6 nucleótidos de ADN, y que son una de las más poderosas herramientas empleadas hoy en día en genética humana. Estos marcadores presentan un uso muy extendido, siendo utilizados en muy diversos campos de la genética como la realización de mapas genéticos o estudios de medicina legal, donde son muy empleados en el análisis de paternidades o como identificación personal (“*genetic fingerprinting*”). La mayoría de las aplicaciones de estos marcadores en genética forense requiere asumir Hardy-Weinberg en cada uno de los genes así como la ausencia de asociaciones no al azar entre ellos.

Desde su descubrimiento a principios del siglo pasado, el equilibrio Hardy-Weinberg se ha convertido en un elemento fundamental en las investigaciones de genética poblacional (CROW, 1988). Esta ley establece que en una población de tamaño infinito de organismos con apareamiento al azar, si no existe migración, mutación ni selección natural, las frecuencias alélicas y genotípicas de un locus permanecen estables de generación en generación. Dichas frecuencias genotípicas vendrán dadas por el producto de sus respectivas frecuencias alélicas (HARTL & CLARK, 1989).

Aunque es presumible que ninguna población natural cumpla todos estos supuestos ideales, sí es interesante conocer cómo se ajustan al ideal las frecuencias genotípicas observadas, ya que comparándolas con las esperadas bajo equilibrio Hardy-Weinberg nos ayudaría a descartar

ciertos factores, tales como consanguinidad, deriva, mezcla de poblaciones u otro tipo de fuerzas evolutivas que podrían estar actuando sobre la población (ROBERTSON & HILL, 1984, LESSIOS, 1992, ROUSSET & RAYMOND, 1995).

Por otro lado, se ha postulado que el nivel de polimorfismo de los loci situados en el cromosoma X es menor que en otros cromosomas debido a diferentes tasas de mutación en las líneas germinales de los dos sexos, selección directa sobre el tamaño del alelo o selección *background* (JARNE *et al.*, 1998; SCHAEFFER *et al.*, 1988; AGUADÉ *et al.*, 1989). En este trabajo se presenta un estudio de variabilidad y análisis de Hardy-Weinberg de la población gallega empleando loci microsátélites localizados en el cromosoma X. Esto nos permitirá comparar los niveles de variación detectados en esta muestra con los que han sido descritos para loci autosómicos en esta misma población (ZAPATA *et al.*, 2001), así como con los niveles de variabilidad que este tipo de cromosoma presenta en otras poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis moleculares

Muestras

Este estudio analizó una muestra de 100 mujeres pertenecientes a la población gallega, todas ellas mayores de 40 años y sin relación biológica entre sí, excepto un grupo de individuos pertenecientes a 7 núcleos familiares con los que se ha realizado un análisis de herencia para facilitar una correcta interpretación de los patrones electroforéticos.

De cada individuo se extrajo una alícuota de sangre periférica proporcionada por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Juan Canalejo de A Coruña y el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Para la identificación de los alelos se ha dispuesto de una muestra de ADN de un individuo de genotipo conocido, la cual nos fue pro-

porcionada por el CEPH (Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos) de París.

Todas las muestras de sangre fueron tratadas con EDTA como anticoagulante y transportadas en frío al laboratorio, donde se almacenaron a -40°C para su conservación.

Extracción de ADN y purificación

La purificación del ADN genómico de cada individuo se realizó a partir de 200 μl de sangre utilizando los kits de purificación de DNA QIAmp[®] de Qiagen y NucleoSpin Blood de Macherey-Nagel, siguiendo los protocolos desarrollados por las empresas, y consistentes en una cromatografía de adsorción que proporciona un rendimiento de aproximadamente 30 ng de ADN por μl . Para conservar las suspensiones de ADN obtenidas de cada individuo, éstas fueron congeladas a -40°C .

La obtención de los genotipos multiloci para cada individuo de la muestra se llevó a cabo mediante la aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986). La composición de la mezcla de reacción ha sido la siguiente: Tampón comercial (Promega M190 G), 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9,0 a 25°C) y 0,1% Tritón X-100, Glicerol al 10% (excepto para el marcador DXS1227 que fue al 14%), 2,2 mM MgCl_2 , aproximadamente 0,2 μg de cada uno de los cebadores, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 unidad de *Taq* polimerasa (Promega M 186 E) y 120 ng de ADN genómico. Siendo, para todos los casos, el volumen final de reacción de 25 μl . Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo aplicando el protocolo estándar de DIB *et al.* (1996). Durante la puesta a punto de la técnica para alguno de los marcadores se comprobó empíricamente la necesidad de variar factores como la concentración de cebadores o de glicerol.

