

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA REGIÓN NO CODIFICADORA DEL DNA MITOCÓNDRICO EN *Caretta caretta* Y *Chelonia mydas* DEL SUROESTE DE CUBA: UNA PERSPECTIVA REGIONAL.

Ariel Ruiz U. ¹, Emir Pérez B. ¹, Frander Brian Riverón G. ¹, Federico Alberto Abreu G. ², Talía Pérez M. ³, Juan Solano A. ¹, Maribel González P. ¹, Roberto Frías S. ¹, Rogelio Díaz F. ¹ y Georgina Espinosa L. ^{1*}.

- (1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba.
(2) Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 811, Mazatlán, CP 82000, Sinaloa México.
(3) Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna, Ave. Boteros No.12555 esq. Capdevila, Boyeros, Cuba.
(* Autor correspondiente: Email: georgina@fbio.uh.cu

RESUMEN

En la región no codificadora (RNC) del DNA mitocondrial (mtDNA) se ha informado la razón de sustitución intragénica más rápida de la molécula. En este trabajo, caracterizamos las secuencias de la mitad 5' de la RNC de los haplotipos identificados en las colonias de anidación del suroeste de Cuba de *Chelonia mydas* y *Caretta caretta*, teniendo en cuenta el tipo y sentido de sustitución nucleotídica, respecto al haplotipo ancestral y los centros de diversificación determinados dentro de cada linaje. Los haplotipos de *C. mydas* pertenecieron a un sólo linaje, mientras que en *C. caretta* a dos. La mayoría de las sustituciones intraespecíficas fueron transiciones, con balance similar entre purinas y pirimidinas, así como entre los sentidos de las sustituciones en relación al camino más parsimonioso respecto al ancestro. El mayor porcentaje de estas sustituciones representaron cambios diagnósticos para *C. caretta* respecto a *C. mydas*. Los porcentajes equitativos de transiciones entre purinas y pirimidinas, concuerdan con la abundancia de A y T, y con la predisposición a la conversión de CpG por el alto porcentaje de metilación de *C. Chelonia mydas* presenta una distribución de mutaciones similar entre los linajes de la cuenca atlántica a diferencia de *C. caretta*, porque los de esta última no comparten un ancestro común. Por consiguiente, entre estos linajes pueden ocurrir homoplasias y fijarse un mayor número de mutaciones, apareciendo transversiones e indels diagnósticos de linajes en la medida en que aumentan las distancias evolutivas entre éstos.

Palabras claves: mtDNA; mutación; *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*; ASW, Cuba

ABSTRACT

Inside mitochondrial DNA (mtDNA), Non Coding Region (NCR) has been reported to have the fastest intragene substitution rate. We considered the type and direction of nucleotide substitution regarding the ancestor haplotype and the diversification centers inside each lineage. sequences of the 5' half from NCR were characterized in identified haplotypes from southwestern Cuba rookeries of *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *C. mydas* haplotypes only belonged to one lineage, while *C. caretta*'s belonged to two lineages. Most of the intraspecific substitutions were transitions, with similar balance between purines and pyrimidines, as well as among the substitutions directions in relation to the most parsimonious way regarding the ancestor. A higher percentage of these substitutions represented diagnostic changes for *C. caretta* compared to *C. mydas*. Equitatives percentages of transitions between purines and pyrimidines agreed both with the abundance of A and T, and with the bias to the conversion of CpG and, due to the high percentage of metilation of *C. C. mydas*, showed a similar distribution of mutations among Atlantic basin lineages. On the contrary, *C. caretta* did not showed the same behavior because their lineages did not share a common ancestor. Consequently, homoplasies may occur among these lineages and a higher number of mutations may be fixed, appearing then lineages' diagnostic transversions and indels while their evolutionary distances increases.

Key words: mtDNA; mutations; *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*; ASW, Cuba

El DNA mitocondrial (mtDNA) ha sido usado con frecuencia para dilucidar identidades poblacionales y caminos evolutivos de linajes de animales por poseer un conjunto de características específicas entre las que se encuentran: 1) herencia materna en asociación con la falta de recombinación, y 2)

rápida razón de divergencia por mutación. Como consecuencia, las frecuencias de los genotipos de mtDNA están más fuertemente influenciadas por los efectos de la deriva genética y los cuellos de botella poblacionales (Karl *et al.*, 1992), por lo que puede actuar como un excelente identificador de

los patrones de colonización, incluyendo los eventos fundadores y los caminos evolutivos de los linajes (Avise *et al.*, 1984; Harrison, 1988).

En la región no codificadora (RNC) se ha informado la razón de sustitución intragénica más rápida de la molécula en el intervalo de 2.8 (Cann *et al.*, 1984), y 5 veces (Aquadro y Greenberg, 1983) la razón del resto del mtDNA. Debido a esta alta variabilidad, la divergencia de esta región ha proveído información útil para la identificación de linajes (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

En general, el genoma mitocondrial de tortugas se caracteriza por bajas tasas de evolución y diversidad inusuales con respecto a los demás vertebrados (Avise *et al.*, 1992). En el caso particular de *C. mydas*, Encalada *et al.* (1996) informan una razón evolutiva para la RNC del mtDNA de 0.012 – 0.024 sustituciones por sitio por millón de años, basados en el reloj molecular calibrado con RFLP en 0.2 – 0.4% de divergencia por millón de años para Testudines (Avise *et al.*, 1992; Bowen *et al.*, 1993). La RNC de *C. mydas* tiene una longitud de ca. 981 pb aproximadamente, flanqueada por los genes de tRNA Thr y Pro (Kumazawa y Nishida, 1999). Contiene una región hipervariable de aproximadamente 640 pb, tres secuencias conservadas: CSB-1, CSB.2 y CSB-3 de 23, 15 y 17 pb respectivamente, así como un grupo de repeticiones del dinucleótido TA, que abarca alrededor de 50 pb. La RNC del mtDNA de *C. caretta* varía en longitud desde 1230 hasta 1630 pb aproximadamente, y tiene una estructura similar a la de *C. mydas* (Laurent *et al.*, 1998). Considerando la razón evolutiva para la RNC del mtDNA de *C. mydas* según Encalada *et al.* (1996), Bowen *et al.* (1993) y Avise *et al.* (1992), se han analizado los tiempos de divergencia de secuencias de *C. caretta* (Encalada *et al.*, 1998).

