

Pinzellades sobre evolució molecular i adaptació

Discurs de presentació de Montserrat Agudé i Porres
com a membre numerària de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 11 de maig de 2015



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Pinzellades sobre evolució
molecular i adaptació

Pinzellades sobre evolució molecular i adaptació

Discurs de presentació de Montserrat Agudé i Porres
com a membre numerària de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 11 de maig de 2015

Barcelona, 2015



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Aguadé Porres, Montserrat

Pinzellades sobre evolució molecular i adaptació : discurs de presentació de Montserrat Aguadé i Porres com a membre numerària de la Secció de Ciències Biològiques, llegit el dia 11 de maig de 2015

Bibliografia

ISBN 9788499652665

I. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques II. Títol

1. Evolució molecular 2. Polimorfisme genètic 3. Adaptació (Biologia)

575.852

575.11

575.826

Disseny de la coberta: Azcunce | Ventura

© Montserrat Aguadé i Porres

© 2015, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: maig del 2015

Text revisat lingüísticament per la Unitat de Correcció del Servei Editorial de l'IEC

Compost per Víctor Igual, SL

Imprès a Open Print, SLL

ISBN: 978-84-9965-266-5

Dipòsit Legal: B 12674-2015

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

GENÈTICA I EVOLUCIÓ

La genètica ha tingut un paper cabdal en els estudis evolutius atès que l'evolució es refereix a canvis en les característiques dels organismes al llarg de les generacions, cosa que comporta que aquestes característiques han de tenir un component heretable. Gregor Mendel i Charles Darwin publicaren els seus grans treballs sobre l'herència (Mendel, 1866) i sobre el paper de la selecció natural en l'evolució (Darwin, 1859), respectivament, en el mateix període del segle XIX. No obstant això, i atès que no eren coneixedors del treball de l'altre, va passar cert temps fins que els estudis de caire evolutiu es beneficiaren dels coneixements genètics. Va ser poc després del redescobriment de les lleis de Mendel, a l'inici del segle XX, que aquestes lleis s'aplicaren a tots els individus que integren una població, i es va iniciar la genètica de poblacions així com la genètica evolutiva. És important remarcar que la variació heretable constitueix el substrat del canvi evolutiu, i, per tant, que no es pot donar canvi evolutiu si la variació que observem per un caràcter determinat no té un component heretable, com seria el cas de la variació fenotípica en un conjunt d'individus clònics sotmesos, per exemple, a dietes diferents. És també important remarcar que els mecanismes de canvi evolutiu operen intraespecíficament; és a dir, en una o en les diverses poblacions en què pot estar estructurada una espècie. No obstant això, els canvis en la informació genètica que passen d'una generació a la següent s'acumulen al llarg del temps i en cas de formació de noves espècies donen lloc a les diferències que observem entre espècies.

En el camp de la genètica, el segle XX ha estat marcat per un nombre molt important de descobertes que en els aspectes moleculars van des d'establir que el DNA (o l'RNA en el cas d'alguns virus) és el material hereditari fins a entendre com es regula l'expressió gènica tant en procariotes com en eucariotes, passant,

entre moltes altres, pels canvis soferts en el concepte de *gen* en descobrir-se la seva naturalesa discontinua en eucariotes i la possibilitat que una zona codificadora pugui generar diversos transcrits mitjançant el processament alternatiu dels seus introns. Aquests avenços en el coneixement genètic van estar seguits de prop per la genètica evolutiva, que a partir de la dècada dels seixanta va incloure les molècules —primer les proteïnes i posteriorment els àcids nucleics— com a objecte d'estudi. Naixé d'aquesta manera l'evolució molecular, que pretén entendre com evolucionen els gens i els genomes, així com els productes de la seva expressió. L'avenç en aquesta matèria inclou l'anàlisi de la variació detectada intraespecíficament (polimorfisme) i també interespecíficament (divergència), anàlisi que s'inicià comparant seqüències proteiques i més endavant s'estengué a les seqüències de DNA. També inclou el desenvolupament teòric necessari per explicar les dades generades per aquestes anàlisis —i aquest desenvolupament està arrelat en la genètica de poblacions i evolutiva—, així com el desenvolupament d'eines analítiques per inferir els mecanismes evolutius implicats en l'evolució de les molècules a partir de la comparació de seqüències de DNA.

EVOLUCIÓ MOLECULAR: AVENÇ CIENTÍFIC I DESENVOLUPAMENT TECNOLÒGIC

En el camp de l'evolució molecular es va produir i continua produint-se, com en molts altres camps científics, una retroacció entre els investigadors interessats a contrastar hipòtesis evolutives mitjançant l'adquisició de noves dades a través de l'experimentació i els investigadors interessats en el coneixement i el desenvolupament teòric. A més, en aquesta branca del coneixement, com en d'altres, el desenvolupament tecnològic ha precedit sovint la possibilitat d'accedir a nivells diferents de variació molecular tant en una mateixa espècie (polimorfisme) com entre diverses espècies (divergència).

En el bressol de l'evolució molecular es pot destacar com el desenvolupament de la tècnica de seqüenciació d'aminoàcids (Sanger i Tuppy, 1951) possibilità seqüenciar la mateixa proteïna en diverses espècies, i com el desenvolupament de la tècnica d'electroforesi permeté la seva aplicació a l'estudi de la variabilitat proteica a nivell poblacional (Hubby i Lewontin, 1966). La comparació de seqüències proteiques de diverses espècies revelà que la taxa de substitució aminoacídica per residu aminoacídic era constant en les proteïnes, tot i que podia diferir entre proteïnes o entre diverses parts d'una proteïna (Zuckerlandl i Pauling, 1965). Aquestes observacions conduïren aquests autors a proposar la hipòtesi del rellotge molecular, hipòtesi que manté que les proteïnes poden ser utilitzades com a rellotges per datar esdeveniments del passat perquè acumulen substitucions a una taxa constant. Altrament, l'electroforesi de proteïnes enzimàtiques en individus d'una mateixa espècie revelà nivells importants de variació (Harris, 1966; Lewontin i Hubby, 1966),

resultats que van generar preguntes sobre com la selecció podia mantenir els polimorfismes observats. Les dades empíriques sobre divergència i polimorfisme obtingudes per aquests estudis i altres de variació proteica conduïren a avenços teòrics importants sobre el paper de l'atzar (deriva genètica) i de la selecció natural en l'evolució de les molècules. Entre els importants avenços teòrics d'aquest període es pot destacar, per una banda, la teoria neutralista de l'evolució molecular proposada per Kimura (1968). Aquesta teoria manté que la majoria de les mutacions que segreguen en les poblacions (polimorfisme) i es fixen al llarg de l'evolució (divergència) són selectivament neutres, és a dir que són mutacions que no afecten la probabilitat de sobreviure i reproduir-se (eficàcia biològica) dels seus portadors. Per altra banda, dels diversos treballs sobre models selectius desenvolupats en aquest període es pot destacar, per les seves repercussions posteriors, el treball de Maynard-Smith i Haigh (1974) sobre com l'increment de freqüència d'una mutació selectivament avantatjosa per conduir-la a la fixació afecta el destí de les mutacions selectivament neutres del seu entorn (revisat a Aguadé, 2009).

A l'inici dels anys vuitanta del segle passat es donà un nou punt d'inflexió en el camp de l'evolució molecular ja que per primer cop es pogué detectar i analitzar la variació present a les molècules de DNA en els nivells intraespecífic i interespecífic, ja fos en una part de les regions estudiades utilitzant els patrons de tall de diversos enzims de restricció (Langley *et al.*, 1982; Kreitman i Aguadé, 1986a i 1986b), o en tota la regió estudiada (Kreitman, 1983) utilitzant les tècniques de seqüenciació d'àcids nucleics que havien estat recentment desenvolupades (Sanger *et al.*, 1977; Maxam i Gilbert, 1977). Entre els primers estudis de variació nucleotídica destaquen els que analitzaren la variació present en poblacions de *Drosophila melanogaster*, ja fos en gens que codificaven proteïnes enzimàtiques el polimorfisme de les quals havia estat prèviament estudiat en poblacions naturals i s'havia considerat que era un polimorfisme adaptatiu (per exemple, el gen *Adh* a *D. melanogaster*), ja fos en regions de baixa recombinació (Aguadé *et al.*, 1989; Stephan i Langley, 1989; Berry *et al.*, 1991; Martín-Campos *et al.*, 1992) que d'acord amb el treball desenvolupat per Maynard-Smith i Haigh (1974) eren regions candidates a presentar nivells reduïts de variació. Durant les dècades dels vuitanta i dels noranta, l'esforç inicial s'estengué tant a altres parts del genoma com a altres espècies. Entre els gens objecte d'estudi en el nivell poblacional, predominaren gens considerats candidats al fet que la seva variació hagués estat modelada per la selecció positiva o adaptativa a causa de la seva implicació en processos biològics com per exemple els de resposta a canvis biòtics o abiòtics (Ramos-Onsins i Aguadé, 1998; Kuitinnen i Aguadé, 2000), i els implicats en la reproducció sexual (Aguadé *et al.*, 1992; Círcera i Aguadé, 1997 i 1998; Tsaur i Wu, 1997; Aguadé, 1998 i 1999). Entre les espècies objecte d'estudi predominaren inicialment les espècies ben caracteritzades genèticament (posteriorment anomenades *espècies model*) i les seves espècies properes. Aquest període ini-

cial destaca, tanmateix, per un fort desenvolupament teòric que inclogué, entre d'altres, el desenvolupament de la teoria de la coalescència (Kingman, 1982; Hudson, 1983) i el de diversos models selectius sobre l'efecte tant de la selecció positiva com de la selecció negativa en els nivells de variació neutra (Hudson i Kaplan, 1988; Kaplan *et al.*, 1989; Charlesworth *et al.*, 1993; Braverman *et al.*, 1995), així com el desenvolupament de diversos tests de la teoria neutralista de l'evolució molecular (Hudson *et al.*, 1987; Tajima, 1989; McDonald i Kreitman, 1991; Fay i Wu, 2000).

La publicació a l'inici del segle XXI dels primers genomes complets d'organismes eucariotes —el de *D. melanogaster* per Adams *et al.* (2000) i el d'*Homo sapiens* per Lander *et al.* (2001) i Venter *et al.* (2001)— marcà el començament del que es va anomenar *era postgenòmica*. La disponibilitat de genomes complets junt amb el desenvolupament d'eines experimentals d'alt rendiment i el desenvolupament teòric, analític i bioinformàtic corresponent possibilitaren l'anàlisi de la variabilitat en múltiples regions del genoma (i més endavant a tot el genoma) en el nivell poblacional i han propiciat la coexistència de l'aproximació de gens i regions candidats amb l'aproximació de rastreig genòmic per tal de detectar canvis adaptatius recents en la història de les poblacions estudiades. Altrament, la disponibilitat de genomes complets de múltiples espècies i la seva comparació han permès descobrir canvis adaptatius acumulats en els diversos llinatges i també redescobrir el paper dels canvis estructurals en l'evolució dels genomes.