Electroforesis y visualización

La separación de los diferentes fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación fue

realizada mediante electroforesis discontinua horizontal en geles ultrafinos de poliacrilamida siguiendo el protocolo desarrollado por HASS *et al.* (1994), con ligeras modificaciones. Tras la separación electroforética, la detección de los patrones de ADN resultantes de los productos de amplificación, se realizó sometiendo los geles a tinción con nitrato de plata. Este tipo de tinción ofrece una elevada sensibilidad y permite una correcta conservación de los geles. La estimación del tamaño de los alelos se ha realizado usando como control al individuo 134702 (DIB *et al.*, 1996) cuyo genotipo es conocido y que fue suministrado por el CEPH. También se emplearon como marcadores de tamaño los fragmentos resultantes de la digestión del ADN de ϕX174 con *Hin fi* y 100bp DNA ladder (Promega, G2101).

Marcadores analizados

Se ha estudiado un total de 10 marcadores genéticos de tipo microsatélite localizados en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X humano. Los loci analizados para este estudio son DXS1211, DXS1232, DXS1205, DXS1227, DXS8043, DXS998, DXS8091, DXS1193, DXS8069 y DXS8061, todos ellos comprendidos entre las zonas Xq26 y Xq28.

Los loci microsatélites representan una clase de loci polimórficos hipervariables en los cuales las variaciones alélicas están causadas por repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas cuya longitud varía entre 1 y 6 pb.

El gran número de alelos, y por ende su elevada heterocigosis, su gran abundancia a lo largo del genoma - aproximadamente 100.000 en todo el genoma humano (JARNE *et al.*, 1998; VALDÉS *et al.*, 1992) -, así como la relativa facilidad de análisis mediante la técnica de la PCR, convierten a estos marcadores en un instrumento particularmente útil para el mapeo génico, análisis forenses y de enfermedades y estudios evolutivos (STIVERS & CHAKRABORTY, 1997).

Variabilidad genética poblacional

Puesto que las técnicas de electroforesis permiten la identificación de las diferentes varian-

tes alélicas en cada uno de los locus, la primera aproximación al cálculo del nivel de variabilidad que existe en la población se realizó mediante la obtención de los índices de heterocigosis por locus. Asumiendo Hardy-Weinberg, la variabilidad genética en un locus se puede calcular a partir de las frecuencias alélicas observadas como la **heterocigosis esperada** (h_e) o **diversidad génica**. Sin embargo, debido a la posible variación del tamaño muestral, es preferible el uso de la **estima insesgada de la heterocigosis esperada** por locus (NEI, 1978):

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

donde p_i representa la frecuencia del alelo i estimada a partir de la muestra, k el número de alelos presentes en cada locus y N el tamaño muestral.

Así mismo, con los datos obtenidos para cada locus (h_i) se puede estimar la **heterocigosis media** para el total de los r loci (NEI & ROYCHOUDHURY, 1974).

$$H = \sum_{i=1}^r h_i / r \quad (2)$$

Análisis estadísticos

Magnitud de las desviaciones

Para el estudio de la magnitud de las desviaciones del equilibrio H-W existen en la literatura un gran número de estadísticos (LI & HORVITZ, 1953; CURIE-COHEN, 1982; WEIR & COCKERHAM, 1984), que si bien para el caso de dos alelos ofrecen resultados idénticos no ocurre así en el caso multialélico. Casi todos los loci de tipo VNTR se caracterizan por tener un gran número de alelos segregando y una distribución de frecuencias sesgada debido a la presencia de alelos en baja frecuencia, por ello se ha empleado el estadístico f de ROBERTSON & HILL (1984). Este estadístico se basa en la desviación de las frecuencias de homocigotos con respecto a las proporciones esperadas asumiendo que la población está en equilibrio.