Adicionalmente, la composición de la secuencia se ha tenido en cuenta para determinar el modelo de distancia a seguir considerando las proporciones entre A+T y C+G, y entre los tipos de mutaciones (Lahanas *et al.*, 1994; Encalada *et al.*, 1996 y 1998; Laurent *et al.*, 1998; Formia *et al.*, 2002a y b; Bjorndal *et al.*, 2005). En el presente trabajo se caracterizaron las secuencias de los haplotipos identificados en las colonias de anidación de *C. mydas* y *C. caretta* del suroeste de Cuba en dos escenarios: 1) dentro de cada linaje y 2) dentro de las colonias de anidación, que al menos compartieron un haplotipo con las cubanas. Para lo cual se determinaron los centros de diversificación, el haplotipo ancestral dentro de cada linaje,

el tipo y sentido de sustitución nucleotídica respecto a cada haplotipo ancestral, así como los sitios polimórficos (SPs) persistentes en las colonias de anidación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las muestras analizadas en este trabajo se tomaron en *C. caretta* acorde a Ruiz *et al.* (2008) y en *C. mydas* en la Península de Guanahacabibes (playa Antonio [21°91'N; 84°65'O]; playa Caleta de los Piojos [21° 82'N; 84°87'O] y Archipiélago de los Canarreos (Cayo Real [21°58'N; 83°36'O]) en Cuba.

Obtención y procesamiento de las muestras

Se colectaron, en playas de anidación del suroeste de Cuba, muestras de tejido correspondientes a embriones de nidos diferentes, concomitantes en el estadio de desarrollo: *C. mydas* – tres en playa Antonio y catorce en playa Caleta de los Piojos durante la temporada de anidación del año 2000 y once en Cayo Real en agosto de 1998; *C. caretta* según Ruiz *et al.* (2008). A partir de estas muestras se obtuvieron secuencias parciales de la RNC del mtDNA empleando la metodología descrita en Ruiz *et al.* (2008).

Las secuencias obtenidas en las colonias de anidación del suroeste cubano fueron identificadas y caracterizadas a través del alineamiento con los haplotipos que tipifican el linaje restringido al hemisferio Norte [B] para *C. mydas*: CM-A1, 2, 4, 8 – 18 (Encalada *et al.*, 1996), números de acceso en el GenBank: Z50124, Z50125, Z50126, Z501350 – 40; CM-A3 (Allard *et al.*, 1994), número de acceso en el GenBank: M98394; CM-A22 (Bass y Witzell, 2000), número de acceso en el GenBank: AF366251; CM-A23 – 34 (Bjorndal y Bolten, inscritos en el GenBank 2001), números de acceso en el GenBank: AF366252 – 63; CM-A35 – 46 y 50 – 53 (Formia, inscritos en el Archie Carr Center); CM-A49 (Bagley, 2003); CM-A54 (Meylan, inscrito en el Archie Carr Center) y CM-A55 (Naro-Maciel *et al.*, 2007), número de acceso en el GenBank: DQ294212, utilizando el programa Clustal X 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). Para esta selección se consideró la disyunción genética entre los linajes de *C. mydas* de las cuencas Atlántica e Indopacífica (Bowen *et al.*, 1992), y la existente entre los linajes del Caribe occidental – Mar Mediterráneo [B] con respecto a los del Caribe oriental – Atlántico Sur [A] (Encalada *et al.*, 1996). Los alineamientos se rectificaron visualmente. Para

C. caretta el alineamiento fue hecho siguiendo los criterios expuestos en Ruiz *et al.* (2008).

La numeración de los sitios polimórficos (SPs) se realizó tomando como referencia la primera base de la mitad 5' de la RNC del mtDNA [*C. mydas* según Kumazawa y Nishida (1999); *C. caretta* según Laurent *et al.* (1998)]. En el caso en que existió un indel de más de una base, el SP se identificó con el número correspondiente al primer nucleótido, manteniendo en el próximo SP una correspondencia entre la numeración del nucleótido de la secuencia original y el SP en cuestión. La posición de los haplotipos de las colonias de anidación del suroeste cubano fue dilucidada mediante la construcción de un árbol con las menores mediciones entre los haplotipos del linaje (Rohlf, 1973). Las mutaciones en los SP se clasificaron acorde al tipo de sustitución, determinándose el sentido respecto al haplotipo ancestral y su frecuencia. Los sitios polimórficos únicos de cada especie fueron considerados diagnósticos de haplotipos. Los cambios no repetidos dentro de un linaje, pero fijados en el otro, se consideraron como diagnósticos de haplotipos dentro de cada linaje. Los cambios fijados dentro de cada linaje fueron considerados como diagnósticos entre linajes. En aquellos linajes donde hubo más de un centro de diversificación se contó la cantidad de cambios de cada haplotipo, respecto al haplotipo más interno, y con mayor número de conexiones de cada centro de diversificación. La dependencia entre el número y el tipo de cambio (interno o externo) se determinó mediante un X^2 (Sokal y Rohlf, 1981), corregida con el procedimiento de Bonferroni (Rice, 1989) con 1000 simulaciones (Roff y Bentzen, 1989), a través del programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin, 1993).

RESULTADOS.

Chelonia mydas

Los haplotipos encontrados en el suroeste de Cuba pertenecieron al linaje B (Fig. 1). Se informan tres nuevos haplotipos endémicos para las colonias de anidación cubanas, designados como CM-A48, 56 y 57, acorde con la nomenclatura propuesta por el Archie Carr Center for Sea Turtle Research, inscritos en el GenBank con los números de acceso: AJ543730, AJ543732 y AJ543735. Otros dos haplotipos (CM-A27 y 28; inscritos en el GenBank, 2001), encontrados en la colonia de anidación de la península de Guanahacabibes, también podrían ser endémicos si sus descriptores (Bjorndal y Bolten) los encontraron en un área

marina de agregación. Solamente uno de los haplotipos endémicos (CM-A48), presente en áreas de desarrollo de la Florida (Bagley, 2003), fue compartido entre las dos colonias de anidación del suroeste de Cuba.

