

Tesis de Posgrado

Recombinaciones excepcionales en el macho y supervivencia de cigotas aneuploides : Efectos de ambas sobre la estabilidad de la herencia holándrica producida por una traslocación y su uso en el mapeo genético del punto de ruptura de la misma en *Ceratitis capitata* Wied (Diptera Tephritidae)

Cladera, Jorge Luis

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cladera, Jorge Luis. (1990). Recombinaciones excepcionales en el macho y supervivencia de cigotas aneuploides : Efectos de ambas sobre la estabilidad de la herencia holándrica producida por una traslocación y su uso en el mapeo genético del punto de ruptura de la misma en *Ceratitis capitata* Wied (Diptera Tephritidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Universidad de Buenos Aires.

Cladera, Jorge Luis. "Recombinaciones excepcionales en el macho y supervivencia de cigotas aneuploides : Efectos de ambas sobre la estabilidad de la herencia holándrica producida por una traslocación y su uso en el mapeo genético del punto de ruptura de la misma en *Ceratitis capitata* Wied (Diptera Tephritidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2351_Cladera.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

RECOMBINACIONES EXCEPCIONALES EN EL MACHO Y SUPERVIVENCIA DE CIGOTAS ANEUPLOIDES.

EFFECTOS DE AMBAS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA HERENCIA
HOLANDRICA PRODUCIDA POR UNA TRASLOCACION Y SU USO
EN EL MAPEO GENETICO DEL PUNTO DE RUPTURA DE LA MISMA
EN *Ceratitis capitata* Wied. (*Diptera Tephritidae*)

AUTOR: Lic. JORGE L. CLADERA

DIRECTOR: Ing. Agr. EWALD A. FAVRET

Trabajo presentado para optar al grado academico de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Realizado en el Instituto de Genetica, CICA, INTA CASTELAR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1990

- 2351 -
ef 2

INDICE GENERAL

Indice de Tablas.....	2
Indice de Figuras.....	3
Resumen.....	4
Introducción	
Perspectiva general.....	6
Mecanismo molecular de la recombinación.....	7
Análisis genético de la recombinación	8
Dinámica poblacional y significado evolutivo.....	10
Supresión de la recombinación en un sexo.....	13
Objetivos del trabajo.....	16
Materiales y métodos.....	21
Resultados	
I. Establecimiento del primer grupo de ligamiento.....	28
II. Individuos abortivos portadores de marcadores genéticos....	32
III. Ubicación de marcadores respecto de la traslocación.....	40
IV. Casos fidedignos de recombinación masculina.....	47
V. Primeros experimentos e hipótesis de trabajo.....	53
VI. Estudio pormenorizado y estimación de la frecuencia.....	56
VII. Ubicación del punto de ruptura en el mapa genético.....	62
Discusión	
Baja frecuencia de recombinación masculina.....	66
Viabilidad avanzada de trisómicos parciales.....	67
Mapeo del punto de ruptura de la traslocación.....	69
Recombinación masculina en presencia de una traslocación.....	69
Estabilidad del ligamiento ng-sexo en la traslocación T5038....	70
Evaluación final de los resultados y sus implicancias.....	74
Agradecimientos.....	80
Bibliografía.....	81

INDICE DE TABLAS

MM.1	-Listado de marcadores.....	24
MM.2	-Listado de cepas puras.....	25
MM.3	-Listado de cepas con herencia holàndrica.....	25
I.1	-Segregaciòn del cruzamiento $Ks^a \times Ks^b$	30
I.2	-Retrocruza $ng Ks^a/ng^+ Ks^b \times ng Ks^b/ng Ks^b$	30
II.1	-Pupas producidas por la cepa TY+/ng 5038.....	35
II.2	-Viabilidad por estadios en la cepa TY+/ng 5038.....	35
II.3	-Comportamiento de los marcadores tipoP y tipoD.....	36
III.1	-Machos farados en cepas TY+/lp y Y+/dd.....	42
IV.1	-Cruzamientos de los individuos excepcionales.....	49
IV.2	-Cruzamiento de machos TYdd/dd por varias cepas.....	49
IV.3	-Adultos emergidos de la cepa TY++/lp dd.....	50
IV.4	-Prueba de pro genie para supuestos recombinantes.....	50
V.1	-Retrocruza de la hembra F ₁ por macho RG237.....	55
V.2	-Retrocruza del macho F ₁ por hembra RG237.....	55
VI.1	-Resumen de los casos de recombinaciòn masculina.....	58
VI.2	-Planilla general de resultados.....	58
VI.3	-Comparaciòn entre cruzamientos directos y recìprocos.....	59
VI.4	-Prueba de homogeneidad dentro de grupos.....	59
VI.5	-Comparaciòn entre "un caso previo" y testigos.....	60
VI.6	-Comparaciòn entre RG244 y el resto.....	60
VII.1	-Segregaciòn de lp, dd y sw en la hembra.....	64
VII.2	-Prueba de tres puntos.....	64
VII.3	-Recombinaciòn masculina en la cepa traslocada.....	65
D.1	-Recombinaciòn masculina registrada en la literatura.....	71