El estadístico f de Robertson y Hill es un buen estimador de la desviación que se produce cuando hay un exceso de homocigotos originado por apareamientos consanguíneos o la mezcla de poblaciones, y además arroja información de la estructura de la población, ya que si el origen de las desviaciones está en apareamientos consanguíneos el exceso de homocigotos sería el mismo para todos los loci, mientras que si se debe a mezcla de poblaciones, la f sería diferente para todos los genes.

Para cada alelo, la estima de la desviación de lo esperado (f_{ii}) viene dada por la expresión:

$$f_{ii} = \frac{4NT_{ii}}{N_i(2N - N_i)} \quad (3)$$

Para tamaños de muestra grandes, la varianza de esta estima, cuando $f = 0$, es:

$$\text{var}(f_{ii}) (f = 0) = \frac{1}{N} \quad (4)$$

siendo N el tamaño muestral, N_i el número de alelos i en la muestra y T_{ii} la estima insesgada del exceso de homocigotos.

Para un loci con k alelos hay k estimas de f_{ii} , una por cada desviación de cada homocigoto para cada alelo.

El cálculo de la estima global de f para cada locus, (f_T), se obtiene mediante la expresión:

$$f_T = \frac{\sum_{i=1}^k \left(\frac{T_{ii}}{N_i} \right)}{k - 1} \quad (6)$$

donde k es el número de alelos.

Para $f \neq 0$, la varianza de f_T ha sido calculada por la fórmula obtenida por CURIE-COHEN (1982):

Cuando $f = 0$, para tamaños de muestra grandes, esta varianza se aproxima a la obtenida por ROBERTSON & HILL (1984), la cual es independiente de las frecuencias alélicas.

El estadístico de Robertson y Hill es el que menor varianza presenta cuando las frecuencias alélicas difieren de un valor intermedio e incluso para valores de f muy pequeños o iguales

a 0, por lo que se hace muy útil en poblaciones en las que las desviaciones de H-W son pequeñas.

Significación de las desviaciones

La significación de las desviaciones observadas se ha obtenido mediante la aplicación del test chi-cuadrado asociado al estimador f de Robertson y Hill. Para loci multialélicos este test posee mayor potencia estadística que el test X^2 convencional de bondad de ajuste (YASUDA, 1968; EMIGH, 1980; ÁLVAREZ *et al.*, 1989; ROUSSET & RAYMOND, 1995).

Este test adopta la expresión:

$$X^2_T = \frac{(f_T - f_0)^2}{\text{var}(f_T)} \quad X^2_{ii} = \frac{(f_{ii} - f_0)^2}{\text{var}(f_{ii})} \quad (7)$$

Para tamaños de muestra grandes, X^2_T y X^2_{ii} se distribuyen, aproximadamente, como una χ^2 con 1 grado de libertad (ROBERTSON & HILL, 1984; HERNÁNDEZ & WEIR, 1989; WEIR, 1996), aceptándose la hipótesis nula de ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg cuando el resultado obtenido no sobrepasa el valor crítico del 5% ($\alpha = 0,05$) de 3,84 (WEIR 1990).

En la literatura existe una gran cantidad de artículos que tratan de hallar el test más apropiado para el cálculo de la significación del ajuste de una población a las proporciones Hardy-Weinberg. Lo más simple parecería realizar un test de bondad de ajuste para comprobar como se ajustan las frecuencias observadas respecto a las esperadas, pues sus cálculos son relativamente sencillos. Sin embargo, estos tests presentan algunas complicaciones debidas a factores como la falta de independencia de las frecuencias observadas y esperadas, pequeño tamaño muestral o incluso a las propiedades de los microsatélites.

Este tipo de marcadores genéticos, al ser altamente polimórficos, poseen un número de alelos bastante elevado, por lo que, incluso en tamaños de muestra grandes, habrá frecuencias genotípicas muestrales que sean 0, sobre todo aquellas que se corresponden con alelos presentes en muy baja frecuencia en la población (CHAKRABORTY & ZHONG, 1994). Como el valor

de los esperados se emplaza en el denominador, las frecuencias esperadas bajas inflan mucho el valor resultante del test de bondad de ajuste, provocando falsas aceptaciones o rechazos de la hipótesis nula de proporciones Hardy-Weinberg. Por esta razón, como se ha indicado anteriormente, se ha aplicado el test chi-cuadrado asociado al estimador f de Robertson y Hill.