Los cinco haplotipos encontrados en las colonias de anidación del suroeste cubano estuvieron interconectados en una red donde existieron uno o dos cambios por pares de haplotipos vecinos (ver Fig. 1), respecto a los dos haplotipos más distribuidos y mejor representados (CM-A1 y 3; *i. e.*, centros de diversificación) en el linaje y en las colonias de anidación del Gran Caribe (Encalada *et al.*, 1996). El número de cambios existentes entre los haplotipos del linaje respecto a los haplotipos CM-A1 y 3, considerando el camino más parsimonioso, fue independiente del centro de diversificación ($X^2_{(4)} = 5.67$, $p = 0.24$). Cuando fueron discriminados los cambios con respecto a la posición (interna o externa) de los haplotipos, tampoco se encontró dependencia en el número de cambios entre los haplotipos internos y los centros de diversificación ($X^2_{(4)} = 0$). Sin embargo, se encontró dependencia en el número de cambios entre los haplotipos externos y los centros de diversificación ($X^2_{(4)} = 9.52$, $p = 0.03$), siendo más frecuente un cambio respecto a CM-A3 y dos respecto a CM-A1. Por consiguiente, designamos a CM-A1 como haplotipo ancestral del linaje B. Un tercer centro de diversificación fue encontrado alrededor del haplotipo 13 del Mediterráneo.

Del total de sustituciones (31), aproximadamente el 94% fueron transiciones repartidas con mayor frecuencia entre los 350 y 400 pb (Fig. 2b), excepto entre los 300 y 350 pb, existiendo un balance similar de purinas y pirimidinas, así como de los sentidos de las sustituciones en relación al camino más parsimonioso respecto al ancestro CM-A1: T→C (6) y C→T (8); A→G (7) y G→A (8). Las restantes sustituciones correspondieron a una transversión en el SP 365, que también constituyó una transición para otras relaciones, y a un indel de seis pb (CAATGG) en el SP 470. A su vez, aproximadamente el 32% de estas sustituciones representaron cambios diagnósticos para los haplotipos. La transversión y la inserción antes mencionadas lo fueron de CM-A14 y 48 respectivamente, mientras que las transiciones (8) en los SPs 39, 166, 172, 184, 357, 374, 438 y 459 lo fueron de CM-A31, 34, 2, 15, 29, 22, 30 y 54 respectivamente. De éstas, las sustituciones entre purinas y pirimidinas estuvieron en proporción 5:3. El sentido de las sustituciones diagnósticas, en relación al camino más parsimonioso con respecto

Tabla 1. Polimorfismo en la mitad 5' de la RNC del mtDNA (ca. 490 pb) de *C. mydas*, determinado en colonias de anidación del Gran Caribe. La numeración de los sitios polimórficos se realiza tomando como referencia la base 1 de la región de control del mtDNA (Kumazawa y Nishida, 1999). ±, indel de CAATGG. Haplotipos: CM-A1 – 4 (Allard *et al.*, 1994); CM-A5 (Lahanas *et al.*, 1994); CM-A15 – 18 (Encalada *et al.*, 1996); CM-A27 y 28 (Bjorndal & Bolten, inscritos en el GenBank 2001); CM-A48, 56 y 57 (inscritos en el GenBank 2003 por los autores).

Haplotipo	Sitios polimórficos																
	93	96	133	149	172	184	250	272	284	365	367	371	410	431	433	470	493
CM-A1	C	A	G	G	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A2	C	A	G	G	G	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A3	T	A	G	G	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A4	T	A	G	G	A	T	T	C	T	T	G	G	T	A	G	-	A
CM-A5	C	G	A	G	A	T	C	C	G	C	A	G	C	G	A	-	G
CM-A15	T	A	G	G	A	C	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A16	C	A	G	A	A	T	C	T	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A17	C	A	G	A	A	T	C	C	T	C	G	A	T	A	G	-	A
CM-A18	C	G	G	G	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A27	C	A	G	G	A	T	C	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A28	T	A	G	G	A	T	C	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-A48	C	A	G	G	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	+	A
CM-56	C	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A
CM-57	T	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	G	T	A	G	-	A

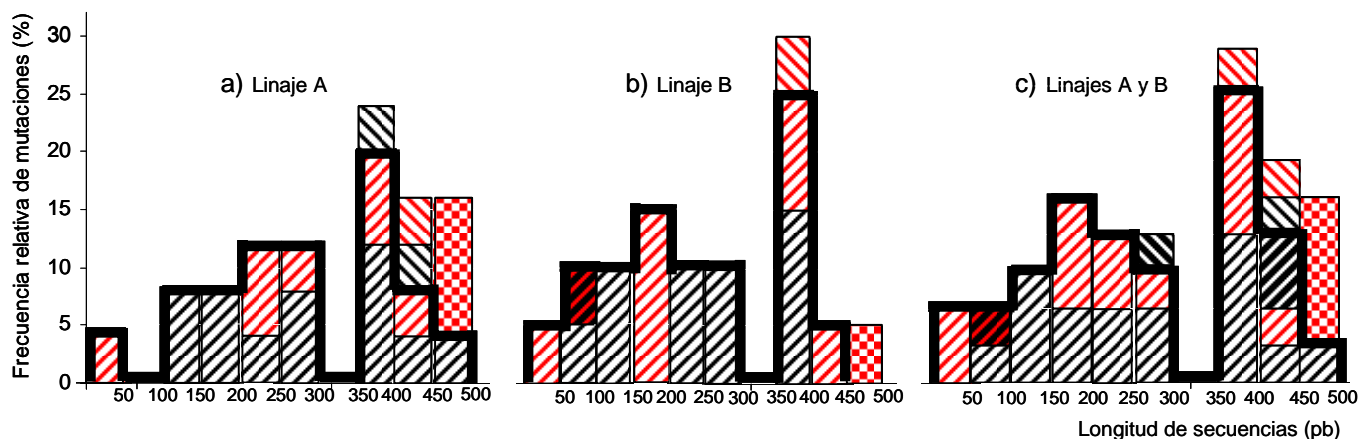


Fig. 2. Distribución de mutaciones en linajes de la cuenca atlántica de *C. mydas*. El análisis se basó en haplotipos de la RNC del mtDNA (ca. 493 pb). Transición, líneas inclinadas a la izquierda, por debajo de una línea negra continua y gruesa; Transversión, líneas inclinadas a la derecha; indel, a cuadros; cambios diagnósticos de haplotipo y de haplotipo dentro de linaje en rojo y rojo y negro respectivamente; cambios diagnósticos entre linajes en líneas negras oscuras.