INDICE DE FIGURAS

MM.1	-Obtención de una traslocación Y-autosoma.....	26
MM.2	-Mantenimiento de la cepa T5038.....	27
I. 1	-Patrones de la esterasa pupal.....	31
II.1	-Macho farado niger, en presencia de la T5038.....	37
II.2	-Segregación cromosómica en el macho traslocado.....	38
II.3	-Gráfico de viabilidad en TY+/ng 5038.....	39
III.1,A	-Abdomen + y dd en vista dorsal.....	43
III.1,B	-Macho farado en la cepa TY+/dd.....	43
III.2	-Macho farado en la cepa TY+/sw.....	44
III.3	-Letalidad acumulada en diversas cepas.....	45
III.4	-Letalidad acumulada bajo distintas condiciones.....	46
IV.1,A	-Probable origen de individuos excepcionales.....	51
IV.1,B	-Cruzamiento por el macho excepcional.....	52
VI.I	-Representación gráfica de los resultados.....	61
D.1	-Representación gráfica de todos los casos conocidos.....	72
D.2	-Comparación del mapeo de tres traslocaciones.....	73

RESUMEN

El problema de la supresión de la recombinación genética en el sexo heterogamético fue investigado en la mosca del Mediterráneo Ceratitis capitata, una importante plaga de los frutales. En esta especie unas pocas mutaciones morfológicas con casi nulos datos de ligamiento entre ellas habían sido reportados en el momento de comenzar esta investigación. En el transcurso de la misma se logró, en primer término aumentar el surtido de marcadores genéticos disponibles incorporando las variantes para movilidad electroforética o alozimas. Se identificaron dos alelos de la Esterasa pupal (**Es**) y se establecieron cepas puras para cada uno de ellos. Con dichas cepas se consiguió establecer que el gen para la esterasa pupal se encuentra en el mismo grupo de ligamiento que un gen denominado **niger** (**ng**) causante de una extrema melanización cuticular en la pupa y en el adulto. Con estos materiales se aportó la primera prueba genética de que la recombinación en el macho de esta especie no tenía lugar, al menos con frecuencia comparable a la de la hembra. Esta parte del trabajo se completó con la incorporación de otro gen llamado **long pupa** (**lp**) que se manifiesta fenotípicamente por un sensible alargamiento y cambio de forma de la pupa, y que fue mapeado aproximadamente a 15 unidades de **ng**, estando ambos genes a su vez alejados de **Es**.

Utilizando una cepa con una traslocación cromosómica entre el cromosoma Y y el autosoma portador del grupo de ligamiento **lp-ng-Es**, bautizada **T5038**, se hicieron observaciones preliminares que indicaron una gran estabilidad en cuanto al ligamiento del marcador **ng** con el sexo. Una observación más atenta de la misma puso de manifiesto que ciertas cigotas portadoras de duplicaciones parciales que son producidas regularmente en la progenie de la cepa **T5038** son capaces, bajo ciertas circunstancias, de avanzar hasta un estadio final del desarrollo pupal. El estudio minucioso de estos individuos abortivos permitió concluir que la totalidad de los marcadores probados deben ubicarse en la porción no traslocada del autosoma mencionado más arriba.

Al considerar los fenómenos que serían responsables de inestabilidad en la cepa traslocada, fue posible distinguir entre la supervivencia tardía de cigotas aneuploides y raros eventos de recombinación en machos. Para abordar de lleno el estudio de este último fenómeno se decidió usar el par de marcadores **lp** y **dd**,

este último (**dark dorsal abdomen**) manifestado por un oscurecimiento de la cutícula del adulto. Dichos marcadores fueron elegidos por estar muy separados en el mapa genético, por ser de fácil observación sin lupa, y por permitir de ese modo recuentos mucho mayores que los obtenidos usando corridas electroforéticas. Con ellos, y luego de revisar 49697 moscas, fue posible demostrar 55 casos genuinos de recombinación en el macho, cada uno de ellos comprobados por prueba de progenie. El análisis de estos datos ha revelado: 1) que este fenómeno se presenta en nuestro sistema con tasas un orden de magnitud menores que las informadas por la literatura, 2) una notable constancia y repetibilidad del fenómeno, 3) que el fenómeno se presenta tanto en los cruzamientos directos como recíprocos, 4) que no tiene efecto la presencia de un caso previo de recombinación en los padres, y 5) que tal vez exista alguna oscilación entre dos niveles de frecuencias del fenómeno, un máximo de 0,13 %, y un mínimo de 0,042%, medidos siempre entre los dos marcadores **lp** y **dd**.

En un esfuerzo final se emprendió la búsqueda exhaustiva de recombinación en la cepa traslocada **TY+++ / lp dd sw**, en la cual se incorporó el nuevo marcador **sw** (**slow-mazzard**), caracterizado por ojos de color guinda y tasa de desarrollo más baja que lo normal. En total, luego de revisar 10510 moscas de la cepa traslocada fue posible demostrar 7 casos ciertos de recombinación en la misma. Cinco de ellos permitieron además mapear el lado del cual se encuentra el punto de ruptura de la traslocación respecto del conjunto de marcadores. Se concluyó que el mapa más probable es: **T5038-lp (49) dd (33) sw**, siendo los valores entre paréntesis las distancias de recombinación entre los marcadores en la hembra.

Finalmente estos resultados se evaluaron en su importancia aplicada y teórica. Los mismos se compararon con los obtenidos por otros autores y se discutieron dentro del contexto amplio del problema de la regulación de la recombinación en general, y de su papel en la evolución de las especies, poniendo especial énfasis en el problema de la supresión de la recombinación en uno de los dos sexos. Se concluyó el trabajo discutiendo los mecanismos posibles y el rol adaptativo que estos fenómenos pueden desempeñar en las especies.