Cuando las frecuencias genotípicas no presentan desviaciones significativas de los valores esperados se asume que están en conformidad con las proporciones Hardy-Weinberg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 10 loci microsatélite resultaron ser bastante variables. Así, el número de alelos por locus encontrado en la población osciló entre 4 (DXS998) y 10 (DXS8043), siendo el valor medio de $7,6 \pm 0,52$.

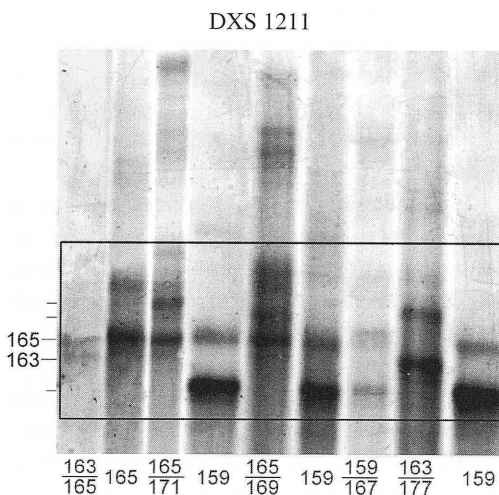


Fig. 1 Patrón electroforético para uno de los microsatélites analizados. El recuadro indica la zona del gel en la que se sitúan las bandas que se corresponden con los alelos y las bandas satélite específicas de alelo. La numeración debajo de cada banda indica el genotipo del individuo, mientras que en la numeración lateral se señalan los alelos observables en cada una de ellas.

TABLA I. Número de alelos y valores de la heterocigosis observada (h_o) y de la heterocigosis esperada (h_e), así como la magnitud (f_T) y significación de las desviaciones de las proporciones H-W para cada uno de los 10 loci analizados

LOCUS	na	h_o	h_e	$f_T \pm SE$	X^2 (g.l= 1)	P
DXS8061	7	0,69	0,70	-0,003 \pm 0,026	0,01	0,935
DXS8069	6	0,60	0,62	0,029 \pm 0,067	0,43	0,514
DXS1193	8	0,69	0,71	-0,003 \pm 0,019	0,01	0,928
DXS998	4	0,66	0,62	-0,045 \pm 0,048	0,59	0,442
DXS8091	8	0,71	0,78	0,066 \pm 0,061	3,03	0,082
DXS8043	10	0,80	0,83	0,038 \pm 0,056	1,32	0,251
DXS1227	8	0,66	0,68	0,054 \pm 0,064	2,06	0,151
DXS1205	8	0,62	0,67	0,018 \pm 0,048	0,22	0,636
DXS1232	8	0,60	0,68	0,052 \pm 0,056	1,89	0,169
DXS1211	9	0,62	0,69	0,029 \pm 0,054	0,70	0,404
Media \pm SE	7,6 \pm ,52	0,66 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02	0,024 \pm 0,01		

Esto también aparece reflejado en los niveles de heterocigosis esperadas, que varían entre 0,623 y 0,833. La comparación entre la heterocigosis esperada y observada refleja en general una buena consonancia entre ambas para todos los loci analizados, si bien los valores de las heterocigosis observadas, cuyo rango oscila entre 0,600 y 0,800, son algo menores, excepto en el caso de DXS998.

En la Tabla 1 se muestran las estimas de variabilidad junto con el análisis de las desviaciones de las proporciones H-W para cada locus. En ningún caso se obtienen desviaciones significativas.

Los valores de las estimas de f_T están próximos a 0, variando entre -0,045 y 0,066. Por tanto, las desviaciones que se detectan son mínimas, tanto hacia un exceso como hacia un defecto de homocigotos. La magnitud de las desviaciones en valor absoluto es de $|f_T| = 0,034 \pm 0,007$.

Cuando se tiene en cuenta el signo de la desviación se observa una cierta tendencia general hacia un defecto de heterocigotos, excepto en los loci DXS8061, DXS1193 y DXS998; de ahí que el valor medio de f_T sea positivo ($f_T = 0,024 \pm 0,010$).