Caretta caretta

Los haplotipos encontrados en el suroeste de Cuba pertenecieron a dos linajes [A y B] (Fig. 3), i.e. CC-A1, 2, 8, 10, 12 y 14. El CC-A12, informado para las áreas de forrajeo de Azores y Madeira según Bolten *et al.* (1998), resultó ser endémico de la Cayería San Felipe.

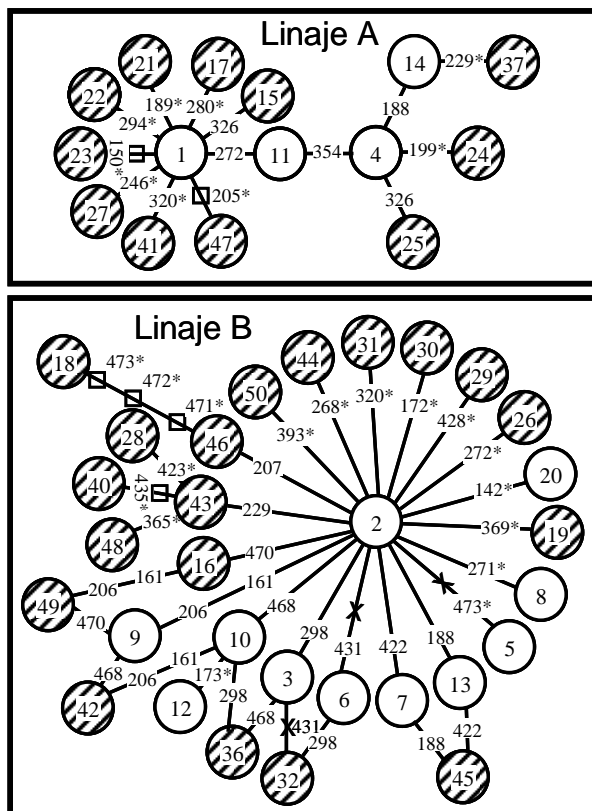


Fig. 3. Dendrograma no enraizado de máxima parsimonia basado en las diferencias nucleotídicas por pares de haplotipos de linajes de *C. caretta* en la cuenca atlántica. El análisis se basó en haplotipos de la RNC del mtDNA (ca. 380 pb). Círculo, indica al iésimo haplotipo – a rayas, haplotipos de origen desconocido; # fuera del círculo representa una mutación (transición), con un cuadrado una transversión, con una x un indel, y con un asterisco (*) un cambio diagnóstico dentro de cada linaje. Haplotipos: CC-A1 – 10 (Encalada *et al.*, 1998); CC-A11 – 17 (Bolten *et al.*, 1998); CC-A18 (Bass *et al.*, 2004); CC-A26 – 32 (Carreras *et al.*, 2006); CC-A37 y 40 (Roberts *et al.*, 2005); CC-A44 (Reece *et al.*, 2006); CC-A48 (Laurent *et al.*, 1998); CC-A19 – 23, 24 y 25, 36 y 41, 42, 43, 45, 49 y 50 según Bowen, Bass, Bolten, Carreras, Shamblin, Mazzarella, Monzon, Roberts y Casale respectivamente (inscritos en el Archie Carr Center).

Los haplotipos encontrados en las colonias de anidación del suroeste cubano estuvieron interconectados, dentro de cada linaje, en una red donde aparecieron uno o dos cambios por pares de haplotipos vecinos (ver Fig. 3) respecto a los dos haplotipos más distribuidos y mejor representados (CC-A1 y 2; i.e., centros de diversificación) de cada linaje, y en las colonias de anidación del Gran Caribe y Este de USA (Encalada *et al.*, 1998). En el linaje A hubo tres centros de diversificación alrededor de los haplotipos CC-A1, 11 y 4, con mayores probabilidades de ancestría para el caso de los dos primeros centros de diversificación. El número de cambios entre los haplotipos de este linaje respecto a los haplotipos CC-A1 y 11, considerando el camino más parsimonioso, fue dependiente del centro de diversificación ($X^2_{(3)} = 14.79$, $p < 0.001$). Cuando se realizó un análisis similar al anterior, discriminando los cambios respecto a la posición (interna o externa) de los haplotipos, no se encontró dependencia para el número de cambios entre los haplotipos internos y los centros de diversificación ($X^2_{(2)} = 0$). Sin embargo, se encontró dependencia en el número de cambios existentes entre los haplotipos externos y los centros de diversificación ($X^2_{(3)} = 19.33$, $p < 0.001$), siendo más frecuente un cambio respecto a CC-A1 y dos respecto a CC-A11. Por consiguiente, designamos a CC-A11 como haplotipo ancestral del linaje A. En el linaje B sólo existió un centro de diversificación alrededor del haplotipo CC-A2, lo cual simplificó su designación como haplotipo ancestral del linaje.

Del total de sustituciones del linaje A (14), aproximadamente el 88% fueron transiciones, repartidas con mayor frecuencia entre los 150 y 350 pb (Fig. 4a), con igual balance de purinas y pirimidinas, pero con variaciones en el sentido de las sustituciones en relación al camino más parsimonioso respecto al ancestro CC-A11: T→C (4) y C→T (2); A→G (4) y G→A (2). Las restantes sustituciones correspondieron a dos transversiones en los SPs 150 y 205. A su vez, aproximadamente el 64% de estas sustituciones estuvo representado por cambios diagnósticos para los haplotipos. Las transversiones antes mencionadas lo fueron de CC-A23 y 47, mientras que las transiciones (7) en los SPs 189, 199, 229, 246, 280, 294 y 320 lo fueron de CC-A21, 24, 37, 27, 17, 22 y 41 respectivamente. De éstas, las sustituciones entre purinas y pirimidinas aparecieron en proporción 3:4. El sentido de las sustituciones diagnósticas, en relación al camino más parsimonioso con respecto al haplotipo ancestral, fue diferente entre las transiciones de