INTRODUCCION

"Seria disparatada creencia, que se destruiria por si misma, esperar que lo que jamàs se ha hecho pueda hacerse, a no ser por medios nunca hasta aqui empleados"

Novum organum, Libro I, Afor. 6

Perspectiva general

Bajo el nombre de recombinaciòn gènica se agrupan todos los fenòmenos que dan lugar a un intercambio de material genético entre dos segmentos distintos de ADN. En principio estos fenòmenos pueden ser subdivididos en dos categorias: la "recombinaciòn general" y la recombinaciòn "especifica de lugar", aunque algunos autores distinguen hoy una tercera clase que agrupa a los eventos asi llamados de recombinaciòn "ilegitima".

En la "recombinaciòn general" el intercambio se produce entre dos secuencias homòlogas de ADN, por ejemplo la que ocurre entre los cromosomas homòlogos durante la meiosis de los eucariontes, o la que resulta de los fenòmenos de parasexualidad entre los procariontes. En la recombinaciòn "especifica de lugar", por el contrario, no es necesaria la homologia entre largas secuencias de ADN sino que el intercambio ocurre entre cortas secuencias de nucleòtidos. Recibe ese nombre porque en ella todo el proceso de recombinaciòn (incluido el paso inicial de reconocimiento) està guiado por una enzima que reconoce unas secuencias espacificas de nucleòtidos, y es justamente en estas secuencias donde se produce la recombinaciòn (Grindley y Reed, 1985). Son ejemplos de esta ùltima la que ocurre cuando un virus se integra o se desprende del cromosoma bacteriano, y la que ocurre cuando un elemento trasponible penetra en un genoma. En la recombinaciòn "ilegitima" se producen uniones novedosas de ADN en molèculas recombinantes. Estos eventos ocurren a frecuencias que son òrdenes de magnitud mäs bajas que la recombinaciòn general o la especifica de lugar pero tienen importantes consecuencias biològicas; por ejemplo la duplicaciòn de genes, la uniòn de extremos de ADN doble cadena que forma la base de ciertos tipos de reparaciòn y la integraciòn de ADN foràneo dentro del genoma

eucariòntico (Kucherlapati y Smith, 1988).

Mecanismo molecular de la recombinaciòn

Aùn no ha sido posible desentrañar los detalles bioquímico-moleculares de la recombinaciòn gènica en organismos superiores. Sin embargo los análisis genéticos realizados en virus, bacterias y hongos permitieron aclarar ciertos aspectos de la recombinaciòn general (Alberts *et al*, 1986).

La recombinaciòn general se inicia con una muesca en una hebra de la doble hèlice. Los agentes capaces de producir estas muescas como los rayos X o gama son capaces tambièn de desencadenar procesos de recombinaciòn gènica. Es probable que exista una enzima productora de muescas en distintos lugares durante la meiosis aunque todavìa ella no ha sido identificada. Se conocen en cambio varias proteínas que juegan un papel importante durante la recombinaciòn que ocurre luego de la conjugaciòn bacteriana (Stahl, 1987).

El paso difícil y lento en la recombinaciòn es el establecimiento inicial de un intercambio entre dos hebras simples de las dos doble hèlices homòlogas. Después de este intercambio inicial la regiòn de apareamiento puede ampliarse con rapidez y ademàs el lugar donde las dos hebras se cruzan puede migrar ràpidamente hacia adelante o hacia atràs. En este momento el entrecruzamiento consta de dos hebras entrecruzadas y dos hebras no entrecruzadas. Para volver a tener dos hèlices separadas las dos hebras entrecruzadas se deben cortar. Pero antes del corte debería producirse una isomerizaciòn de las estructuras, la cual provocaría que las dos hebras originalmente no entrecruzadas, pasen a ser las entrecruzadas y viceversa, (Modelo de Meselson y Radding, 1975). Si el corte ocurriera antes de dicha isomerizaciòn las dos hèlices se separarían casi inalteradas, es decir, habiendo intercambiado un corto fragmento de ADN monohebra. Este proceso sería el que da origen al conocido fenómeno de la "conversiòn gènica", sobre el que volveremos luego. En cambio, si el corte ocurre luego de la isomerizaciòn, entonces el resultado será que las dos hèlices se habrán entrecruzado y la recombinaciòn se habra consumado. Esta isomerizaciòn podría ser espontànea o podría estar regulada de alguna forma por la cèlula. Parecería lo màs lògico pensar que si existe regulaciòn durante la meiosis èsta ocurra en el momento en que las dos doble hèlices se aparean

formando el "complejo sinaptonémico". Esta estructura, si bien una gran cantidad de observaciones citológicas han revelado que es dinámica y heterogénea y que sufre cambios a lo largo del paquitene sobre cuya función se sabe poco, no obstante se piensa que no es probable que ella participe por sí misma del proceso activo de la recombinación. En cambio, se están acumulando pruebas de que dicho proceso se localiza en los así llamados "nódulos de recombinación", estructuras de unos 90 nm que contienen proteínas y son visualizadas por el microscopio electrónico distribuidas a lo largo del componente central del complejo sinaptonémico (von Wettstein *et al.* 1984, Dresser, 1987).

Una de las varias líneas de evidencia a que nos referimos muestra que algunas mutaciones de Drosophila melanogaster causantes de una disminución en la frecuencia de recombinación así como una distribución alterada de los sucesos de entrecruzamiento, va acompañada de una reducción en el número de nódulos de recombinación y una alteración de su distribución que son paralelas a las primeras (nos referimos a mei-218, Carpenter, 1979). Esto nos trae al tema de las mutaciones en D. melanogaster.