POLIMORFISME I DIVERGÈNCIA NUCLEOTÍDICS

La variació present a les seqüències de DNA d'una mostra d'individus d'una espècie conté informació sobre la història de la població o espècie estudiada, com a conseqüència que tant els canvis adaptatius com els canvis demogràfics deixen una empremta en la variabilitat. És per aquest motiu que l'anàlisi de la variació present en qualsevol mostra actual de seqüències permet mirar enrere en el temps a través de les empremtes que s'hi puguin detectar.

Polimorfisme nucleotídic i canvis adaptatius

L'empremta que deixen en la variació nucleotídica els canvis adaptatius promoguts per la selecció difereix entre els canvis conduïts per la selecció direccional i els conduïts per la selecció equilibradora. Així, la fixació recent d'una mutació avantatjosa per l'acció de la selecció direccional positiva provoca una davallada en el nivell de variació a la regió que l'envolta (escombrada selectiva; revisat a Aguadé, 2009), i la regió afectada és tant més extensa com major és l'avantatge selectiu (coeficient de selecció) que confereix la mutació i menor és la taxa de recombinació. L'escombrada selectiva serà parcial quan la mutació avantatjosa hagi assolit

una freqüència intermèdia, ja sigui perquè es troba en el seu camí cap a la fixació, ja sigui perquè dirigida per la selecció positiva equilibradora ha assolit recentment la seva freqüència d'equilibri. En ambdós casos, l'empremta deixada per la selecció consistirà en la presència de dos subconjunts de seqüències que diferiran en el seu grau de variació, i únicament el subconjunt amb la mutació adaptativa serà el que presenti una davallada de variació. Per contra, un polimorfisme molt antic mantingut per selecció equilibradora (és a dir, la selecció que manté durant molt de temps dues o més variants en les seves freqüències d'equilibri) provoca un increment de variació en la població de la regió que l'envolta, regió que serà menor com major sigui la seva taxa de recombinació (Hudson i Kaplan, 1988). En tots els casos comentats d'acció de la selecció positiva o adaptativa, l'empremta serà localitzada en el sentit que afectarà la variació únicament en una part més o menys extensa d'una molècula de DNA (o cromosoma) en què s'hagi donat la mutació avantatjosa, però no en altres parts de la mateixa molècula (excepte en el cas que no s'hi doni recombinació) ni en altres molècules (o cromosomes). A més, l'empremta deixada per l'acció recent de la selecció positiva (escombrades selectives totals i parcials) decaurà amb el temps per l'acumulació de noves mutacions neutres. Com ja s'ha fet palès en la descripció anterior, l'empremta deixada per la selecció equilibradora varia en el temps perquè l'empremta associada al seu establiment (escombrada selectiva parcial) difereix de l'associada al seu manteniment sostingut (increment de variació). L'empremta de la primera etapa d'un polimorfisme equilibrat decau en transcórrer el temps, en tant que perquè la de la segona etapa sigui detectable és necessari que el temps transcorregut hagi permès l'acumulació d'un nombre important de mutacions independentment en cadascuna de les dues (o més) classes al·lèliques.

Les poblacions aïllades geogràficament es diferencien genèticament en transcórrer el temps tant per l'origen independent de la variació per mutació com pel destí independent d'aquestes mutacions, ja sigui conduït per la deriva genètica o per les pressions selectives diferencials que es poden produir en cada població (selecció local). La migració d'individus entre poblacions diferenciades contribueix a erosionar aquesta diferenciació excepte en les dianes de la selecció local i zones properes, que presentaran, per tant, una major diferenciació genètica entre poblacions. Aquesta empremta es pot utilitzar per detectar possibles dianes de la selecció local en analitzar la variació nucleotídica en diverses poblacions d'una mateixa espècie.

Polimorfisme nucleotídic i canvis demogràfics

Els canvis en la grandària i l'estructura de les poblacions poden afectar tant el nivell de variació neutra com el seu patró amb relació als esperats d'acord amb les

prediccions del model neutre estàndard (MNE), que correspon a una població de mida constant la variació neutra de la qual ha assolit l'equilibri entre la pèrdua de variació per l'efecte de l'atzar (deriva genètica) i el guany de variació per mutació. Segons l'MNE, la variabilitat és funció de la taxa de mutació i de la grandària efectiva de la població. Es pot entendre, per tant, que la variació neutra present en una població que recentment ha incrementat la seva grandària pugui ser molt inferior a la que aquesta població presentarà quan amb el pas del temps la seva variació hagi assolit l'equilibri deriva-mutació corresponent a la seva major nova grandària. A més, la majoria de les variants sorgides per mutació després d'una expansió poblacional estaran a baixa freqüència i provocaran una alteració temporal del patró de polimorfisme respecte al predit per l'MNE.

A més de canvis de grandària, una població pot dividir-se en dues (o més) poblacions per causes orogràfiques, climatològiques, etc. Mentre les poblacions resultants romanguin aïllades, la seva evolució serà independent. Amb el pas del temps, l'efecte de l'atzar sobre les mutacions neutres que es donin en cada població podrà conduir-ne una fracció a la fixació o a assolir certa freqüència, cosa que provocarà que les poblacions es diferenciïn genèticament com a resultat d'aquests canvis no adaptatius.

Com s'ha remarcat en els dos exemples de canvis demogràfics esmentats, l'empremta que deixa aquest tipus de canvis en la variació nucleotídica pot o bé decaure amb el temps (canvis de grandària) o bé acumular-se amb el temps (estructuració poblacional), de la mateixa manera que succeïa amb els casos esmentats de selecció adaptativa. No obstant això, els canvis demogràfics afecten la variació a tot el genoma, per la qual cosa la seva empremta és generalitzada a diferència de l'empremta localitzada que deixen els canvis adaptatius.

Aquesta visió sintetitzada sobre les empremtes deixades pels canvis adaptatius i pels canvis demogràfics pot induir a pensar que els canvis adaptatius poden ser destriats fàcilment dels canvis no adaptatius pel caràcter localitzat de l'empremta dels primers sobre la variabilitat neutra. S'ha de tenir en compte que l'empremta que deixen els canvis demogràfics sobre la variabilitat arreu del genoma es pot considerar generalitzada, terme que no indica, però, que aquesta empremta sigui idèntica a totes les regions ateses l'efecte del mostreig en cada generació i el desacoblament del destí de les diverses regions per efecte de la recombinació en el cas de regions situades en el mateix cromosoma i de la segregació independent en el cas de diversos cromosomes. Altrament, la selecció natural pot actuar en períodes de canvi demogràfic, per la qual cosa pot superposar-se l'efecte d'ambdós processos sobre els nivells i patrons de variabilitat neutra. Inferir l'acció de la selecció natural sobre la base de models evolutius roman una tasca difícil.

Polimorfisme nucleotídic i caràcters poligènics

En els sistemes complexos que són els organismes, els gens i els seus productes gènics (RNA i proteïnes) no actuen de forma aïllada, sinó que formen part de xarxes gèniques que poden intervenir en diversos processos biològics i afectar múltiples funcions i característiques. Les aproximacions de gens i regions candidats així com de rastreig genòmic que hem comentat es basen a detectar l'empremta que deixen els canvis adaptatius recents en la variació neutra de la regió on es troba la diana de la selecció, diana que pot trobar-se tant en la zona codificadora i afectar la proteïna codificada com en la regió reguladora i afectar l'expressió del gen. La magnitud de l'empremta —i, per tant, la seva detectabilitat— depèn de l'avantatge selectiu que confereix la variant sorgida *de novo* per mutació a més de dependre de la taxa de recombinació a la regió afectada i del temps transcorregut des de l'increment de freqüència de la nova variant. Aquestes aproximacions han permès, per tant, detectar majoritàriament mutacions avantatjoses en gens implicats en caràcters monogènics (per exemple, en la persistència de la lactasa en humans; revisat a Aguadé, 2009) o en gens amb un efecte major en caràcters poligènics (per exemple, el gen *EDA* implicat en la pèrdua d'espines i de plaques que recobreixen el cos de l'espínol *Gasterosteus aculeatus*; revisat a Aguadé, 2013). A més, en relacionar la variació nucleotídica detectada per rastreig genòmic en diverses poblacions amb la informació sobre diverses característiques ambientals s'han observat canvis subtils en les freqüències al·lèliques de polimorfismes en gens diversos possiblement implicats en un mateix caràcter adaptatiu (Hancock *et al.*, 2010). El desenvolupament de models evolutius que considerin la interacció entre múltiples gens possibilitarà el disseny de nous estadístics per tal d'inferir l'acció recent de la selecció positiva en caràcters amb una arquitectura genètica complexa.

Divergència nucleotídica i canvis adaptatius

Els canvis que s'acumulen al llarg de l'evolució corresponen a aquelles mutacions que han assolit una freqüència del cent per cent en la població, és a dir que s'han fixat, podent haver estat conduïdes a la fixació per l'atzar (deriva genètica) o per la selecció direccional positiva. La comparació de seqüències de regions homòlogues en diferents espècies permet estimar el nombre de substitucions (canvis fixats) que s'han acumulat des de la seva divergència (divergència genètica), i també les que s'han acumulat en les diferents branques de la filogènia. Per a les mutacions neutres, la taxa de substitució en un gen o regió genòmica és igual a la seva taxa de mutació —és a dir, a la taxa en què en aquest gen o regió genòmica sorgeixen mutacions que no afecten l'eficàcia biològica dels seus portadors. L'acció de la selecció direccional positiva sobre mutacions que conferiren un avantatge selectiu als seus

portadors pot haver-les conduït a la fixació i haver donat lloc a noves adaptacions. Com a resultat de l'acumulació de substitucions adaptatives en una o diverses branques de la filogènia es produirà un increment en la taxa de substitució perquè inclourà les substitucions adaptatives a més de les neutres, increment que serà detectable quan el nombre de substitucions adaptatives sigui elevat. A les zones codificadores, es pot detectar aquesta acceleració en les posicions no sinònimes mitjançant l'anàlisi comparativa de la divergència en posicions sinònimes i no sinònimes (revisat a Aguadé *et al.*, 2012). Aquesta aproximació permet també detectar l'acumulació de canvis adaptatius en les proteïnes codificades per les dues (o més) còpies resultants del procés de duplicació d'un gen. S'ha d'esmentar que la relaxació de la selecció purificadora en posicions no sinònimes pot incrementar la taxa de substitució perquè comporta un increment en la taxa de mutació neutra (revisat a Aguadé, 2009).