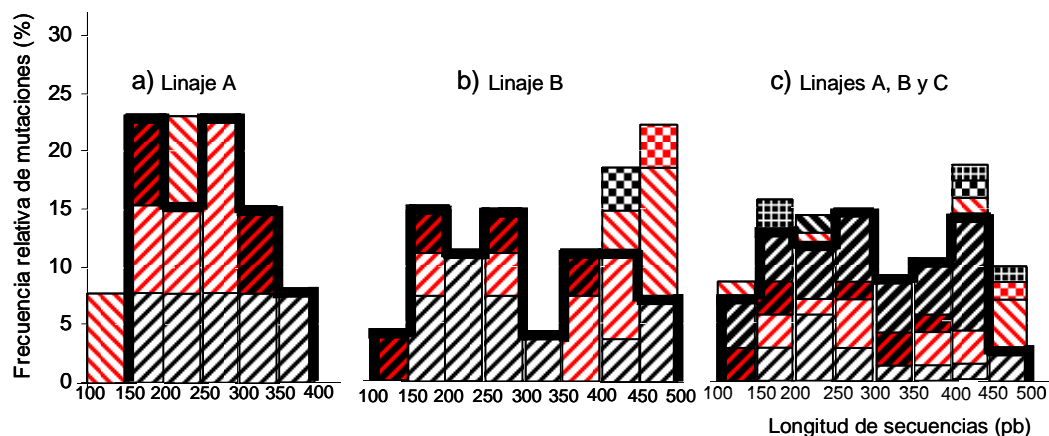


Fig. 4. Distribución de mutaciones en linajes de la cuenca atlántica de *C. caretta*. El análisis se basó en haplotipos de la RNC del mtDNA (ca. 380 pb). Transición, representadas en líneas inclinadas a la izquierda, por debajo de una línea negra continua y gruesa; Transversión, líneas inclinadas a la derecha; indel, a cuadros; cambios diagnósticos de haplotipo y de haplotipo dentro de linaje en rojo y rojo y negro respectivamente; cambios diagnósticos entre linajes en líneas negras oscuras o retículos en blanco y negro.

purinas: T→C (2) y C→T (2); A→G (3) y G→A (0). Dos de estas transiciones (SPs 189 y 320) se fijaron en al menos uno de los otros linajes. Para el linaje B, del total de sustituciones (39), aproximadamente el 82% de las mutaciones se correspondió con transiciones repartidas, con mayor frecuencia entre los 150 y 500 pb (Fig. 4b) excepto entre los 300 y 350 pb. La mayor parte de las transiciones han ocurrido entre purinas respecto a pirimidinas, con similar balance entre los sentidos de las sustituciones en relación al camino más parsimonioso respecto al ancestro CC-A2: T→C (6) y C→T (6); A→G (9) y G→A (11). Las restantes sustituciones correspondieron a cuatro transversiones y dos indels en los SPs 435 y 471-3, y 431 y 473 respectivamente. A su vez, el 44% aproximado de estas sustituciones representó cambios diagnósticos para los haplotipos. Las transversiones antes mencionadas lo fueron de CC-A40 y 18, el indel en el SP 473 lo fue de CC-A5, mientras que las transiciones (11) en los SPs 142, 172, 173, 268, 271, 272, 320, 365, 369, 393, 423 y 428, lo fueron de CC-A20, 30, 63, 44, 8, 26, 31, 48, 19, 50, 28, y 29 respectivamente. De éstas, las sustituciones entre purinas y pirimidinas estuvieron en proporción 5:7. El sentido de las sustituciones diagnósticas en relación al camino más parsimonioso con respecto al haplotipo ancestral fue diferencial entre las transiciones de purinas y pirimidinas: T→C (5) y C→T (2); A→G (1) y G→A (4). Cuatro de estas transiciones (SPs 142, 173, 271 y 369) se fijaron en al menos uno de los otros linajes (Fig. 4a y b).

Entre los haplotipos correspondientes a las colonias de anidación del Gran Caribe y el sureste de USA se determinó un máximo de 26 SPs (Tabla 2). Estos SPs fueron clasificados en 22 transiciones, una interna dentro del indel 465 en la posición 468 y otros cuatro indels. Los indels de las posiciones 163, 304 y 465 constituyeron SPs diagnósticos entre los linajes representados, al igual que las transiciones de las posiciones 145, 147, 163, 214, 340, 356, 424 - 427, y 437. Los SPs 320 y 369 pudieron ser diagnósticos entre linajes, pero constituyeron transiciones diagnósticas de los haplotipos CC-A19 y 31 pertenecientes al linaje B. En la muestra del suroeste cubano persistieron la generalidad de los sitios polimórficos, menos los SPs 206, 298, 422 y el diagnóstico 473.

DISCUSIÓN

El alto porcentaje de transiciones encontrado en las secuencias parciales de la primera mitad de la RNC del mtDNA, ha sido informado para *C. mydas* (Lahanas *et al.*, 1994; Encalada *et al.*, 1996), *C. caretta* (Encalada *et al.*, 1998; Laurent *et al.*, 1998) y otras especies marinas (Brown *et al.*, 1993), y particularmente para la RNC del mtDNA en póngidos (Brown *et al.*, 1982), el hombre (Tamura y Nei, 1993) y en roedores (Brown *et al.*, 1986). Una proporción similar también ha sido informada para el DNA nuclear y para pseudogenes en varias especies (Graur y Li, 2000). Existen dos vías principales por las cuales ocurren las mutaciones puntuales (Topal y Fresco, 1976). En la primera,

Tabla 2. Polimorfismo en la mitad 5' de la región de control del mtDNA (ca. 380 pb) de *C. caretta*, determinado en colonias de anidación del Gran Caribe y el sureste de USA. La numeración de los sitios polimórficos se realiza tomando como referencia la base 1 de la región de control del mtDNA (Laurent *et al.*, 1998) ±, indel de GCAAGT, con una transición interna en el SP 468. Haplotipos: CC-A1 – 10 (Encalada *et al.*, 1998); CC-A11 – 14 (Bolten *et al.*, 1998); CC-A20 (Bowen, inscrito en el Archie Carr Center).