Análisis genético de la recombinación

Desde hace por lo menos quince años Adelaide Carpenter viene estudiando una colección de mutantes que afectan la recombinación observada durante la meiosis en la hembra de esta mosca (Baker y Carpenter, 1972). Se conocen unos 15 loci requeridos para obtener una frecuencia y una ubicación normales de los sitios de intercambio.

Al llegar a este punto de la presentación es oportuno repasar, ahora desde el punto de vista genético, el fenómeno de la "conversión génica" que fuera detectado primeramente en hongos gracias al análisis de tetradas. Este fenómeno que podría ser descrito mejor como una recombinación intragénica no recíproca, es el que se presenta cuando una baja frecuencia de tetradas (~1%) a partir de un núcleo Aa no segrega 2A:2a como se espera sino por ejemplo 3A:1a, o bien 3a:1A. Pareciera como si una cromátide hubiera adquirido el genotipo del cromosoma homólogo. Una gran cantidad de observaciones genéticas acumuladas en hongos permiten considerar la recombinación y la conversión como dos caras de una misma moneda (o sea recombinación recíproca y no recíproca), aunque el punto de vista actual tiende a separarlos (Hasting, 1987 a y b; Carpenter 1987).

A pesar de que exclusivamente entre los hongos el estudio del fenómeno de la conversión génica cuenta con la valiosa herramienta del análisis de ascas, también es posible estudiar dicho fenómeno en organismos donde los productos de la meiosis no permanecen juntos, siempre que se cuente con suficientes marcadores genéticos (Finnerty 1976). El estudio minucioso de la conversión génica en el locus *rosy* en *Drosophila melanogaster* y del efecto operado sobre ella por la presencia de los mutantes meióticos (Carpenter 1982, 1984) aparece hoy como la más fructífera aproximación al estudio del problema de la recombinación general en insectos. Existen incluso ejemplos donde el estudio de la conversión en el locus *rosy* ha alcanzado ya la sofisticación de utilizar sitios de restricción en el ADN como marcadores genéticos (Clark et al 1988).

En definitiva el panorama que surge en la actualidad parece indicar no solo que el paso de la isomerización que decide si un entrecruzamiento se resuelve en conversión o en recombinación no ocurre al azar (más bien se encuentra regulado presumiblemente por medio de una enzima que actúa durante la meiosis), sino también que ambos procesos estarían separados en el tiempo y cada uno cumpliría funciones propias. Según Carpenter (1987) la conversión génica sería la impronta dejada por un fenómeno de intercambio que ocurre en paquitene inicial y cuya función es garantizar el apareamiento estrictamente homólogo. Por su parte la recombinación que desde luego cumple los conocidos roles de mezclar los genes y asegurar la disyunción de los cromosomas homólogos por medio de los quiasmas, recién ocurriría en paquitene tardío (Carpenter 1987). (Es interesante confrontar con estas ideas las observaciones a nivel ultraestructural de cambios en los apareamientos durante el paquitene, por ejemplo las realizadas en *B.mori* 3n y 4n por von Wettstein et al 1984, Fig. 7 y 8).

Ahora bien, la información obtenida a partir de los mutantes para recombinación, provee sólo un cuadro parcial acerca del control genético de la recombinación el cual debe ser complementado con estudios de la variación natural existente y del rol adaptativo que ella cumple en las poblaciones. Después de todo "Nothing in Biology makes sense except on the light of evolution" como reza el aforismo de Dobzhansky (Ayala, 1977).

Dinàmica poblacional y significado evolutivo

Podemos comenzar con algunas consideraciones puramente teòricas. Ante todo se deben distinguir dos situaciones: "ambiente constante" y "ambiente variable" (cf. Hedrick, 1983). Si el ambiente es variable a lo largo del tiempo, la conclusión se alcanza en forma intuitiva: Un ambiente variable significa que la selección puede variar en magnitud y en dirección; en este caso resulta más ventajoso disponer de una mayor variedad de genotipos en la población, los cuales deberían presentarse con ligamiento escaso para otorgar a la especie mayor plasticidad.

El caso en que el ambiente, o la selección, es constante es más simple de modelar y ha recibido un tratamiento más riguroso. Ya por 1930, Fisher fue el primero en señalar que si dos genes interaccionan en sus efectos sobre un carácter adaptativo, la selección natural favorecerá el aumento del ligamiento genético entre ellos dos (cf. Fisher, 1958, p. 117 y p. 133). A menudo se ha postulado que éste sería el mecanismo genético por el que se originarían los así llamados "supergenes"; por ejemplo en Papilio memnon, una mariposa mimética, se han identificado 6 loci que controlan los diversos elementos del patrón mimético, todos ellos dentro de una longitud del mapa menor que 0,006 (Clarke y Sheppard, 1971, 1977).