Variació nucleotídica i polimorfisme cromosòmic per inversions

Les inversions cromosòmiques són canvis estructurals que alteren l'ordre dels gens sense en principi afectar el seu nombre. Descobertes per Sturtevant a principis del segle xx a *D. melanogaster* pel seu efecte supressor de la recombinació quan es troben en heterozigosi (Sturtevant, 1917), aquest tipus de variació estructural va ser dels primers a ser extensament estudiat en diverses espècies de *Drosophila* perquè pot ser detectat citològicament en certs òrgans d'aquests dípters i altres que presenten cromosomes politènics (revisat a Lewontin *et al.*, 1981, per a *D. pseudoobscura*; i a Krimbas i Powell, 1992, per al gènere *Drosophila*). Tanmateix, la comparació dels cromosomes politènics inicialment i de la distribució de conjunts de marcadors moleculars al llarg dels cromosomes de diverses espècies de *Drosophila* permeté identificar el rellevant paper que han tingut les inversions en l'evolució cromosòmica d'aquest gènere (Loukas i Kafatos, 1988; Segarra i Aguadé, 1992; Segarra *et al.*, 1995 i 1996; Ranz *et al.*, 1997). La disponibilitat a l'inici del segle XXI de genomes complets de diverses espècies ha permès comparar-ne l'organització i descobrir l'àmplia reorganització que en general han sofert els genomes, amb una implicació molt important de les inversions en aquesta reorganització.

El destí d'una inversió quan sorgeix —com el de qualsevol mutació *de novo*— depèn inicialment de l'atzar, però també del seu possible efecte sobre l'eficàcia biològica. En principi les inversions que poden perdurar són aquelles que o bé no l'afecten (neutres) o bé l'afecten positivament (adaptatives). En originar-se, una inversió pot conferir un avantatge selectiu, ja sigui per les variants al·lèliques d'una fracció dels seus gens (ja es tracti d'un supergen o conjunt coadaptat d'allels, o de variants de diversos gens seleccionades independentment), ja sigui pel mateix canvi estructural que podria afectar l'expressió d'algun gen o provocar la seva du-

plicació (resumit a Aguadé, 2013). Posteriorment es podrien acumular altres diferències adaptatives en ambdues ordenacions com a conseqüència de la reducció de la recombinació que es dona en la regió invertida. Per tant, en el cas del polimorfisme per inversions, i més concretament en inversions amb freqüències que varien de forma concordant amb un o diversos factors ambientals, sabem que el seu increment de freqüència i el posterior manteniment d'ambdues ordenacions són producte de la selecció adaptativa que ha actuat i actua sobre alguns dels gens en la zona invertida.

De la mateixa manera que l'aïllament geogràfic de dues poblacions condueix a la seva diferenciació per acumulació independent de mutacions —ja siguin aquestes neutres o avantatjoses— i, per tant, a l'estructuració poblacional, la presència d'individus amb la inversió i sense en una població dona lloc a una estructuració com a conseqüència de la supressió de la recombinació en els individus heterozigots i, per tant, en l'evolució independent *a priori* d'ambdós subconjunts. Se sap, però, que en els heterozigots es pot donar cert intercanvi entre els cromosomes invertits i no invertits —per conversió gènica i per dobles entrecreuaments—, i aquest intercanvi és major en allunyar-se dels punts de trencament ja que incrementa la probabilitat que es donin dobles entrecreuaments durant la meiosi i es generin així gàmetes recombinants equilibrats que no seran eliminats per la selecció purificadora (Navarro *et al.*, 1997). És aquest intercanvi el que en les inversions d'una certa grandària pot possibilitar la identificació de dianes de la selecció dins dels fragments invertits (resumit a Aguadé, 2013).

L'anàlisi comparativa de la variació nucleotídica en diferents parts de la regió afectada per una inversió en cromosomes de les dues ordenacions alternatives pot aportar informació sobre qüestions tan diverses com l'origen únic o no de les inversions, i quins són els gens implicats en el manteniment per selecció equilibradora del polimorfisme cromosòmic. Clàssicament s'ha considerat que les inversions tenen un origen únic atesa la baixa probabilitat que es repeteixin els diversos esdeveniments implicats en aquest origen —trencament dels dos filaments de la cadena de DNA en dues regions més o menys distanciades de la mateixa molècula, inversió del fragment trencat i posterior unió dels extrems del fragment invertit amb els extrems de la resta de la molècula. Aquest caràcter monofilètic de les inversions fou qüestionat en descobrir-se els elements transponibles i haver considerat que podien ser agents causals de les inversions naturals (Finnegan, 1989). Per abordar aquesta qüestió a *Drosophila* s'analitzà inicialment la variació en regions citològicament properes als punts de trencament de diverses ordenacions cromosòmiques de *D. subobscura* (Rozas i Aguadé, 1990, 1993 i 1994; Rozas *et al.*, 1999; Navarro-Sabaté *et al.*, 1999). Aquesta anàlisi donà suport a l'origen monofilètic de les inversions estudiades en haver posat de manifest que les seqüències dels cromosomes invertits s'agrupaven diferencialment de les dels cromosomes no inver-

tits en la genealogia reconstruïda, com s'esperaria si tinguessin un origen únic i haguessin posteriorment acumulat canvis independentment de les seqüències dels cromosomes no invertits. Un resultat similar s'obtingué en analitzar la variació en la regió envoltant el primer punt de trencament d'una inversió polimòrfica seqüenciada en el gènere *Drosophila* (Wesley i Eanes, 1994). Altrament, l'anàlisi de la variació nucleotídica en múltiples regions distribuïdes al llarg del fragment invertit en les dues ordenacions alternatives posà de manifest l'efecte que tenen la grandària de la inversió i la distància als punts de trencament en l'intercanvi genètic entre ordenacions. En algunes inversions relativament grans —com les inversions In(2L)t i In(3R)Pa de *D. melanogaster* i la inversió A₂ de *D. subobscura* de ~9, ~13 i ~7 Mb respectivament— es va detectar que la diferenciació genètica entre ordenacions decau en allunyar-se dels seus punts de trencament (Bénassi *et al.*, 1993; Hasson i Eanes, 1996; Nóbrega *et al.*, 2008), mentre que en inversions de menor grandària —com la inversió O₃ (de ~3,5 Mb) que forma part del complex O₃₊₄ de *D. subobscura*— no es detectà aquesta decadència (Munté *et al.*, 2005).

L'estratègia per detectar possibles dianes de la selecció al llarg de la regió invertida es basa, per una part, en el fet que sigui possible l'intercanvi genètic entre les dues ordenacions alternatives (amb la inversió i sense), i, per l'altra, en la predicció que la diferenciació entre ordenacions sigui major en les regions afectades per la selecció local que manté ambdues ordenacions que en la resta de regions, en haver-se contraposat la selecció al desacoblament propiciat per l'intercanvi genètic entre variants nucleotídiques i ordenacions cromosòmiques. Un dels primers estudis realitzats en l'àmbit genòmic per abordar aquesta qüestió analitzà la variació en la regió afectada per la inversió 2La (de ~22 Mb) del mosquit *Anopheles gambiae* en individus procedents d'ambdós extrems d'una clina latitudinal que eren homozigots respectivament per a les dues ordenacions alternatives (Cheng *et al.*, 2012). Aquest estudi mostrà —com ho havien fet els estudis multilocus esmentats anteriorment en diverses inversions grans— que el grau de diferenciació decau en allunyar-se dels punts de trencament com a resultat de l'intercanvi genètic entre ordenacions per recombinació. Altrament, s'utilitzà la major diferenciació esperada al voltant de les dianes de la selecció com a senyal per identificar-les. Així, dels 1.281 gens inclosos en la inversió 2L s'identificaren aquells que coincidien amb les regions d'1 kb més diferenciades entre ordenacions. Els cinquanta-dos gens identificats són considerats candidats a estar subjectes a selecció local i contribuir, per tant, al caràcter adaptatiu de la inversió 2La.

Per tal de conèixer els mecanismes pels quals poden originar-se les inversions cromosòmiques, i també per valorar si el mecanisme *per se*, o la seqüència que envolta els punts de trencament, pot condicionar que s'originin inversions una sola vegada o potenciar que ho facin múltiples vegades, és indispensable identificar i seqüenciar els punts de trencament de múltiples inversions en diverses espè-

cies. S'ha de tenir, tanmateix, en compte que amb el pas del temps les regions que inclouen els punts de trencament d'una inversió acumulen canvis nucleotídics i de llargada, i, per tant, que com més jove sigui una inversió les seqüències dels seus punts de trencament reflectiran millor l'esdeveniment mutacional que l'originà. S'ha de considerar també que les inferències sobre els mecanismes d'origen es basen en les inversions reeixides i, per tant, en les inversions que han passat el sedàs diferencial que suposa la selecció purificadora i, o bé formen part del polimorfisme cromosòmic adaptatiu d'una espècie determinada, o bé s'han acumulat al llarg del temps i han contribuït a l'evolució cromosòmica dels corresponents llinatges.

La identificació i caracterització dels punts de trencament d'una inversió, ja sigui polimòrfica o fixada entre espècies relativament properes, per tècniques moleculars clàssiques no és una empresa fàcil, com ho posa de manifest que el nombre d'inversions amb un o ambdós punts de trencament caracteritzats ha anat creixent molt lentament fins i tot al gènere *Drosophila*, en el qual tant el polimorfisme cromosòmic com l'evolució cromosòmica han estat àmpliament estudiats. A tall d'exemple, cal indicar que, de les vuit inversions polimòrfiques de *D. melanogaster* amb punts de trencament actualment seqüenciats, tres ho han estat per mètodes clàssics (Wesley i Eanes, 1994; Andolfatto *et al.*, 1999; Matzkin *et al.*, 2005) i la resta, per comparació de genomes d'una mostra poblacional (Corbett-Detig i Hartl, 2012). Altrament, el nombre de punts de trencament d'inversions fixades entre espècies del gènere *Drosophila* que s'han seqüenciat per mètodes clàssics (Cirera *et al.*, 1995; Calvete *et al.*, 2012; Guillén i Ruiz, 2012) és inferior tant al de punts de trencament identificats amb gran precisió per comparació de genomes complets d'espècies relativament properes (Ranz *et al.*, 2007) com al d'aquells identificats amb menor precisió (entre zones codificadores) al llarg de la filogènia del gènere per comparació de genomes complets (Ranz *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008; Grotthuss *et al.*, 2010). Els estudis d'alta precisió han posat de manifest que les inversions es poden generar per dos mecanismes diferents. El primer es dona per recombinació ectòpica entre elements transponibles o altres seqüències repetitives que es trobin a una certa distància en sentit oposat, mentre que el segon ho fa per trencaments desplaçats d'ambdues cadenes del DNA en ambdós punts de trencament i posterior reparació dels fragments de cadena senzilla generats en el procés. Aquests mecanismes tenen diferents requisits i deixen a més empremtes diferents en els cromosomes invertits amb relació als no invertits. En el primer cas es requereix certa similitud entre les seqüències repetides, i com a resultat de la recombinació ectòpica entre aquestes seqüències queden còpies químiques en ambdós punts de trencament. En el segon cas no es requereix cap similitud entre les dues regions que es trenquen, i la reparació dels fragments de cadena senzilla en cada punt de trencament dona lloc a la seva duplicació i, per tant, a la seva presència en ambdós punts de trencament en el cromosoma invertit,

a diferència de la presència d'aquest fragment en únicament un dels punts de trencament del cromosoma no invertit.