En general se ha observado la existencia de 1 ó 2 alelos por locus cuya frecuencia es superior al 25%, mientras que el resto están en torno al

10% o menos. Además, en todos los loci excepto DXS998, aparecen alelos cuya frecuencia es inferior al 3%.

Al evaluar la magnitud y significación de las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg considerando cada uno de los alelos de cada locus, se observa que la mayoría son de poca magnitud y no significativas.

En la Tabla 2 se muestran las frecuencias alélicas así como el ajuste a las proporciones H-W para cada uno de los alelos indicando el valor del estadístico f_{ii} y el test chi-cuadrado (X^2_{ii}) con su probabilidad.

Tan sólo 6 de los 76 alelos muestran desviaciones significativas (alelo 111 de DXS8091, 177 de DXS8043, 184 de DXS1227, 189 y 191 de DXS1232 y 163 de DXS1211) y, excepto para el alelo 191 de DXS1232, en todos ellos las desviaciones podrían ser debidas a la existencia de individuos homocigotos para cada uno de los alelos mencionados cuando el valor esperado de estos genotipos es sumamente bajo. Así, los valores de f_{ii} para los alelos que no presentan desviaciones significativas, oscilan entre -0,08 (alelo 175 de DXS8043) y 0,18 (alelo 91 de DXS8091). En el caso del alelo 191 de DXS1232, la desviación puede explicarse sencillamente por un error de tipo I.

Al no observarse ningún caso en el que las desviaciones de H-W sean significativas por locus, se puede concluir que las frecuencias genotípicas en la población analizada se ajustan a las proporciones Hardy-Weinberg y por tanto no aportan indicios de la incidencia de fenómenos evolutivos tales como mezcla de poblaciones genéticamente heterogéneas, subestructuración de la población analizada o apareamientos consanguíneos. Además, con los datos obtenidos hemos podido descartar la presencia de alelos nulos en la población.

El ajuste de estos 10 microsatélites a las proporciones esperadas bajo Hardy-Weinberg permitirá el uso de estos loci en la caracterización del desequilibrio gamético existente en la población, estudio que se está desarrollando en la actualidad y será fruto de un posterior trabajo. El conocimiento de la existencia de asociaciones no al azar o no, sería de utilidad en análisis de genética clínica.

El número de alelos por locus detectado en la muestra de la población gallega analizada ha sido muy elevado, entre 4 y 10 (tabla 1). Si bien la mayoría de estos ya habían sido descritos por DIB et al. (1996), en varios de los loci se han encontrado nuevos alelos presentes con una frecuencia inferior al 3%. El mayor número de alelos encontrados probablemente sea consecuencia del mayor tamaño muestral analizado (N = 100). La gran cantidad de alelos así como el considerable nivel de variabilidad que presenta la población podría tener su origen en la elevada tasa de mutación de los microsatélites.

La diversidad de los 10 loci analizados se ha calculado aplicando la estima insesgada de la heterocigosis esperada (h_e) propuesta por NEI (1972), obteniéndose unos valores de heterocigosis del 70% como promedio. Este valor es ligeramente inferior al del 75% encontrado en el telómero del brazo corto del cromosoma 11 en población gallega (ZAPATA *et al.*, 2001) y por tanto, estos datos corroboran los estudios existentes hasta el momento, los cuales indican la presencia de un menor grado de polimorfismo en el cromosoma X respecto a los autosomas (DIB *et al.*, 1996; DIETRICH *et al.*, 1996).