Fue Kimura (1956) quien inició el camino del tratamiento matemático del tema. Feldman y sus colaboradores proponiendo modelos más detallados como el de un gen R que afecta la recombinación entre dos genes A y B sometidos a selección, sólo consiguieron refinar más la conclusión básica: toda mutación nueva en el gen R que afecta la recombinación aumentará de frecuencia en la población si y sólo si disminuye la recombinación entre A y B (Feldman et al. 1980). El problema es que, siguiendo por este camino, se llega a una conclusión paradójica: el genoma debería terminar por "congelarse" (Turner, 1967) en un solo y gigantesco cromosoma. Dado que esto no es lo que se observa, las explicaciones de porqué ello no ocurre se han multiplicado a lo largo de los años (Maynard Smith, 1977). Por ejemplo el autor ruso Kondrashov ha publicado en los últimos años una serie de trabajos teóricos en los que trata de explicar las ventajas de la reproducción sexual utilizando un modelo de "selección umbral" o "selección truncante o truncadora" (Crow y Kimura, 1979) actuando en contra de las mutaciones deletéreas. De esta serie de trabajos es pertinente citar aquí solo uno

(Kondrashov, 1984) donde dicho autor aplica su modelo a explicar las ventajas de la existencia de la recombinación. Sin embargo, la clásica explicación de la recombinación como origen causal de la bisexualidad ha sido desacreditada recientemente por un trabajo que muestra que la segregación genética basta por sí misma para explicar la prevalencia de la reproducción sexual (Kilpatrick y Jenkins, 1989), sin necesidad de apelar para ello a la recombinación.

En cierta forma emparentado con las mutaciones deletéreas está el tema del "daño genético", aunque este último encierra un concepto algo diferente. En una mutación se reemplaza una o más bases normales por otras bases normales y, aunque el contenido informativo del ADN cambie, la nueva secuencia es perfectamente heredable. En cambio, frente a un daño genético (rotura en el ADN, depurinación, depirimidinación, formación de dímeros de timina, aparición de bases modificadas), se produce una inmediata detención de la replicación. Probablemente debido a ello los organismos poseen refinados sistemas para reparar daños en el ADN: existen enzimas de reparación que actúan escindiendo la zona anómala la cual es luego corregida usando la otra hebra de la doble hélice como templado. Pero con este mecanismo de reparación, sólo pueden ser reparados los daños ocurridos en una cadena. Sin embargo, en el ADN también ocurren, aunque con menor frecuencia, daños que afectan a ambas cadenas (roturas de doble hebra, entrecruzamientos). Según se ha postulado recientemente este tipo de daño sólo podría ser "reparado" por la recombinación genética (¿ilegitima?) (Bernstein *et al.*, 1985).

Un enfoque experimental seguido por muchos autores consiste en usar recuentos de número de quiasmas en lugar de mediciones directas entre marcadores genéticos para estimar frecuencias de recombinación. Esta línea ha sido seguida por trabajos realizados en *Schistocerca* y ratones (Shaw, 1972; De Boer y Hoeven, 1977, ambos mencionados por Turner, 1979) y una larga lista de organismos. En algunos casos los resultados han sido bastante debatidos (cf. Burt y Bell, 1987, y sus réplicas). De cualquier manera en la base de este tipo de aproximación subyace latente la pregunta sobre la validez universal de la relación unívoca entre quiasmas observados citológicamente y eventos de recombinación genética manifestados por segregación de caracteres, pregunta sobre la que volveremos más adelante en el contexto de la supresión de

la recombinación en un sexo.

El enfoque experimental directo del asunto ha sido abordado en algunos organismos sometiendo poblaciones de laboratorio a selección para mayor o menor tasas de recombinación entre dos marcadores genéticos dados. Uno de los primeros de estos experimentos fue reportado en el gusano de seda por Hasimoto (1957), pero permaneció ignorado en occidente por más de 20 años (redescubierto por Turner, 1979). En este insecto la respuesta a la selección resultó ser muy grande y los cruzamientos entre las líneas con alta y baja tasa de recombinación han permitido hoy día detectar dos clases de modificadores de recombinación: unos generales, que afectan la frecuencia de recombinación global del genoma, y otros locales que presentan efectos específicos de cromosoma (Ebinuma, 1987). Un experimento similar ha sido reportado en el tenebriónido Tribolium castaneum (Deweese, 1975) donde se obtuvo mayor respuesta para aumento que para disminución de la recombinación, lo que fue explicado por el autor como dominancia direccional: aumento sería recesivo y disminución dominante.

En Drosophila melanogaster hay experimentos de selección direccional para tasa de recombinación que se remontan al año 1920 pero no vamos a revisarlos aquí. Sólo mencionaremos un lindo ejemplo realizado por Kidwell (1972) quien obtuvo nuevamente mayor éxito en las líneas seleccionadas para aumento que para disminución. Una revisión breve pero reciente puede encontrarse en el trabajo de Charlesworth (1985), de donde surge que no puede extraerse un patrón claro de respuesta a selección en esta especie excepto que, al menos en varios ejemplos, la variación natural para tasa de recombinación se debe con mayor frecuencia a alelos recesivos para "tasa-más-alta", mientras que los alelos mutantes obtenidos artificialmente (a los que hicimos referencia en una sección anterior), se comportan como recesivos para "tasa-reducida". Pero debe tenerse cuidado con generalizar esta observación pues también hay ejemplos en contrario (Charlesworth 1985).

Supresión de la recombinación en un sexo

Desde que Morgan observó en 1912 que los genes ligados no recombinan en el macho de Drosophila melanogaster, y Sturtevant tres años más tarde reportó que otro tanto ocurre en la hembra del gusano de seda Bombyx mori, empezó a madurar la idea conocida luego como "Regla de Haldane", o mejor debiéramos decir "Regla de Huxley" (cf. Dunn y Bennett, 1967), la cual establece que "toda vez que el entrecruzamiento está marcadamente reducido o ausente de uno de los dos sexos ese sexo es el heterogamético". Tal el caso del sexo masculino (XY) en dípteros y del sexo femenino (ZW) en lepidópteros.