Els estudis citològics clàssics realitzats en *Drosophila* havien posat de manifest que el nivell de polimorfisme podia diferir entre espècies —n'hi ha de polimòrfiques i d'altres que no— i també entre els braços cromosòmics de les espècies polimòrfiques. Aquests estudis havien detectat, tanmateix, que la taxa d'evolució cromosòmica per inversions podia diferir entre llinatges i també entre braços cromosòmics (Ranz *et al.*, 1997; Papaceit *et al.*, 2006). Finalment, els estudis citològics varen detectar també que alguns punts de trencament eren compartits per dues o més inversions (Kunze-Mühl i Müller, 1958; Tonzetich *et al.*, 1988; Ruiz i Wasserman, 1993). Tanmateix, la comparació de genomes complets de diverses espècies al llarg d'una filogènia (per exemple, a la del gènere *Drosophila* o a la dels mamífers) ha posat de manifest que les inversions han tingut un paper destacat en la seva reorganització (Newman *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; Ferguson-Smith i Trifonov, 2007; Schaeffer *et al.*, 2008) i també que es dona una distribució heterogènia dels punts de trencament en regions al llarg de les quals s'han produït trencaments múltiples vegades respecte d'altres que ho han fet una vegada o cap (Coluzzi *et al.*, 2002; Pevzner i Tesler, 2003). Conèixer el paper relatiu d'ambdós mecanismes d'origen de les inversions als diferents braços cromosòmics de diverses espècies i llinatges pot contribuir a respondre a les dues primeres qüestions referents a la presència o absència de polimorfisme cromosòmic en l'espècie i la seva diferent incidència en diverses parts del genoma, mentre que també s'hauria de tenir informació sobre les regions que envolten els punts de trencament per poder respondre a la tercera qüestió referent a la reutilització d'aquests punts.

En el gènere *Drosophila*, el nombre d'inversions amb ambdós punts de trencament caracteritzats és relativament baix tant per a inversions polimòrfiques com per a fixades. No obstant això, en alguns llinatges semblaria preponderar tant en inversions polimòrfiques com en inversions fixades el mecanisme de trencaments desplaçats i posterior reparació sobre el de recombinació ectòpica entre elements repetits. Així, cinc de les vuit inversions polimòrfiques de *D. melanogaster* (Corbett-Detig i Hartl, 2012), disset de les vint-i-nou que diferencien aquesta espècie de les espècies properes *D. simulans* i *D. yakuba* (Ranz *et al.*, 2007) i quatre de les cinc inversions polimòrfiques caracteritzades a *D. subobscura* (Papaceit *et al.*, 2013; Puerma *et al.*, 2014; Orengo *et al.*, 2015) s'haurien generat per trencaments desplaçats i posterior reparació. Altrament, en el grup de *D. repleta*, en el qual també coexisteixen ambdós mecanismes d'origen, el mecanisme de trencaments desplaçats i posterior reparació seria minoritari en haver-se detectat la seva empremta en tres de les deu inversions fixades (Calvete *et al.*, 2012; Guillén i Ruiz, 2012) i en cap de les tres inversions polimòrfiques a *D. buzzatii* (Cáceres *et al.*, 1999; Casals *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2009).

En relació amb la reutilització de punts de trencament en el gènere *Drosophila*, la comparació de genomes complets d'espècies dels diferents grups i subgrups del gènere ha confirmat la conservació generalitzada del contingut gènic dels diferents braços cromosòmics malgrat l'àmplia reordenació que s'ha donat en cada braç (Bhutkar *et al.*, 2008; Grotthuss *et al.*, 2010). Aquestes anàlisis han detectat algunes regions del genoma amb contingut i organització gènics conservats en totes les espècies, respecte d'altres regions que han estat implicades repetidament en reordenacions cromosòmiques. Aquestes observacions impliquen una distribució heterogènia dels punts de trencament, heterogeneïtat que podria ser deguda tant a la major probabilitat de trencament (fragilitat) d'algunes regions com a l'eliminació per acció de la selecció purificadora d'algunes de les reordenacions produïdes. En el gènere *Drosophila*, la fragilitat d'algunes zones del genoma semblaria haver tingut un paper més important en la seva evolució cromosòmica que les limitacions a variar d'altres regions (Grotthuss *et al.*, 2010). No obstant això, l'antiguitat de les inversions implicades en els estudis en el nivell de gènere dificulta identificar les característiques del DNA que envoltava els punts de trencament de cadascuna de les inversions fixades quan s'originaren. De fet, en aquest nivell d'observació es considera que un punt de trencament ha estat reutilitzat quan en diverses espècies únicament un dels gens que el flanqueja és el mateix. La caracterització de punts de trencament d'inversions més joves amb evidència citològica d'haver estat reutilitzats esdevé important perquè les seves seqüències poden reflectir millor les que hi havia en donar-se la inversió. La seva identificació i caracterització permet saber en primer lloc si també es poden considerar reutilitzats en l'àmbit molecular, i si aquest fos el cas, l'anàlisi de les seqüències dels punts de trencament i de la regió que els envolta té el potencial d'identificar-ne característiques que n'expliquin la possible fragilitat. Cal afegir que si el nombre d'inversions relativament recents amb punts de trencament seqüenciats en el gènere *Drosophila* és baix, encara ho és més el d'inversions amb evidència citològica d'haver compartit un o més punts de trencament —els de dues inversions fixades en el llinatge de *D. buzzatii* que estan disposades en tàndem i comparteixen citològicament un punt de trencament (Calvete *et al.*, 2012), i els de quatre inversions que es produïren seqüencialment a *D. subobscura* i comparteixen citològicament dos dels seus punts de trencament (Puerma *et al.*, 2014; Orengo *et al.*, 2015). La comparació de seqüències confirmà que el punt compartit citològicament per les dues inversions fixades en el llinatge de *D. buzzatii* ha estat efectivament reutilitzat en el nivell molecular, i que almenys tres de les quatre inversions de *D. subobscura* que havien reutilitzat citològicament el punt proximal el compartien en el nivell molecular, mentre que el punt distal hauria estat reutilitzat almenys per dues de les tres inversions que el compartien citològicament. A més la comparació de múltiples genomes de *D. melanogaster* revelà que

dues inversions polimòrfiques independents havien reutilitzat un dels seus punts de trencament (Corbett-Detig i Hartl, 2012).

Els dos punts de trencament de *D. subobscura* que han estat reutilitzats molecularment per dues o més inversions estan flanquejats en la seva part externa, i, per tant, compartida, per un gen *Uhg* diferent. La presència d'aquests gens que codifiquen en els seus introns snoRNA és l'únic indicatiu a partir de les seqüències de la possible fragilitat d'aquestes regions atès que podrien adoptar estructures cruciformes complexes que generessin certa inestabilitat. Altrament, tant en la regió més àmplia que inclou els punts de trencament compartits per diverses inversions a *D. subobscura* com al punt de trencament reutilitzat al llinatge de *D. buzzatii* s'han detectat altres reordenacions cromosòmiques, cosa que indica certa inestabilitat general a la zona.

EVOLUCIÓ ADAPTATIVA EN ACCIÓ

Evolució molecular: múltiples dianes de la selecció en un únic gen

La variació en el color del pelatge als mamífers ha estat àmpliament estudiada durant el segle xx al ratolí *Mus musculus* tant des del punt de vista dels gens que constitueixen la seva base genètica com des del punt de vista de la caracterització funcional d'aquests gens al llarg del desenvolupament. Els estudis realitzats en aquesta espècie model han permès identificar i caracteritzar entre d'altres els gens implicats en la via de síntesi dels pigments melànics (eumelanina i feomelanina). Altrament, la variació en el color del pelatge ha estat també objecte de nombrosos estudis evolutius en espècies no model de rosegadors en haver-s'hi detectat una relació entre els diferents colors del pelatge dorsal i el color del rerefons de l'àrea en la qual viuen. Aquesta relació així com l'observació en diverses de les espècies estudiades d'una depredació diferencial de les formes no críptiques amb el rerefons ambiental indicaria el caràcter adaptatiu del fenotip críptic i, per tant, posaria de manifest l'acció recent de la selecció natural positiva. És per aquests motius que els gens implicats en la pigmentació del pelatge constitueixen un conjunt de gens candidats en els quals ha pogut actuar la selecció natural en poblacions naturals per l'avantatge selectiu dels fenotips críptics amb relació als no críptics en àrees recentment colonitzades amb un rerefons més clar (o més fosc) que el de l'àrea de distribució original de l'espècie. Entre els estudis realitzats per tal de caracteritzar els canvis moleculars —gens i mutacions— implicats en aquestes adaptacions comentarem dos dels estudis realitzats en el ratolí cérvol *Peromyscus polionotus* (Linnen *et al.*, 2009 i 2013).

El ratolí cérvol es troba a la major part de Nord-amèrica, incloent-hi l'extensa zona de Nebraska anomenada Sand Hills perquè està formada per dunes d'origen

relativament recent (fa d'uns 8.000 a 15.000 anys) que han estat fixades per la vegetació. En aquest hàbitat sorrenc (clar), els ratolins són de pelatge clar a diferència dels ratolins de les àrees que envolten aquesta formació (de sòl fosc), que són de pelatge fosc. Els estudis realitzats en *Mus musculus* sobre el color del pelatge havien posat de manifest que en aquesta espècie el color del pelatge està associat al gen *Agouti*. Els encreuaments realitzats entre soques de ratolí cérvol que es diferenciaven en la seva pigmentació dorsal mostraren que també en aquesta espècie el color del pelatge dorsal està associat al gen *Agouti*. Altrament, les mesures dels nivells de RNA missatger del gen *Agouti* realitzades en aquestes soques mostraren que la seva sobreexpressió en els individus de pelatge clar donava lloc a un increment en l'amplada de la banda de pigment clar (feomelanina) en cada pèl (Linnen *et al.*, 2009). En analitzar la variació nucleotídica en diverses regions —exons 1B a 4, i zones adjacents— del gen *Agouti* en dues poblacions variables fenotípicament (és a dir, amb individus de pelatge dorsal clar i fosc) mostrejades en un dels límits de l'àrea de dunes, els dos fenotips es diferenciaren en diverses posicions incloent la deleció en les formes clares d'un triplet del segon exó que en les formes fosques codifica l'aminoàcid serina. La posterior anàlisi de la variació present en cadascun dels dos subconjunts de seqüències (individus de pelatge clar i de pelatge fosc) per mètodes de màxima versemblança detectà l'empremta de la selecció natural únicament en els individus de pelatge clar i més concretament en la regió que envolta la deleció abans esmentada. Aquest resultat indica que un dels canvis que es donaren en la zona estudiada o prop d'aquesta va resultar avantatjós en el nou ambient ja que en haver afectat la regulació del gen *Agouti* va donar lloc a un fenotip críptic en el nou rerefons (pelatge clar en sòl clar). Aquest primer estudi permeté, tanmateix, deduir que la mutació avantajosa s'originà i s'incrementà de freqüència (arrossegament selectiu parcial) després de la formació de l'àrea de dunes de Sand Hills (Linnen *et al.*, 2009).