Haplotipo	Sitios polimórficos																									
	142	145	147	161	163	173	188	206	214	271	272	298	320	340	354	356	369	404	422	424	425	427	437	465	468	473
CC-A1	T	G	T	T	T	A	G	A	A	C	G	G	C	C	G	C	A	-	A	A	T	A	C	-	A	
CC-A2	C	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A
CC-A3	C	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	A	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A
CC-A5	C	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	-
CC-A7	C	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	G	G	C	G	T	+	A	A
CC-A8	C	A	C	C	-	G	G	A	G	C	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A
CC-A9	C	A	C	T	-	G	G	G	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A
CC-A10	C	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	G	A
CC-A11	T	G	T	T	T	A	G	A	A	C	A	G	C	C	G	C	A	-	A	A	T	A	C	-	A	
CC-A12	C	A	C	C	-	A	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	G	A
CC-A13	C	A	C	C	-	G	A	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A
CC-A14	T	G	T	T	T	A	A	A	A	C	A	G	C	C	A	C	A	-	A	A	T	A	C	-	A	
CC-A20	T	A	C	C	-	G	G	A	G	T	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	C	G	T	+	A	A

las transiciones devienen de asociaciones erróneas de purina – pirimidina, y pueden ocurrir en cualquier cadena. En la segunda, las transversiones devienen de asociaciones erróneas purina – purina, y sólo pueden ocurrir si la purina reside en la cadena molde. Por consiguiente, si la transversión tiene baja probabilidad de ocurrencia, entonces, cuando aparece, debe ser diagnóstica como ocurre en el haplotipo CM-A36 y entre linajes de *C. mydas* y en los haplotipos CC-A18, 23, 40 y 47 de *C. caretta*.

Los porcentajes equitativos de transiciones de purinas y pirimidinas encontrados en estas tortugas marinas concuerdan con la abundancia de A y T, y con la predisposición a la conversión de CpG. La desproporción entre las sumas de A y T respecto a G y C ha sido informada previamente para *C. mydas* por Lahanas *et al.* (1994) y para otras especies marinas (Saccone *et al.*, 1987; Arnason *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Sang *et al.*, 1994). En pseudogenes, la riqueza de A y T en la región no codificadora ha concordado con la tendencia al cambio de C y G a T y A respectivamente. Este fenómeno también puede ocurrir en la RNC del mtDNA porque no está sujeta a una restricción funcional (Graur y Li, 2000). La transición de C a T puede facilitarse a través de la

conversión de residuos de C metilada a residuos de T por desaminación, la cual ha sido más frecuente en CpG por el alto porcentaje de metilación de C (Razin y Riggs, 1980). Como consecuencia, y considerando la selectividad neutral sobre gran parte de esta región, aumenta la probabilidad de transiciones recientes en las bases más abundantes (A y T). Por otro lado, la abundancia de A y T ha sido un resultado de la predisposición histórica a la conversión de CpG. Entonces se cumplen las dos igualdades $f_{CT} = f_{GA}$ y $f_{TC} = f_{AG}$. Por esta razón, los cambios diagnósticos encontrados en los haplotipos de *C. mydas* y *C. caretta* son consecuencia de transiciones, generalmente en los sentidos A→G y T→C. Estos cambios concomitan con la edad del haplotipo, y su frecuencia se relaciona con la riqueza del contenido de A y T más que con la predisposición a la conversión de CpG.

En *C. mydas* se infiere que el indel correspondiente al SP 470 es una inserción porque no se presenta en el haplotipo ancestral, y su frecuencia es exclusiva de un solo haplotipo derivado en el linaje B. Otras dos inserciones han sido informadas para el mismo SP en haplotipos del linaje A de esta especie: CM-A7, como una repetición en tándem de diez pb [CCTTTGGTTG] (Lahanas *et al.*, 1994); CM-A25 y CM-A42, como repeticiones de diez

[CAATGGGTTG] y cuatro [CAGG] pb (Formia y Bruford, 2002). Estas inserciones sólo han sido encontradas en uno y dos individuos respectivamente. Consecuentemente, el haplotipo CM-A7 es considerado como raro (Lahanas *et al.*, 1994). Esta adición presente en el haplotipo CM-A7 también ha sido encontrada en los haplotipos CM-PE1 y 2, endémicos y bien representados en un linaje del Pacífico dentro del Atolón de la Micronesia (Moritz *et al.*, 2002). En esta misma posición se ha informado otra repetición en tándem para el haplotipo EI-A25 de *E. imbricata* (Díaz-Fernández, 1999) del linaje "Caribe B" (Okayama *et al.*, 1999). En *C. caretta* también se infiere que los indels correspondientes a los SPs 431 y 473 del linaje B son inserciones porque tampoco se presentan en el haplotipo ancestral y ocurren en sólo tres haplotipos del linaje. Otro indel en la posición 163, no informado por ser diagnóstico entre los linajes de la cuenca atlántica, también constituye una adición para el linaje A porque no se comparte con el linaje naturalmente emparentado del Pacífico. Sin embargo, los indels de uno y seis pares de bases en los SPs 404 y 465, tampoco informados, no pueden clasificarse porque sólo se presentan en el linaje B. Las duplicaciones en el mtDNA han tenido una distribución geográfica y filogenética restringida también en otras especies y se propone que estas duplicaciones tienen una vida corta en relación a la escala de tiempo evolutivo (Moritz y Brown, 1987). Otra inserción de diez pb se encuentra en la secuencia del haplotipo CM-A25 de *C. mydas* (Bjorndal y Bolten, inscrito en el Archie Carr Center for Sea Turtle Research). En *C. mydas* y *E. imbricata* son frecuentes las repeticiones nucleotídicas continuas en los 30 pb antecesores a la inserción. También ocurre en las antecesoras a las adiciones y al indel de seis pares de bases del linaje B de *C. caretta*. Estas áreas son ricas en GT.