Por el año 1930 varios laboratorios establecieron independientemente que existe una correspondencia en términos generales entre el entrecruzamiento a nivel genético y a nivel citológico (Darlington, 1930; Stern, 1931; Creighton y Mc Clintock, 1931). Pero las observaciones de la citología convencional en conexión con el problema de la supresión de la recombinación en el macho de Drosophila han sido un tanto desconcertantes. En principio se observaron llamativas diferencias entre los cromosomas meióticos del macho de esta especie, y los observados en la meiosis de los ortópteros, diferencias que fueron interpretadas como las bases citológicas para la ausencia de entrecruzamiento (Huettner, 1930). Sin embargo, Cooper (1949) informa sin lugar a dudas que en la meiosis del macho de Drosophila se producen regularmente quiasmas. A pesar de ello y no obstante la intensa manipulación genética a que fue sometida esta especie en el interin, jamás se reportó un solo caso de recombinación génica espontánea verificada en el macho (hasta que Hiraizumi halló el primero en 1972 en conexión con un fenómeno en el cual no se verifica una recombinación de tipo general y sobre el cual abundaremos luego)

Por medio del microscopio electrónico ha podido establecerse que en el macho de D. melanogaster no se forma en absoluto un complejo sinaptonémico como el de la hembra (Meyer 1960). Sin embargo esta estructura sí ocurre en la hembra de B. mori tanto como en el macho de la misma especie (Miya et al 1970) aunque se ha reportado que la hembra carece de los nódulos de recombinación ubicados en el componente central de la estructura mientras que el macho sí los presenta (ver revisión en Von Wettstein et al 1984).

Antes de entrar de lleno en el tema de la supresión de la recombinación en un sexo vamos a considerar un caso trivial de no

recombinación en un sexo, pero que trae asociado otro no tanto. Se trata de la haplodiploidia en himenópteros, organismos en los cuales los machos son haploides y, obviamente, no hay en ellos posibilidad de recombinación de caracteres. Hamilton (1964) ya ha demostrado elegantemente que este sistema aumenta el grado de parentesco entre las hembras hermanas y constituye el fundamento genético de la evolución de la conducta social altruista en hormigas, abejas y avispa. Curiosamente, se ha descubierto hace poco en las termitas, insectos sociales que no presentan haplodiploidia, que es muy frecuente encontrar especies con complejas traslocaciones involucrando al cromosoma Y del macho y a numerosos autosomas. En la meiosis de estos machos heterocigotas para las traslocaciones se forman anillos, pero gracias a la prevalencia de "disyunción alternada" (Strickberger 1968) no se producen gametas desbalanceadas; el resultado es que todos los cromosomas involucrados en las traslocaciones quedan ligados al Y, y todos sus homólogos no traslocados van a la gameta X. Lacy (1980) ha señalado que bajo este sistema aumenta el grado de parentesco entre hermanos del mismo sexo, abriendo así un camino que conduce nuevamente hacia la evolución de la conducta social altruista. Si bien algunos aspectos de esta hipótesis han sido criticados (Leinaas 1983), el descubrimiento de un sistema similar de heterocigosis compleja ligada al sexo en una de las pocas especies de arañas sociales que existen, le ha dado nuevo impulso (Rowell 1985). Es interesante el paralelo con monotremas donde los cromosomas sexuales también forman parte de complejas traslocaciones que se encadenan durante la meiosis (Murtagh, 1977) aunque en este caso dicha rareza ha sido interpretada como un estado inicial en la diferenciación de los cromosomas sexuales de los mamíferos (Marshall Graves, 1987).

Si bien es cierto que buscando en la literatura uno puede encontrar ejemplos de aparente violación de la "regla de Haldane-Huxley" como el de Tribolium castaneum, en el que el macho heterogamético presenta tasas de recombinación mayores que la hembra homogamética, debe reconocerse que, al menos en este caso, no se trata de un fenómeno todo/nada sino de diferencias cuantitativas. Por ejemplo, para cierto par de genes en el grupo VII la tasa de recombinación pasa aproximadamente de 40% en la hembra a 50% en el macho (Sokoloff 1964), y para otro par de genes en el grupo V, de 21% en hembras a 33% en machos (Deweese 1967). Hay que reconocer, por fin, que no se registra en la literatura un sólo caso de supresión

total de la recombinación en el sexo homogamético. No obstante ello, también es cierto que la supresión de la recombinación no es tan perfecta en todas las especies del género Drosophila. Se han registrado casos raros de recombinación en el macho de D. virilis (Kikkawa 1935), D. subobscura (Phillips 1944), D. willistoni (Franca et al 1968), D. simulans (Woodruff y Bortolozzi 1976), y un informe muy preliminar indica que en D. littoralis la recombinación en el macho sería alta (Lumme y Lankinez 1981).