El color del pelatge al ratolí cérvol és de fet un fenotip complex atès que les diferències en el color del pelatge entre els fenotips clar i fosc no es redueixen al color del pelatge dorsal, sinó que inclouen també diferències en el color del pelatge ventral així com en la situació del límit dorsiventral i en una ratlla present a la cua. En un segon estudi de les mateixes poblacions de ratolí cérvol de Nebraska s'amplià la caracterització fenotípica a tots els trets esmentats i se seqüencià en totes les mostres una regió d'aproximadament 185 kb que inclou el gen *Agouti* i totes les seves zones reguladores, i també se seqüenciaren unes 2.100 regions d'1,5 kb de longitud mitjana repartides per tot el genoma. L'anàlisi de la variació en les 2.100 regions posà de manifest que no hi ha estructuració poblacional quant al color del pelatge ni tampoc quant a la localitat mostrejada, i permeté inferir que la població patí un coll d'ampolla fa uns 2.900 anys, i s'expandí posteriorment. Per altra banda, els baixos nivells d'associació detectats entre polimorfismes de la regió

Agouti permeteren suposar que la recombinació en aquesta regió havia estat suficient per poder cartografiar amb detall a la regió *Agouti* els diferents trets que diferencien els fenotips clar i fosc. L'anàlisi detectà, per una banda, l'associació de cadascun dels cinc trets amb un conjunt exclusiu de polimorfismes del gen *Agouti* i, per l'altra, permeté detectar senyals clars i independents de selecció en cadascun dels conjunts de polimorfismes en els fenotips clars. Els resultats obtinguts en el segon estudi mostren que el color del pelatge en els ratolins cérvol de Sand Hills és un caràcter complex tant en l'àmbit fenotípic com genètic, amb cadascun dels seus components regit per una zona diferent del gen *Agouti*. A més, la detecció en cadascuna d'aquestes zones de l'empremta de l'acció recent de la selecció natural mostra que cada component afecta independentment l'eficàcia biològica dels ratolins de pelatge clar. Aquest estudi permet, per tant, fraccionar el gen *Agouti*, que es considera un gen d'efecte major sobre el color del pelatge, en múltiples regions en les quals les mutacions tenen un efecte petit o moderat.

Evolució molecular: dels gens a les xarxes gèniques

L'aproximació de gens candidats ha incorporat sovint l'anàlisi de la variabilitat nucleotídica en múltiples gens implicats en una mateixa funció o procés biològic, o que codifiquen els enzims d'una mateixa via metabòlica. Tot i ser estudis multi-locus, l'anàlisi de la variació per detectar l'acció de la selecció natural s'ha efectuat generalment de manera independent a cadascun dels gens (per exemple, Ramos-Onsins *et al.*, 2004). Per avançar en el nostre coneixement de com evolucionen els diferents elements d'una xarxa gènica és important considerar conjuntament la variació en tots els membres de la xarxa amb relació a diverses característiques d'aquesta mateixa xarxa. La topologia de la xarxa és una de les característiques que podria afectar diferencialment l'evolució dels seus components. S'han fet estudis tant en xarxes específiques com genòmicament per tal de descobrir possibles efectes diferencials segons la posició que ocupin els elements a la xarxa. Els estudis de xarxes específiques s'han centrat en vies metabòliques i en xarxes de senyalització ben caracteritzades molecularment, com ho són la via biosintètica dels antocians en plantes i la via glicolítica a *Drosophila* així com la via de senyalització de la insulina a *Drosophila* i en mamífers. Els resultats d'aquests estudis mostren de forma general que la posició a la xarxa afecta l'evolució dels seus components, tot i que l'efecte difereix entre els diferents tipus de xarxes estudiades, i a vegades també en el mateix tipus de xarxa. Així, l'anàlisi del polimorfisme i la divergència a la via glicolítica mostrà un enriquiment de canvis adaptatius en els enzims situats en punts de ramificació (Flowers i Purugganan, 2008), i l'anàlisi de la divergència a la via biosintètica dels antocians posà de manifest un gradient de la taxa de substitució al llarg de la via, evolucionant més lentament els enzims de la part superior de

la via (Lu i Rausher, 2003). La menor taxa de substitució observada dels elements a l'inici de la via que a la resta de la via es pot entendre si es considera que la fracció de mutacions amb efectes deleteris —i, per tant, eliminades per la selecció purificadora— pot ser major en els gens que codifiquen aquestes proteïnes ja que presenten més efectes pliotròpics que les que afecten els gens implicats en les parts finals de la via. En canvi, en estudiar la variació a la via de senyalització de la insulina s'ha detectat un gradient en sentit oposat tant en analitzar la divergència en dotze espècies de *Drosophila* i en sis de mamífers (Alvarez-Ponce *et al.*, 2009 i 2011) com en analitzar el polimorfisme a *D. melanogaster* i la divergència respecte a *D. simulans* (Alvarez-Ponce *et al.*, 2012). Altrament, l'anàlisi del polimorfisme en aquesta via en diverses poblacions humanes ha mostrat empremtes de canvis adaptatius en els elements més centrals de la via (Luisi *et al.*, 2012). En el nivell genòmic, els diversos estudis realitzats mostraren que els elements més ben connectats (*hubs*) evolucionen més lentament perquè estan subjectes a una major pressió de la selecció purificadora (per exemple, Hahn i Kern, 2005; Lemos *et al.*, 2005). Per altra part, l'estudi comparatiu entre home i ratolí dels gens implicats en totes les xarxes de senyalització en humans no ha revelat cap gradient global en les pressions selectives al llarg d'aquest tipus de xarxes (Alvarez-Ponce, 2012), observació que contrasta amb el gradient detectat a la via de senyalització de la insulina tant a *Drosophila* com en mamífers (Alvarez-Ponce *et al.*, 2009 i 2011), que és únicament una de les vies analitzades en l'estudi genòmic.

Evolució molecular: canvis adaptatius paral·lels

L'evolució repetida i independent d'una mateixa característica en diverses poblacions aïllades geogràficament, o en diverses espècies, que viuen en un mateix ambient —anomenada clàssicament *evolució paral·lela* quan s'observa entre llinatges propers, i *evolució convergent* quan s'observa entre llinatges allunyats—, constitueix una mostra inequívoca de l'acció de la selecció positiva o adaptativa en resposta a un mateix repte ambiental (biòtic o abiòtic) atès que l'atzar associat a la fixació de mutacions neutres no pot explicar fàcilment la repetibilitat observada. L'estudi de la base genètica d'aquests canvis repetits en diferents llinatges així com la comparació de genomes complets han evidenciat que en alguns casos els mateixos gens hi estan implicats. L'acció repetida de la selecció positiva en un mateix gen pot reflectir biaixos en la disponibilitat i l'efecte de les possibles mutacions avantatjoses així com limitacions associades als seus efectes pliotròpics i a les seves interaccions amb altres gens. En qualsevol cas, la fixació de canvis adaptatius en un mateix gen en diferents poblacions o espècies genera preguntes sobre la predictibilitat de l'evolució adaptativa en el nivell genètic.

La distinció fenotípica entre evolució paral·lela i evolució convergent és de cai-

re filogenètic, en tant que des de la perspectiva genètica aquesta distinció es pot considerar afeblida atès que en ambdues situacions un mateix canvi fenotípic pot ser degut tant a l'acció de la selecció natural en un mateix gen com en diferents gens, i únicament en el primer cas es parlaria de canvi repetit. Comentarem un estudi genòmic que té com a objectiu descobrir gens implicats en canvis adaptatius repetits en poblacions diferents d'una mateixa espècie d'insecte pal (Soria-Carrasco *et al.*, 2014).

Els insectes pal de l'espècie endèmica de Califòrnia *Timema cristinae* són insectes àpters i herbívors que s'han adaptat repetidament a dues plantes hoste (*Adenostoma fasciculatum* i *Ceanothus spinosus*) i han donat lloc a dos ecotips diferenciats presents en diverses localitats. Estudis previs en el nivell poblacional havien posat de manifest un minvat flux genètic entre poblacions adjacents d'ambdós ecotips, i el flux detectat entre poblacions més distants geogràficament era nul o molt baix. A més aquests estudis mostraren que s'havien generat repetidament mecanismes d'aïllament reproductor entre els dos ecotips presents en una mateixa localitat, i que, per tant, aquests ecotips es trobaven en les fases primerenques d'un procés d'especiació ecològica paral·lela. Per tal de conèixer les possibles dianes dels canvis adaptatius observats repetidament en aquesta espècie d'insecte pal, se seqüenciaren els genomes de múltiples individus de cada ecotip de diverses poblacions. La comparació de la variabilitat genòmica entre ambdós ecotips de cada població mostrà nivells reduïts de diferenciació genètica en comparació amb la diferenciació entre poblacions, com es reflectí en l'arbre filogenòmic reconstruït en haver-se agrupat els individus segons la localitat geogràfica d'origen. L'anàlisi de la diferenciació entre ecotips al llarg del genoma mostrà que la majoria de les regions i els polimorfismes més diferenciats ho estaven en una sola població que reflectia canvis localment. Altrament, les regions i els polimorfismes més diferenciats entre ecotips que ho estaven en més d'una població són candidats haver estat afectats repetidament per la selecció divergent relacionada amb la planta hoste. Aquesta hipòtesi es veié recolzada quan es realitzà un experiment de trasplantament al camp d'individus d'un dels dos ecotips a ambdós tipus de plantes hoste. Transcorreguda una generació se seqüencià el genoma dels individus de la descendència desenvolupada a cada planta hoste així com el d'una mostra de la població d'origen dels individus trasplantats. L'anàlisi comparativa per mètodes bayesians d'aquests genomes permeté identificar els polimorfismes que havien sofert canvis excepcionals en la freqüència de les seves variants entre ambdós tipus de descendència en relació amb la freqüència que presentaven en la població d'origen dels individus trasplantats. Es detectà certa coincidència entre aquests polimorfismes i les regions candidates detectades en l'anàlisi genòmica i poblacional.