En microsatélites de otras especies, la aparición de nuevas variantes genéticas ha sido explicada por el mal apareamiento de las bases, provocado por el deslizamiento de la cadena durante la replicación en áreas ricas en GT (Goldstein y Schlotterer, 1999). En levaduras se ha observado, que la enzima incrementa la frecuencia de mutaciones en tramos con abundancia de GT (Strand *et al.*, 1993). Adicionalmente, en fragmentos de secuencias con repeticiones se han incrementado las mutaciones puntuales de 130 – 240 veces, porque la DNA polimerasa δ (delta) pierde la capacidad de corregir errores (Morrison *et al.*, 1993). Por consiguiente, la presencia de indels en *C. mydas* y *C. caretta* podría ser más probable en un área

específica de la RNC con repeticiones, y su composición debería también ser similar. De hecho una de estas inserciones es común en linajes alopátridos de *C. mydas* de las cuencas atlántica y pacífica. La frecuencia significativa de los haplotipos endémicos que portan las inserciones en *C. mydas*, tanto en las colonias del suroeste cubano como en la Micronesia, es otra evidencia de que en las islas pueden fijarse variantes raras durante las fluctuaciones demográficas, y cambiar sus frecuencias por acción de la deriva genética en ausencia de migraciones significativas.

C. mydas presenta una distribución similar de mutaciones entre los linajes de la cuenca atlántica a diferencia de *C. caretta*, especie en la que predominan los cambios diagnósticos de forma general (de haplotipos, haplotipos dentro de linajes y entre linajes; ver Figs. 2 y 4). Los linajes de la cuenca atlántica de *C. caretta* no están relacionados naturalmente, es decir, no comparten un ancestro común como sucede en *C. mydas*. Por consiguiente, entre estos linajes pueden ocurrir homoplasias y fijarse un mayor número de mutaciones, apareciendo transversiones e indels diagnósticos de linajes en la medida en que aumenten las distancias evolutivas entre éstos como sucede en roedores (Brown *et al.*, 1986). A mi juicio, este argumento ha sido la única razón sólida para explicar el por qué hay mayores cambios, incluso transversiones etc. en *C. caretta* respecto a *C. mydas*. Realmente estos mecanismos de distribución (vicarianza en *C. mydas* y vicarianza y dispersión en *C. caretta* son la causa del curso y tipo de mutaciones respecto al ancestro más cercano. Adicionalmente, cualquier fuerza evolutiva que actúe sobre cualquier sitio nucleotídico afectará la historia de la molécula completa, por lo que la fijación de una mutación ventajosa por selección, puede causar la fijación de otros polimorfismos a través del proceso de coadaptación (Wallace 1991). El hecho de que exista una variación clinal de los haplotipos más distribuidos y representados en los linajes de *C. caretta* (Ruiz *et al.*, 2008) podría estar asociada a una influencia climática de la latitud, a pesar de que se asume neutralidad para la RNC.

En vertebrados exotérmicos la razón de sustitución promedio es más baja que en endotermos de semejante tamaño (Martin y Palumbi, 1993), y en invertebrados, haplogrupos de *Drosophila* son dependientes de la temperatura (Doi *et al.*, 1999). Razones por la que no debe asumirse una misma razón de mutación para calibrar el reloj molecular de cada especie (Ballar y Rand, 2005).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Erik García Machado, Aymée Robainas Barcia y Vicente Berovides por los comentarios y sugerencias durante la preparación del manuscrito. Estos resultados formaron parte de la tesis de licenciatura en Biología de Frander B. Riverón Giró y Talía Pérez Martínez y de la tesis doctoral de Ariel Ruiz Urquiola en la Universidad de La Habana.

REFERENCIAS

- Allard, M.W., M.M. Miyamoto, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten and B.W. Bowen (1994): Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994:34-41.
- Aquadro, C.F., and B.D. Greenberg (1983): Human mitochondrial dna variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven Individuals. *Genetics* 103:287-312.
- Arnason, U., A. Gullberg and B. Widengren (1993): Cetacean mitochondrial DNA control region: Sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. *Mol. Biol. Evol.* 10:960-970.
- Avise, J.C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan, and E. Bermingham (1992): Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molec. Biol. Evol.* 9:457-473.
- Avise, J.C., J.E. Neigel and J. Arnold. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Jour. Mol. Evol.* 20:99-105.
- Awadalla, P., A. Eyre-Walker and J.M. Smith (1999): Linkage disequilibrium and recombination In Hominid Mitochondrial DNA. *Science* 286:2524-2525.
- Bagley, D.A. (2003): Characterizing juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) from three east central Florida developmental habitats. MS thesis, University of Central Florida, Orlando, Florida, USA. 113 pp.
- Ballar, J.W.O. and D.M. Rand (2005): The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:621-42.
- Bass A.L. and W.N. Witzell (2000): Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. *Herpetologica* 56(3):357-367.
- Bjorndal, K.A., A.B. Bolten and S. Troëng (2005): Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Mar. Biol.* 147:1449-1457.
- Bolten, A.B., K.A. Bjorndal, H.R. Martins, T. Dellinger, M.J. Bischoff, S.E. Encalada and B.W. Bowen (1998): Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecol. Appl.* 8(1):1-7
- Bowen, B.W., A.B. Meylan, J.P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs and J.C. Avise (1992): Global population structure and natural history of green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46:865-881.
- Bowen, B.W., W.S. Nelson and J.C. Avise (1993): A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5574-5577.
- Britten, R.J. (1986): Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231:1393-1398.
- Brown, G.G., G. Gadaleta, G. Pepe, C. Saccone and E. Sbisà (1986): Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192:503-511.
- Brown, J.R., A.T. Beckenbach and M.J. Smith (1993): Intra-specific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* 10:326-341.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang and A.C. Wilson (1982): Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.
- Cann, R. L., W. M. Brown, and A. C. Wilson. 1984. Polymorphic Sites and the Mechanism of Evolution in Human Mitochondrial DNA. *Genetics* 106(3): 479-499.