Dejamos aparte "ex profeso" el caso de D. ananassae porque merece algún detenimiento. Fue uno de los primeros casos registrados de recombinación en el macho (Moriwaki 1937 y Kikkawa 1937, independientemente), pero lo realmente diferente en esta especie es que se trata de la única Drosophila en la que se ha demostrado una frecuencia considerablemente alta (1,3 a 6%) de recombinación en el macho, característica presente en el 95% de los cromosomas traídos de la naturaleza; se ha reportado además considerable variación para tasa de recombinación tanto entre cepas como entre familias. En una serie de estudios realizados antes de la Segunda Guerra Mundial ambos investigadores japoneses fueron capaces de identificar genes responsables de aumentar la tasa de entrecruzamiento en el macho, pero todas estas cepas se perdieron luego (ver revisión sobre la especie en Moriwaki y Tobari 1975); modernamente el tema ha sido retomado por investigadores de la India, Japón y Estados Unidos, infomándose respuestas positivas a selección para frecuencia de recombinación en macho, algunas evidencias de control poligénico, y hasta la presencia de dos factores ubicados en distinto cromosoma, uno aumentando y el otro suprimiendo la recombinación (ibidem, pag. 518). Una revisión más reciente ha sido realizada por Singh (1985); este autor está investigando actualmente ciertos polimorfismos para inversiones cromosómicas y ha mostrado en forma reciente algunos efectos del genotipo de fondo sobre la tasa de entrecruzamiento en la hembra (Singh y Singh 1988). Hinton y sus colaboradores, por su parte, se han concentrado en el estudio de sistemas hipermutables en esta especie (ver Tanda et al 1989 y referencias allí). También en esta especie se ha informado de una correlación entre frecuencia de quiasmas y frecuencia de entrecruzamientos (Matsuda et al 1983).

Respecto de la presencia o no de complejo sinaptonémico en espermatocito primario de D. ananassae hay informes encontrados. Mientras Grell y sus colaboradores (1972) afirman que no lo hay,

Moriwaki y Tsujita (1974) opinan que sí; estos últimos dicen que no se encuentra una estructura tripartita típica pero que en leptotene y zigotene inicial es posible observar un filamento axial, y agregan que los cromosomas homólogos forman sinapsis incompletas con ayuda de un complejo sinaptonémico imperfecto. Finalmente un tercer trabajo, revisando los dos anteriores ha desacreditado a ambos, al primero por sospecha de no haber localizado espermatocitos en paquitene y al segundo por mala calidad de las fotografías publicadas (Hinton y Downs 1975). Por el lado de la hembra parece no haber dudas respecto de la presencia de un complejo sinaptonémico normal (Grell et al 1972).

Aunque desde hacia muchos años era conocido que agentes físicos como rayos X y luz ultravioleta, y agentes químicos como el formaldehído, eran capaces de inducir entrecruzamientos (por ejemplo Paterson y Suche 1934 en el macho de D.melanogaster, y Moriwaki 1935 en la hembra de Bombyx mori, y varios trabajos posteriores), el primer caso reportado de recombinación espontánea en el macho de D.melanogaster despertó un gran interés. Fue informado por Hiraizumi (1971) quien lo encontró con una frecuencia de $4,5 \times 10^{-3}$. Pronto se vio que algo similar ocurre en B. mori aunque con mayor rareza: $3,1 \times 10^{-5}$ (Murakami 1976, Tabla 2). El estudio ha procedido a mucha mayor velocidad en D.melanogaster y hoy, luego de una considerable acumulación de datos experimentales se puede afirmar que la recombinación en el macho de esta especie invariablemente forma parte de un conjunto de síntomas conocido como "síndrome de la disgenesia híbrida" cuyo origen molecular debe buscarse en la movilización de elementos trasponibles dentro del genoma. (Una descripción al día de este fenómeno así como referencias bibliográficas pueden encontrarse en la introducción de cualquier trabajo reciente, por ejemplo Exley y Eggleston 1989).

Objetivos del trabajo

En este trabajo se estudiará una situación en algunos aspectos similar surgida más recientemente en torno al problema de la falta de recombinación del sexo heterogamético de la mosca del Mediterráneo Ceratitis capitata Wied. (Diptera, Tephritidae), una conocida plaga de numerosos frutales en grandes regiones productoras de clima templado y subtropical en todo el mundo.

Uno de los métodos para controlar esta plaga, experimentado con éxito en varios países, se basa en la cría,

esterilización y posterior liberación de cantidades masivas del insecto, siendo el efecto buscado con esta inundación de individuos estériles una reducción del tamaño poblacional de la plaga. Este método vería incrementada su eficiencia si, en vez de liberar individuos de ambos sexos, se consiguiera eliminar las hembras en el criadero y liberar solamente machos estériles. Una de las maneras de conseguir esto es ligar genéticamente, por medio de una translocación, la herencia de cualquier gen letal condicional a la herencia del sexo. Esto es posible gracias a que, en esta especie, la mera presencia de la región proximal al centrómero del cromosoma Y determina la masculinidad, y a que la región distal al centrómero del mismo cromosoma es dispensable (ya que se ha visto que individuos deficientes para dicha región son perfectamente fértiles; ver revisión en Lifschitz y Cladera, 1989). Este sistema de "autosexado genético" sólo es capaz de mantenerse estable a lo largo de las generaciones si durante la meiosis del macho no existe recombinación de caracteres entre el cromosoma traslocado y su homólogo no traslocado.

A pesar de su importancia económica y aplicada, el interés por conocer los detalles de la biología de Ceratitidis capitata sólo se ha incrementado muy recientemente. En particular, sobre la genética de esta especie en el momento de iniciarse nuestra investigación apenas había una media docena de trabajos preliminares publicados.