Evolució molecular: introgressió i canvis adaptatius

L'aïllament geogràfic de les poblacions d'una mateixa espècie propicia la seva diferenciació genètica atès que els canvis en la variació genètica es produeixen independentment en les diverses poblacions per acció de la mutació, deriva genètica i selecció natural. Altrament, l'intercanvi d'informació genètica mediat per la migració d'individus entre les poblacions aïllades es contraposa a aquesta diferenciació. A més, la migració incrementa la variació en la població receptora perquè aporta variants sorgides per mutació en la població d'origen dels immigrants. En la nova població, el destí d'aquestes variants dependrà —de forma similar que en la població d'origen— de si afecten o no l'eficàcia biològica dels seus portadors en el nou hàbitat, i en cas d'afectar-la, de si ho fan positivament o negativament. En cas que l'afectin positivament, s'ha de tenir a més en compte que en la població receptora aquestes variants podran trobar-se amb certa freqüència si es compara amb la freqüència de les mutacions sorgides *de novo*. Aquesta freqüència diferencial i el fet de trobar-se la variant avantatjosa en rerefons genètics (haplotips) diversos fa que si arriben a fixar-se deixin una empremta més feble i, per tant, més difícil de detectar que la que deixa una mutació sorgida *de novo* (Pennings i Hermisson, 2006).

En el cas d'espècies properes, els mecanismes d'aïllament reproductor que es troben a la base del procés d'especiació són responsables que les espècies que en sorgeixen evolucionin independentment. La divergència genètica entre espècies germanes s'incrementa amb el temps transcorregut des del seu origen ja que l'aïllament reproductor impedeix la transferència entre espècies dels canvis genètics que s'han acumulat per separat en cadascuna d'elles. Cal afegir que les barreres reproductores entre espècies recentment formades poden ser incompletes i possibilitar la seva hibridació en àrees de simpatria. Es pot, per tant, produir introgressió de material genètic entre espècies properes com a resultat dels possibles esdeveniments d'hibridació interespecífica. També en aquest cas, el destí del genoma introgressat estarà regit per l'atzar i per les pressions selectives que operin en l'espècie receptora.

La comparació de genomes complets de múltiples espècies relativament properes filogenèticament (o de poblacions extingides i poblacions actuals) permet investigar si els patrons de divergència interespecífica observats al llarg del genoma són o no compatibles amb un únic arbre filogenètic. La topologia dels arbres reconstruïts en algunes regions del genoma pot diferir de la d'altres regions com a resultat de la introgressió resultant d'hibridacions interespecífiques, però com que es tracta d'espècies properes les topologies diferencials poden també reflectir una separació encara incompleta dels llinatges presents en l'espècie ancestral. Entre els diversos estudis genòmics que proposen un paper rellevant de la introgressió en

l'evolució de les espècies estudiades (Pardo-Díaz *et al.*, 2012; Neafsey *et al.*, 2015; Fontaine *et al.*, 2015) es pot destacar el realitzat recentment que comparava els genomes de diverses espècies de mosquits anofelins, incloent-hi els de sis espècies bessones del complex *Anopheles gambiae* que s'originà fa uns dos milions d'anys (Fontaine *et al.*, 2015). Aquest complex inclou tres dels vectors més importants del paràsit *Plasmodium falciparum* causant de la forma més greu de malària humana (*A. gambiae*, *A. coluzzi* i *A. arabiensis*). Sorprenentment, la topologia dels arbres filogenètics reconstruïts per màxima versemblança a partir de les seqüències del cromosoma X difereix de la dels reconstruïts a partir dels autosomes en el sentit que únicament la darrera agrupava les tres espècies vectors de la malària humana (Fontaine *et al.*, 2015). Basant-se en aquesta observació i en dades prèvies indicatives d'introgressió autosòmica d'*A. arabiensis* a *A. gambiae* i *A. coluzzi*, s'aplicaren dos tipus de tests per tal de contrastar la hipòtesi d'introgressió autosòmica. En ambdós casos —comparacions del cromosoma X amb els autosomes, i comparacions de regions dels autosomes amb la mateixa topologia que el cromosoma X amb les que presentin altres topologies— es detectà que el temps mitjà de divergència entre les espècies estudiades era menor en les regions que es consideren introgressades, tal com s'esperaria si la introgressió hagués afectat de forma majoritària els autosomes (Clark i Messer, 2015). Els autors d'aquest treball proposen dos episodis relativament recents d'introgressió autosòmica massiva en el complex d'espècies *A. gambiae*: un de bidireccional entre *A. arabiensis* i l'ancestre d'*A. gambiae* i *A. coluzzi*, i un segon unidireccional d'*A. merus* a *A. quadriannulatus*. Cal comentar finalment que, tot i que al cromosoma X possiblement hi hagi més factors responsables de l'aïllament reproductor que als autosomes, el nivell de flux gènic per hibridació interespecífica necessari per explicar la reordenació observada als autosomes contrasta amb la minsa reordenació detectada al cromosoma X (Clark i Messer, 2015).

CONSIDERACIONS FINALS

En les darreres dècades s'ha produït un canvi d'escala i d'aproximació referent a l'objecte d'estudi de la variació intraespecífica i interespecífica present en les seqüències de DNA per tal de detectar canvis adaptatius produïts en el decurs de l'evolució. Així, en el cas de la variació intraespecífica, s'ha passat d'analitzar-la en gens i regions candidats al fet que la seva variació estigués modelada per la selecció adaptativa a realitzar estudis multilocus per tal d'inferir la història demogràfica de la població o espècie objecte d'estudi, i finalment a efectuar rastrejos genòmics «a cegues» per tal de detectar regions i gens amb la petjada d'haver sofert canvis adaptatius recents. Des del punt de vista analític, s'ha passat, per una banda, d'inferir l'acció recent de la selecció adaptativa en un gen o regió a partir d'algun estadístic

dissenyat per detectar-ne l'acció utilitzant simulacions de Montecarlo de l'MNE a fer-ho utilitzant com a hipòtesi nul·la per a les simulacions el model demogràfic inferit prèviament. Per altra banda, s'ha passat d'inferir l'acció recent de la selecció per mètodes de màxima versemblança comparant l'MNE amb les prediccions que fa el model selectiu (arrossegament selectiu) sobre la distribució espacial de la variació al voltant de la diana de la selecció (Kim i Stephan, 2002) a comparar-la amb la distribució empírica (Nielsen *et al.*, 2005). Finalment, s'ha passat, tanmateix, a utilitzar mètodes heurístics que detecten regions la variació de les quals destaca del rerefons de variació genòmica. Quant a inferències de la història demogràfica de la població basades en anàlisis multilocus, s'utilitzen majoritàriament mètodes bayesians (com l'ABC o *approximate bayesian computation*; Beaumont *et al.*, 2002) per la seva major versatilitat, si bé també s'utilitzen mètodes de màxima versemblança (Weiss i Haeseler, 1998).

La retroacció entre la generació i anàlisi de dades de variació intraespecífica i el desenvolupament tant de models teòrics basats en la genètica de poblacions o evolutiva com d'eines analítiques (per exemple, estadístics de contrast) ha estat i continua sent molt important per entendre com la selecció natural modela aquesta variació. Per tal de tenir una visió més àmplia i fidedigna dels canvis adaptatius recents, s'ha de tenir en compte que moltes poblacions naturals tenen una història demogràfica complexa que fa que la seva variació neutra no es trobi en equilibri deriva-mutació (és a dir que es desvia de les prediccions de l'MNE), i també que l'acció de la selecció (negativa i/o positiva) podria ser més freqüent del que es pensava. Per poder detectar l'acció recent de la selecció forta (és a dir, d'aquella regida per mutacions *de novo* amb un fort avantatge selectiu) per la petjada que deixa en les seqüències de DNA (comentada anteriorment, i resumida a Aguadé, 2009), és important considerar la història demogràfica de la població objecte d'estudi, per la qual cosa esdevé necessari incorporar-la en la hipòtesi nul·la i desenvolupar a més un model conjunt de selecció i canvi demogràfic per tal d'incorporar-lo en la hipòtesi selectiva alternativa. Altrament, esdevé important el desenvolupament d'estadístics que permetin detectar l'empremta més feble que deixa la selecció quan la seva diana no és una mutació *de novo*, sinó que és una variant al·lèlica ja present en la població que ha passat a ser avantatjosa en un moment determinat o bé que ha sorgit múltiples vegades per mutació o ha arribat per migració (Hermisson i Pennings, 2005; Pennings i Hermisson, 2006). Finalment, i com ja s'ha comentat anteriorment, esdevé necessari el desenvolupament teòric de models evolutius en què el caràcter seleccionat sigui poligènic.

En els darrers anys s'ha donat també un increment molt important del nombre d'investigadors interessats a utilitzar la variació en les seqüències de DNA present en les poblacions naturals amb objectius tan diversos dins del camp de la biologia evolutiva com ho són, entre d'altres, entendre com es genera i manté la

biodiversitat, com es pot millorar la gestió i conservació d'aquesta biodiversitat i com predir els canvis que poden donar-se en la biodiversitat com a resultat de situacions adverses. Aquest increment inclou, tanmateix, investigadors en el camp de la biomedicina interessats a esbrinar i entendre, entre d'altres, quina és la base genètica de les diverses malalties, la resposta diversa dels humans tant a components de la seva dieta com a fàrmacs i el paper de la microbiota en la salut i benestar dels humans.