- Cavalli-Sforza, LL, P. Menozzi and A. Piazza (1994): The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, NJ. 1053 pp.
- Díaz-Fernández, R., T. Okayama, T. Uchiyama, E. Carrillo, G. Espinosa, R. Márquez, C. Diez and H. Koike (1999): Genetic sourcing for the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in the Northern Caribbean region. *Chel. Cons. Biol.* 3(2):296-300.
- Doi, A, H. Suzuki and E.T. Matsuura (1999): Genetic analysis of temperature dependent transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Heredity* 82:555-60.
- Encalada, S.E., K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, J.C. Zurita, B. Schroeder, E. Possardt, C.J. Sears and B.W. Bowen (1998): Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar. Biol.* 130:567-575.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto and B.W. Bowen (1996): Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.* 5:473-483.
- Espinosa, G., J. Azanza, A. Ruiz, M. Jager, J. M. Álvarez, and J. Deutsch (2003): AJ543730. *Chelonia mydas* mitochondrial partial D-loop. GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).
- Espinosa, G., J. Azanza, A. Ruiz, M. Jager, J. M. Álvarez, and J. Deutsch (2003): AJ543732. *Chelonia mydas* mitochondrial partial D-loop. GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).
- Espinosa, G., J. Azanza, A. Ruiz, M. Jager, J. M. Alvarez and J. Deutsch (2003): AJ543735. *Chelonia mydas* mitochondrial partial D-loop. GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).
- Formia, A. and M.W. Bruford (2002): Mixed stock analysis of the endangered green turtle (*Chelonia mydas*) fishery in the Gulf of Guinea, Central Africa. In: Formia (Author, Thesis of Doctor of Philosophy), Population and genetic structure of the green turtle (*Chelonia mydas*) in west and Central Africa; implications for management and conservation, School of Biosciences Cardiff University, pp: 177-224.
- Formia, A., B.J. Godley, J.-F. Dontaine and M.W. Bruford (2002a): Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Cons. Gen.* 7:353-369.
- Formia, A., A.C. Broderick, F. Glen, B.J. Godley, G.C. Hays and M.W. Bruford (2007): Genetic composition of the Ascension Island green turtle rookery based on mitochondrial DNA: implications for sampling and diversity. *Endang. Species Res.* 3:145-158.
- Goldstein, D.B. and C. Schlotterer (1999): Microsatellites Evolution and Applications. Oxford University Press.
- Graur, D. and W.H. Li (2000): Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 481pp.
- Harrison, R.G. (1989): Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4(1):6-11.
- Karl, S.A., B.W. Bowen and J.C. Avise (1992): Global population structure and male mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analysis of anonymous nuclear DNA regions. *Genetics* 131:163-173.
- Kumazawa, Y. and M. Nishida (1999): Complete Mitochondrial DNA Sequences of the Green Turtle and Blue-Tailed Mole Skink: Statistical Evidence for Archosaurian Affinity of Turtles. *Mol. Biol. Evol.* 16(6):784-792.
- Lahanas, P.N., M.M. Miyamoto, K.A. Bjorndal and A.B. Bolten (1994): Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica* 94:57-66.
- Laurent, L., P. Casale, M.N. Bradai, B.J. Godley, G. Gerosa, A.C. Broderick, W. Schroth, B. Schierwater, A.M. Levy, D. Freggi, E.M. Abd El-Mawala, D.A. Hadoud, H.E. Gomati, M. Domingo, M. Hadjichristophorou, L. Kornaraky, F. Demirayak and CH. Gautier (1998): Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol. Ecol.* 7:1529-1542.

- Martin, A.P. and S.R. Palumbi (1993): Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4087-91
- Moritz C., T. Dowling and W.M. Brown (1987): Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Moritz, C. and W.M. Brown (1987): Tandem duplications in animals mitochondrial DNAs: Variation in incidence and gene contents among lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 34:7183-7187.
- Moritz, C., D. Broderick, K. Dethmers, N. FitzSimmons and C. Limpus (2002): Population genetics of Southeast Asian and Western Pacific green turtles, *Chelonia mydas*. Final Report to UNEP/CMS. 42 pp.
- Morrison, A., A.L. Johnson, L.H. Johnson and A. Sugino (1993): Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12:1467-1473.
- Naro-Maciel, E., J.H. Beker, E.H.S.M. Lima, M.A. Marcovaldi and R. DeSalle (2007): Testing dispersal hypotheses in foraging Green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J. Hered.* 98(1):29-39.
- Okayama, T., R. Díaz., Y. Baba, M. Halim, O. Abe, N. Azeno and H. Koike (1999): Genetic diversity of the hawksbill turtle in the Indo/Pacific and Caribbean regions. *Chelonian Conservation and Biology* 3(2):362-367.
- Razin, A. and D. Riggs (1980): DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604-610.
- Rice, W.M. (1989): Analyzing tables of statistical test. *Evolution* 43: 223-225.
- Roff, D.A. and P. Bentzen (1989): The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X^2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.* 6:539-545.
- Rohlf, F.J. (1973): Algorithm 76. Hierarchical clustering using the minimum spanning tree. *The Comp. J.* 16:93-95.
- Ruiz, A., M. Vega, F.B. Riverón, F.A. Abreu, J. Solano, T. Pérez, E. Pérez, J. Azanza, R. Frías, R. Díaz, M.E. Ibarra y G. Espinosa (2008): Estructura genética de poblaciones de *Caretta caretta* en el Gran Caribe y la costa atlántica occidental empleando un marcador de mtDNA, con énfasis en colonias de anidación del suroeste cubano. *Rev. Invest. Mar.* 29(2):151-160.
- Saccone, C., M. Attimonelli and E. Sbisá (1987): Structural element highly preserved during the evolution of the d-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 26:205-211.
- Sang, T.-K., H.-Y. Chang, C.-T. Chen and C.-F. Hui (1994): Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.* 11:250-260.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf (1981): Biometry, 2nd Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco. [CA] 453 pp.
- Strand, M., T.A. Prolla, R.M. Liskay and T.D. Petes (1993): Destabilization of traces of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365:274-276.
- Tamura, K. and M. Nei (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 11:261-277.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
- Topal, M.D. and J.R. Fresco (1976): Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* 263:285-289.
- Wallace, B. (1991) Coadaptation revisited. *Journal of Heredity* 82:82-95
- Wallis, G.P. (1999): Do animal mitochondrial genomes recombine?. *Trends Ecol. y Evol.* 14(6):209-210.
- Zaykin, D.V. and A.I. Pudovkin (1993): Two programs to estimate significance of X^2 values using pseudo-probability tests. *J. Hered.* 84, 152 pp.

Acceptado: 2 de agosto de 2008