La variabilidad promedio de los loci analizados en el presente análisis de la población gallega está dentro de los límites típicos de estos marcadores hipervariables.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado mediante un Proyecto de Investigación (XUGA-20001B97) concedido por la Xunta de Galicia al Dr. Carlos Zapata Babío. Así mismo, su realización se ha visto facilitada gracias al disfrute de una Bolsa Predoctoral correspondiente al Programa de Biotecnologías do Plan Galego de Investigación e Desenvolvemento otorgada por la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento (DOG 07-08-00) de la Xunta de Galicia. Al Dr. Carlos Zapata por sus orientaciones y por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo. A C. Núñez, T. Velasco, y J. Hermida por sus útiles indicaciones durante todo este tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADÉ, M., MIYASHITA, N., & LANGLEY C. H. (1989). Restriction-map variation at the *zeste-1* region in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, **6**(2): 123-130.
- ALVAREZ, G., ZAPATA, C., AMARO, R., & GUERRA, A. (1989). Multilocus Heterocigosity at protein loci and fitness in the european oyster, *Ostrea edulis*. *Heredity*, **63**: 359-372.
- AYRES, K. L. & BALDING, D.J. (2000). Measuring gametic disequilibrium from multilocus data. *Genetics*, **157**: 413-423.
- CHAKRABORTY, R. & ZHONG, Y. (1994). Statistical power of an exact test of Hardy-Weinberg proportions of genotypic data at a multiallelic locus. *Hum. Hered.*, **44**: 1-9.
- CROW, J. E. (1988). Eighty years ago. The beginnings of population genetics. *Genetics*, **119**: 473-476.
- CURIE-COHEN, M. (1982). Estimates of inbreeding in a natural population: a comparison of sampling properties. *Genetics*, **100**: 339-358.
- DIB, C., FAURÉ, S., FIZAMES, C., SAMSON, D., DROUOT, N., VIGNAL, A., MILLASSEAU, P., MARC, S., HAZAN, J., SEBOUN, E., LATHROP, M., GYAPAY, G., MORISSETTE, J. & WEISSENBACH, J. (1996). A

- comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature*, **380**: 152-154.
- DIETRICH, W. F., MILLER, J. C., STEEN, R. G., MERCHANT, M., DAMRON, D., NAHF, R., GROSS, A., JOYCE, D. C. & WESSEL, M. (1994). A genetic map of the mouse with 4006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genet.*, **7**: 220-225.
- EMIGH, T. (1980). A comparison of test for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics*, **36**: 627-642.
- HARTL, D. L., & CLARK A. G. (1989). *Principles of Population Genetics*, 2nd ed. Sinauer Associates, cop.
- HASS, H., BUDOWLE, B. & WEILER, G. (1994). Horizontal polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis*, **15**: 153-158.
- HERNÁNDEZ, J.L. & WEIR, B.S. (1989). A disequilibrium coefficient approach to Hardy-Weinberg testing. *Biometrics*, **45**: 53-70.
- HEDRICK, P. W. (1985). *Genetic of populations*. Jones and Bartlett, cop., Boston.
- JARNE, P., DAVID, P. & VIARD, F. (1998). Microsatellites, transposable elements and the X chromosome. *Mol. Biol. Evol.*, **15**(1): 28-34.
- LESSIOS, H. A. (1992). Testing electrophoretic data for the agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Marine Biology*, **112**: 517-523.
- LEWONTIN, R. C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press. New York.
- LI, C. C. & HORVITZ, D. G. (1953). Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.*, **5**(2): 107-117.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA "in vitro", the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51** Pt 1: 263-273.
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.
- NEI, M. & ROYCHUDHURY, A. K. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76**: 379-390.
- ROBERTSON, A. & HILL, W. G. (1984). Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, **107**: 703-718.
- ROUSSET, F. & RAYMOND, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, **140**: 1413-1419.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T. & ERLICH, H. A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.
- SCHAEFFER, S. W., AQUADRO, C.F. & ANDERSON, W. W. (1988). Restriction-map variation in the *notch* region of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, **5**: 30-40.
- STIVERS, D. N. & CHAKRABORTY, R. (1997). A test of allelic independence based on distributions of allele size differences at microsatellite loci. *Hum. Hered.*, **47**: 66-75.
- VALDES, A. M., SLATKIN, M. & FREIMER, N. (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, **133**: 737-749.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
- WEIR, B. S. (1990). *Genetic data analysis. methods for genetic population discrete data*. Sinauer Ass, Inc. Pub. Sunderland, Mass.
- WEIR, B. S. (1996). *Genetic data analysis ii. methods for discrete population genetic data*. Sinauer Ass, Inc. Pub. Sunderland, Mass.
- YASUDA, N. (1968). Estimation of the inbreeding coefficient from phenotype frequencies by a method of maximum likelihood scoring. *Biometrics*, **24**(4): 915-935.
- ZAPATA, C., RODRÍGUEZ, S., VISEDO, G. & SACRISTÁN F. (2001). Non random associations between microsatellite loci in human chromosome 11p15. *Genetics* (en prensa).