Les situacions més complexes que sens dubte es plantejaran en el futur proper com a conseqüència dels avenços ja experimentats en els camps de l'evolució molecular i de la biologia evolutiva i de les noves preguntes sorgides de camps més aplicats motivaran, com ja hem esmentat, el desenvolupament de models evolutius més complexos i d'estadístics i eines analítiques més potents per adreçar-les. Tanmateix, motivaran ampliar els objectius experimentals per tal de passar del genotip al fenotip, per una part, i a contrastar experimentalment l'efecte de les possibles variants adaptatives sobre l'eficàcia biològica dels seus portadors. El camí recorregut fins ara albira un bon futur per al llarg camí que queda per recórrer per respondre a les múltiples preguntes plantejades sobre l'evolució de les molècules i dels organismes.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. D. [et al.] (2000). «The genome sequence of *Drosophila melanogaster*». *Science*, 287, p. 2185-2195.
- AGUADÉ, M. (1998). «Different forces drive the evolution of the *Acp26Aa* and *Acp26Ab* accessory gland genes in the *Drosophila melanogaster* species complex». *Genetics*, 150, p. 1079-1089.
- (1999). «Positive selection drives the evolution of the *Acp29AB* accessory gland protein in *Drosophila*». *Genetics*, 152, p. 543-551.
- (2009). «Polimorfisme nucleotídic i canvis adaptatius recents». *Treballs de la SCB*, vol. 60: *Cent cinquanta anys després de 'L'origen de les espècies', de Darwin*, p. 93-102. [Ed. a cura d'A. Navarro i C. Segarra]
- (2013). «Tot recordant Antoni Prevosti: buscant empremtes de la selecció natural a les seqüències de DNA». A: *Antoni Prevosti i Pelegrín: Sessió en memòria*. Ed. a cura de Mercè Durfort i Coll. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans (Semblances Biogràfiques; 58), p. 13-23.
- AGUADÉ, M.; MIYASHITA, N.; LANGLEY, C. H. (1989). «Reduced variation in the yellow-achaete-scute region in natural populations of *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 122, p. 607-615.
- (1992). «Polymorphism and divergence in the *Mst26A* male accessory gland gene region in *Drosophila*». *Genetics*, 132, p. 755-770.
- AGUADÉ, M.; BERTRANPETIT, J.; PERETÓ, J. (2012). «Genomes i evolució: impacte en la biologia actual». *Treballs de la SCB*, vol. 63: *La biologia d'ahir i d'avui: Reflexions amb motiu del centenari de la Societat Catalana de Biologia*, p. 101-122. [Ed. a cura de F. Piferrer]
- ALVAREZ-PONCE, D.; AGUADÉ, M.; ROZAS, J. (2009). «Network-level molecular evolutionary analysis of the insulin/TOR signal transduction pathway across 12 *Drosophila* genomes». *Genome Res.*, 19, p. 234-242.
- (2011). «Comparative genomics of the vertebrate insulin/TOR signal transduction pathway: a network-level analysis of selective pressures». *Genome Biol. Evol.*, 3, p. 87-101.
- ALVAREZ-PONCE, D.; GUIRAO-RICO, S.; ORENGO, D. J.; SEGARRA, C.; ROZAS, J.; AGUADÉ, M. (2012). «Molecular population genetics of the insulin/TOR signal transduction pathway: a network-level analysis in *Drosophila melanogaster*». *Mol. Biol. Evol.*, 29, p. 123-132.
- ANDOLFATTO, P.; WALL, J. D.; KREITMAN, M. (1999). «Unusual haplotype structure at the proximal breakpoint of *In(2L)t* in a natural population of *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 153, p. 1297-1311.
- BEAUMONT, M. A.; ZHANG, W.; BALDING, D. J. (2002). «Approximate Bayesian computation in population genetics». *Genetics*, 162, p. 2025-2035.
- BÉNASSI, V.; AULARD, S.; MAZEAU, S.; VEUILLE, M. (1993). «Molecular variation of *Adh* and *P6* genes in an African population of *Drosophila melanogaster* and its relation to chromosomal inversions». *Genetics*, 134, p. 789-799.
- BERRY, A. J.; AJIOKA, J. W.; KREITMAN, M. (1991). «Lack of polymorphism on the *Drosophila* fourth chromosome resulting from selection». *Genetics*, 129, p. 1111-1117.

- BHUTKAR, A.; SCHAEFFER, S. W.; RUSSO, S. M.; XU, M.; SMITH, T. F.; GELBART, W. M. (2008). «Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes». *Genetics*, 179, p. 1657-1680.
- BRAVERMAN, J. M.; HUDSON, R. R.; KAPLAN, N. L.; LANGLEY, C. H.; STEPHAN, W. (1995). «The hitchhiking effect on the site frequency spectrum of DNA polymorphisms». *Genetics*, 140, p. 783-196.
- CÁCERES, M.; RANZ, J. M.; BARBADILLA, A.; LONG, M.; RUIZ, A. (1999). «Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element». *Science*, 285, p. 415-418.
- CALVETE, O.; GONZÁLEZ, J.; BETRÁN, E.; RUIZ, A. (2012). «Segmental duplication, micro-inversion and gene loss associated with a complex inversion breakpoint region in *Drosophila*». *Mol. Biol. Evol.*, 29, p. 1875-1889.
- CASALS, F.; CÁCERES, M.; RUIZ, A. (2003). «The foldback-like transposon *Galileo* is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*». *Mol. Biol. Evol.*, 20, p. 674-685.
- CHARLESWORTH, B.; MORGAN, M. T.; CHARLESWORTH, D. (1993). «The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation». *Genetics*, 134, p. 1289-1303.
- CHENG, C.; WHITE, B. J.; KAMDEM, C.; MOCKAITIS, K.; COSTANTINI, C.; HAHN, M. W.; BESANSKY, N. J. (2012). «Ecological genomics of *Anopheles gambiae* along a latitudinal cline: a population-resequencing approach». *Genetics*, 190, p. 1417-1432.
- CIRERA, S.; MARTÍN-CAMPOS, J. M.; SEGARRA, C.; AGUADÉ, M. (1995). «Molecular characterization of the breakpoints of an inversion fixed between *Drosophila melanogaster* and *D. subobscura*». *Genetics*, 139, p. 321-326.
- CIRERA, S.; AGUADÉ, M. (1997). «Evolutionary history of the sex-peptide (*Acp70A*) gene region in *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 147, p. 189-197.
- (1998). «Molecular evolution of a application: The sex-peptide (*Acp70A*) gene region of *Drosophila subobscura* and *Drosophila madeirensis*». *Mol. Biol. Evol.*, 15, p. 988-996.
- CLARK, A. G. [et al.] (2007). «Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny». *Nature*, 450, p. 203-218.
- CLARK, A. G.; MESSER, P. W. (2015). «Evolutionary genomics. Conundrum of jumbled mosquito genomes». *Science*, 347, p. 27-28.
- COLUZZI, M.; SABATINI, A.; DELLA TORRE, A.; DI DECO, M. A.; PETRARCA, V. (2002). «A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex». *Science*, 298, p. 1415-1418.
- CORBETT-DETIG, R. B.; HARTL, D. L. (2012). «Population genomics of inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster*». *PLoS Genet.*, 8. DOI 10.1371/journal.pgen.1003056.
- DARWIN, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. Londres: John Murray.
- DELPRAT, A.; NEGRE, B.; PUIG, M.; RUIZ, A. (2009). «The transposon *Galileo* generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination». *PLoS One*, 4. DOI 10.1371/journal.pone.0007883.
- FAY, J. C.; WU, C. I. (2000). «Hitchhiking under positive Darwinian selection». *Genetics*, 155, p. 1405-1413.
- FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. (2007). «Mammalian karyotype evolution». *Nature Rev. Gen.* 8, p. 950-962.

- FINNEGAN, D. J. (1989). «Eukaryotic transposable elements and genome evolution». *Trends Genet.*, 5, p. 103-107.
- FLOWERS, J. M.; PURUGGANAN, M. D. (2008). «The evolution of plant genomes: scaling up from a population perspective». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18, p. 565-70.
- FONTAINE, M. C.; PEASE, J. B.; STEELE, A.; WATERHOUSE, R. M.; NEAFSEY, D. E.; SHARAKHOV, I. V.; JIANG, X.; HALL, A. B.; CATTERUCCIA, F.; KAKANI, E.; MITCHELL, S. N.; WU, Y. C.; SMITH, H. A.; LOVE, R. R.; LAWNICZAK, M. K.; SLOTMAN, M. A.; EMRICH, S. J.; HAHN, M. W.; BESANSKY, N. J. (2015). «Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics». *Science*, 347. DOI 10.1126/science.1258524.
- GROTTHUSS, M. von; ASHBURNER, M.; RANZ, J. M. (2010). «Fragile regions and not functional constraints predominate in shaping gene organization in the genus *Drosophila*». *Genome Res.*, 20, p. 1084-1096.
- GUILLÉN, Y.; RUIZ, A. (2012). «Gene alterations at *Drosophila* inversion breakpoints provide *prima facie* evidence for natural selection as an explanation for rapid chromosomal evolution». *BMC Genomics*, 13, p. 53.
- HAHN, M. W.; KERN, A. D. (2005). «Comparative genomics of centrality and essentiality in three eukaryotic protein-interaction networks». *Mol. Biol. Evol.*, 22, p. 803-806.
- HANCOCK, A. M.; WITONSKY, D. B.; EHLER, E.; ALKORTA-ARANBURU, G.; BEALL, C.; GEBREMEDHIN, A.; SUKERNIK, R.; UTERMANN, G.; PRITCHARD, J.; COOP, G.; DI RIENZO, A. (2010). «Human adaptations to diet, subsistence, and ecoregion are due to subtle shifts in allele frequency». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, p. 8924-8930.
- HARRIS, H. (1966). «Enzyme polymorphism in man». *Proc. R. Soc. London Series B Biol. Sci.*, 164, p. 298-310.
- HASSON, E.; EANES, W. F. (1996). «Contrasting histories of three gene regions associated with *In(3L)Payne* of *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 144, p. 1565-1575.
- HERMISSON, J.; PENNINGS, P. S. (2005). «Soft sweeps: molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation». *Genetics*, 169, p. 2335-2352.
- HUDSON, R. R. (1983). «Properties of a neutral allele model with intragenic recombination». *Theoret. Pop. Biol.*, 23, p. 183-201.
- HUDSON, R. R.; KAPLAN, N. L. (1988). «The coalescent process in models with selection and recombination». *Genetics*, 120, p. 831-840.
- HUDSON, R. R.; KREITMAN, M.; AGUADÉ, M. (1987). «A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data». *Genetics*, 116, p. 153-159.
- KAPLAN, N. L.; HUDSON, R. R.; LANGLEY, C. H. (1989). «The “hitchhiking effect” revisited». *Genetics*, 123, p. 887-899.
- KIM, Y.; STEPHAN, W. (2002). «Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome». *Genetics*, 160, p. 765-777.
- KIMURA, M. (1968). «Evolutionary rate at the molecular level». *Nature*, 217, p. 624-626.
- KINGMAM, J. F. C. (1982). «The coalescent». *Stochastic Process. Appl.*, 13, 235-248.
- KREITMAN, M. (1983). «Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*». *Nature*, 304, p. 412-417.
- KREITMAN, M.; AGUADÉ, M. (1986a). «Genetic uniformity in two populations of *Drosophila melanogaster* as revealed by filter hybridization of four-nucleotide-recognizing restriction enzyme digests». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, p. 3562-3566.

- (1986b) «Excess polymorphism at the *Adh* locus in *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 114, p. 93-110.
- KRIMBAS, C. B.; POWELL, J. R. (ed.) (1992). *Drosophila Inversion Polymorphism*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- KUITTINEN, H.; AGUADÉ, M. (2000). «Nucleotide variation at the *Chalcone isomerase locus* in *Arabidopsis thaliana*». *Genetics*, 155, p. 863-872.
- KUNZE-MÜHL, E.; MÜLLER, E. (1958). «Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und die natürlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll». *Chromosoma*, 9, p. 559-570.
- LANDER, E. S. [et al.] (2001). «Initial sequencing and analysis of the human genome». *Nature*, 409, p. 860-921.
- LANGLEY, C. H.; MONTGOMERY, E.; QUATTLEBAUM, W. F. (1982). «Restriction map variation in the *Adh* region of *Drosophila*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, p. 5631-5635.
- LEMOIS, B.; BETTENCOURT, B. R.; MEIKLEJOHN, C. D.; HARTL, D. L. (2005). «Evolution of proteins and gene expression levels are coupled in *Drosophila* and are independently associated with mRNA abundance, protein length, and number of protein-protein interactions». *Mol. Biol. Evol.*, 22, p. 1345-1354.
- LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. (1966). «A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*». *Genetics*, 54, p. 595-609.
- LINNEN, C. R.; KINGSLEY, E. P.; JENSEN, J. D.; HOEKSTRA, H. E. (2009). «On the origin and spread of an adaptive allele in deer mice». *Science*, 325, p. 1095-1098.
- LINNEN, C. R.; POH, Y. P.; PETERSON, B. K.; BARRETT, R. D.; LARSON, J. G.; JENSEN, J. D.; HOEKSTRA, H. E. (2013). «Adaptive evolution of multiple traits through multiple mutations at a single gene». *Science*, 339, p. 1312-1316.
- LEWONTIN, R. C.; MOORE, J. A.; PROVINE, W. B.; WALLACE, B. (ed.) (1981). *Dobzhansky's Genetics of Natural Populations*. Nova York: Columbia University Press.
- LOUKAS, M.; KAFATOS, F. C. (1988). «Chromosomal locations of actin genes are conserved between the *melanogaster* and *obscura* groups of *Drosophila*». *Genetica*, 76, p. 33-41.
- LU, Y.; RAUSHER, M. D. (2003). «Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes». *Mol. Biol. Evol.*, 20, p. 1844-1853.
- LUISI, P.; ALVAREZ-PONCE, D.; DALL'OLIO, G. M.; SIKORA, M.; BERTRANPETIT, J.; LAAYOUNI, H. (2012). «Network-level and population genetics analysis of the insulin/TOR signal transduction pathway across human populations». *Mol. Biol. Evol.*, 29, p. 1379-1392.
- MARTÍN-CAMPOS, J. M.; COMERÓN, J. M.; MIYASHITA, N.; AGUADÉ, M. (1992). «Intraspecific and interspecific variation at the *y-ac-sc* region of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 130, p. 805-816.
- MATZKIN, L. M.; MERRITT, T. J.; ZHU, C. T.; EANES, W. F. (2005). «The structure and population genetics of the breakpoints associated with the cosmopolitan chromosomal inversion *In(3R)Payne* in *Drosophila melanogaster*». *Genetics*, 170, p. 1143-1152.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. (1977). «A new method for sequencing DNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, p. 560-564.
- MAYNARD-SMITH, J.; HAIGH, J. (1974). «The hitch-hiking effect of a favorable gene». *Genet. Res.*, 23, p. 23-35.
- MCDONALD, J. H.; KREITMAN, M. (1991). «Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*». *Nature*, 354 (6349), p. 114-116.

- MENDEL, G. (1866). «Versuche über Pflanzenhybriden». *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brinn*, 4, p. 3-47.
- MUNTÉ, A.; ROZAS, J.; AGUADÉ, M.; SEGARRA, C. (2005) «Chromosomal inversion polymorphism leads to extensive genetic structure: a multilocus survey in *Drosophila subobscura*». *Genetics*, 169, p. 1573-1581.
- NAVARRO-SABATÉ, A.; AGUADÉ, M.; SEGARRA, C. (1999) «Excess of nonsynonymous polymorphism at *AcpH-1* in different gene arrangements of *Drosophila subobscura*». *Mol. Biol. Evol.*, 20, p. 1833-1843.
- NAVARRO, A.; BETRÁN, E.; BARBADILLA, A.; RUIZ, A. (1997). «Recombination and gene flux caused by gene conversion and crossing over in inversion heterokaryotypes». *Genetics*, 146, p. 695-709.
- NEAFSEY, D. E. [et al.] (2015). «Mosquito genomics. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes». *Science*, 347. DOI 1126/science.1258522.
- NEWMAN, T. L.; TUZUN, E.; MORRISON, V. A.; HAYDEN, K. E.; VENTURA, M.; McGRATH, S. D.; ROCCHI, M., EICHLER, E. E. (2005). «A genome-wide survey of structural variation between human and chimpanzee». *Genome Res.*, 15, p. 1344-1356.
- NIELSEN, R.; WILLIAMSON, S.; KIM, Y.; HUBISZ, M. J.; CLARK, A. G.; BUSTAMANTE, C. (2005). «Genomic scans for selective sweeps using SNP data». *Genome Res.*, 15, p. 1566-1575.
- NÓBREGA, C.; KHADEM, M.; AGUADÉ, M.; SEGARRA, C. (2008). «Genetic exchange versus genetic differentiation in a medium-sized inversion of *Drosophila*: the A_2/A_{s1} arrangements of *Drosophila subobscura*». *Mol. Biol. Evol.*, 25, p. 1534-1543.
- ORENGO, D. J.; PUERMA, E.; PAPACEIT, M.; SEGARRA, C.; AGUADÉ, M. (2015). «A molecular perspective on a complex polymorphic inversion system with cytological evidence of multiply reused breakpoints». *Heredity*. DOI 10.1038/hdy.2015.4.
- PAPACEIT, M.; AGUADÉ, M.; SEGARRA, C. (2006). «Chromosomal evolution of elements B and C in the *Sophophora* subgenus of *Drosophila*: evolutionary rate and polymorphism». *Evolution*, 60, p. 768-781.
- PAPACEIT, M.; SEGARRA, C.; AGUADÉ, M. (2013). «Structure and population genetics of the breakpoints of a polymorphic inversion in *Drosophila subobscura*». *Evolution*, 67, p. 66-79.
- PARDO-DIAZ, C.; SALAZAR, C.; BAXTER, S. W.; MEROT, C.; FIGUEIREDO-READY, W.; JORON, M.; McMILLAN, W. O.; JIGGINS, C. D. (2012). «Adaptive introgression across species boundaries in *Heliconius* butterflies». *PLoS Genet*, 8, e1002752. DOI 10.371/journal.pgen.1002752.
- PENNINGS, P. S.; HERMISSON, J. (2006). «Soft sweeps II-molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration». *Mol. Biol. Evol.*, 23, p. 1076-1084.
- PEVZNER, P.; TESLER, G. (2003). «Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, p. 7672-7677.
- PUERMA, E.; ORENGO, D. J.; SALGUERO, D.; PAPACEIT, M.; SEGARRA, C.; AGUADÉ, M. (2014). «Characterization of the breakpoints of a polymorphic inversion complex detects strict and broad breakpoint reuse at the molecular level». *Mol. Biol. Evol.*, 31, p. 2331-2341.
- RAMOS-ONSINS, S.; AGUADÉ, M. (1998). «Molecular evolution of the *Cecropin* multigene family in *Drosophila*: functional genes vs. pseudogenes». *Genetics*, 150, p. 157-171.

- RAMOS-ONSINS, S. E.; STRANGER, B. E.; MITCHELL-OLDS, T.; AGUADÉ, M. (2004). «Multi-locus analysis of variation and speciation in the closely related species *Arabidopsis halleri* and *A. lyrata*». *Genetics*, 166, p. 373-388.
- RANZ, J. M.; SEGARRA, C.; RUIZ, A. (1997). «Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements *D* and *E* in the *Drosophila repleta* species group». *Genetics*, 145, p. 281-295.
- RANZ, J. M.; MAURIN, D.; CHAN, Y. S.; GROTHUSS, M. von; HILLIER, L. W.; ROOTE, J.; ASHBURNER, M.; BERGMAN, C. M. (2007). «Principles of genome evolution in the *Drosophila melanogaster* species group». *PLoS Biology*, 5, p. 1366-1381.
- ROZAS, J.; AGUADÉ, M. (1990). «Evidence of extensive genetic exchange in the *rp49* region among polymorphic chromosome inversions in *Drosophila subobscura*». *Genetics*, 126, p. 417-426.
- (1993). «Transfer of genetic information in the *rp49* region of *Drosophila subobscura* between different chromosomal gene arrangements». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, p. 8083-8087.
- (1994). «Gene conversion is involved in the transfer of genetic information between naturally occurring inversions of *Drosophila*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, p. 11517-11521.
- ROZAS, J.; SEGARRA, C.; RIBÓ, G.; AGUADÉ, M. (1999). «Molecular population genetics of the *rp49* gene region in different chromosomal inversions of *Drosophila subobscura*». *Genetics*, 151, p. 189-202.
- RUIZ, A.; WASSERMAN, M. (1993) «Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex». *Heredity*, 70, p. 582-596.
- SANGER, F.; TUPPY, H. (1951). «The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates». *Biochem. J.*, 49, p. 463-481.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, p. 5463-5467.
- SCHAEFFER, S. W. [et al.] (2008). «Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps». *Genetics*, 179, p. 1601-1655.
- SEGARRA, C.; AGUADÉ, M. (1992). «Molecular organization of the X chromosome in different species of the obscura group of *Drosophila*». *Genetics*, 130, p. 513-21.
- SEGARRA, C.; LOZOVSKAYA, E. R.; RIBÓ, G.; AGUADÉ, M.; HARTL, D. L. (1995). «P1 clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the obscura group of *Drosophila*». *Chromosoma*, 104, p. 129-136.
- SEGARRA, C.; RIBÓ, G.; AGUADÉ, M. (1996). «Differentiation of Muller's chromosomal elements *D* and *E* in the obscura group of *Drosophila*». *Genetics*, 144, p. 139-146.
- SORIA-CARRASCO, V.; GOMPERT, Z.; COMEAULT, A. A.; FARKAS, T. E.; PARCHMAN, T. L.; JOHNSTON, J. S.; BUERKLE, C. A.; FEDER, J. L.; BAST, J.; SCHWANDER, T.; EGAN, S. P.; CRESPI, B. J.; NOSIL, P. (2014). «Stick insect genomes reveal natural selection's role in parallel speciation». *Science*, 344, p. 738-742.
- STEPHAN, W.; LANGLEY, C. H. (1989). «Molecular genetic variation in the centromeric region of the X chromosome in three *Drosophila ananassae* populations. I. Contrasts between the *vermillion* and *forked* loci». *Genetics*, 121, p. 89-99.

- STURTEVANT, A. H. (1917). «Genetic factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 3, p. 555-558.
- TAJIMA F. (1989). «Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism». *Genetics*, 123, p. 585-595.
- TONZETICH, J.; LYTTLE, T. W.; CARSON, H. L. (1988). «Induced and natural break sites in the chromosomes of Hawaiian *Drosophila*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, p. 1717-1721.
- TSAUR, S. C.; WU, C. I. (1997). «Positive selection and the molecular evolution of a gene of male reproduction, *Acp26Aa* of *Drosophila*». *Mol. Biol. Evol.*, 14, p. 544-549.
- VENTER, J. C. [et al.] (2001). «The sequence of the human genome». *Science*, 291, p. 1304-1351.
- WEISS, G.; HAESELER, A. von (1998). «Inference of population history using a likelihood approach». *Genetics*, 149, p. 1539-1546.
- WESLEY, C. S.; EANES, W. (1994). «Isolation and analysis of the breakpoint sequences of chromosome inversion *In(3L)Payne* in *Drosophila melanogaster*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, p. 3132-3136.
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. (1965). «Molecules as documents of evolutionary history». *J. Theor. Biol.*, 8, p. 357-366.