Respecto de los cromosomas de C. capitata el trabajo pionero fue realizado por el brasileño Luis Mendes quien reportó la fórmula $10+XX$ para las hembras y $10+XY$ para los machos, observó apareamiento somático en mitosis, cromosomas gigantes en glándulas salivales, tubos de Malpighi y pared del intestino, y 6 bivalentes en meiosis (Mendes, 1958); no hay mención en este informe sobre la presencia o no de quiasmas en la meiosis del macho. Sobre este asunto en particular dos citólogos tuvieron opiniones dispares: mientras que uno de ellos afirma taxativamente que estamos en presencia de una espermatogénesis típicamente "quiasmática" sugiriendo que la recombinación debe ocurrir en el macho (Radu et al., 1975), el otro en cambio, dice que la meiosis del macho puede ser "aquiasmática", aunque reconoce la presencia de estructuras que podrían ser interpretadas como entrecruzamientos (Southern, 1976). Una tercera posición parece haber surgido más tarde haciendo referencia a zonas "pseudoquiasmáticas" (González, 1981) pero no

hemos tenido acceso a más detalles. El hecho innegable es que los bivalentes son tan pequeños y están tan condensados que las técnicas citológicas de rutina en estos casos resultan de dificultosa interpretación (ver revisión en Lifschitz y Cladera, 1989).

Desde un principio se había visto en Ceratitidis capitata que las cepas traslocadas mantenían, con algunas excepciones, la estabilidad de la herencia holàndrica (Rossler, 1979, Lifschitz, Manso y González, sin publ.), y este hecho argumentaba en favor de que, de existir recombinación en el macho, ésta debía ser poco frecuente. Se podría pensar que todas las traslocaciones seleccionadas fueran precisamente aquellas que presentaban "buen" ligamiento, por ejemplo por presentar un punto de ruptura muy cercano al marcador. Robinson y Heemert (1982) hicieron un experimento y probaron que éste no era el caso. Si la tasa de recombinación en el macho fuera alta se esperaría inducir por azar raramente traslocaciones causando ligamiento total y más frecuentemente casos intermedios. El resultado de su experimento fue el opuesto: de 148 familias examinadas, seis dieron ligamiento completo y hubo sólo dos (o tres?) casos intermedios (Robinson y van Heemert, 1982). Sin embargo ya en diciembre de 1980 existía información preliminar del Dr. Yoram Rössler (com. pers.) quien opinaba que, mientras en el macho de esta especie normalmente no ocurría la recombinación, en cambio ésta sí se presentaban en las cepas traslocadas causando el desacople entre sexo y marcador.

La respuesta definitiva sólo podía llegar por mediciones directas de recombinación entre marcadores genéticos. Se pensó entonces en atacar este problema midiendo la recombinación masculina entre marcadores genéticos tanto en moscas normales como en individuos portadores de una traslocación Y-autosoma, y observar en estos últimos si se detectaban casos de desacople entre el sexo y el marcador genético.

El pionero en los estudios genéticos de Ceratitidis capitata fue Sandro Cavicchi quien realizó primero un experimento de genética cuantitativa, seleccionando para tasa de desarrollo larvario; este autor reconoce allí que la menor respuesta a selección que él obtuvo en machos podría deberse a que la recombinación no ocurriera en este sexo, (y a que, por esta razón, el macho liberara menos variabilidad que la hembra) pero en realidad este autor prefirió explicar dicha diferencia entre sexos como

"efecto materno" (Cavicchi 1972). Al año siguiente, un experimento de selección disruptiva para color del pupario permitió concluir a este mismo autor que dicho carácter debía estar controlado por muy pocos genes (Cavicchi y Bellettini, 1973). Las primeras mutaciones descritas fueron mutaciones espontáneas; el mismo Cavicchi (1973) describe un gen recesivo autosómico que cambia la forma y oscurece el pedúnculo de la cepa orbital espatulada del macho y ese mismo año aparece publicada la descripción de un gen de ojos blancos (Sharp y Chambers, 1973); ambas mutaciones se han perdido. Aparece entonces Rössler con sus tres mutaciones espontáneas *ap* (apricot), *dc* (double chaetae) y *dp* (dark pupae), (Rössler y Koltin, 1976) y luego una cuarta, *w* (white pupae), aparecida en un material irradiado (Rössler, 1979); todas ellas se comportan como autosómicas recesivas y segregan independientemente excepto *double chaetae* cuya herencia no parece ser simple. Contemporáneamente, en el Laboratorio de Insectos del Instituto de Genética del INTA Castelar, se comenzó a utilizar el metano-sulfonato de etilo (EMS) como agente mutagénico con el cual se obtuvo *ng* (niger), la primera mutación inducida con mutágeno químico en esta especie (Manso y Lifschitz, 1979) la cual se manifiesta por pupas y adultos totalmente melánicos y se comporta como autosómica y recesiva. Al mismo tiempo que en el INTA Castelar se iniciaba la búsqueda sistemática de mutaciones inducidas por metano sulfonato de etilo (EMS) y de aberraciones cromosómicas inducidas por rayos X, el autor de esta tesis se incorporó al grupo iniciando una búsqueda de variantes electroforéticas de enzimas. Sobre este tema la bibliografía no registraba antecedentes en la especie. Así fue como se llegó a identificar el gen *Es* (Esterasa pupal), ubicado en el mismo grupo de ligamiento que *ng* (Cladera 1981a).

Luego de nuestro informe inicial afirmando que la recombinación genética entre el par de genes *Es* y *ng* (dist 50) se verificaba exclusivamente en la hembra de esta especie (Cladera, 1981b; Cladera *et al.*, 1987), otras observaciones hechas sobre el par *dc-ap* (dist. aprox. 20) hablaban de tasas de recombinación en el macho de 0,4 a 1,0 % (Rössler 1982a y b). Si bien estos datos presentaban una gran dispersión (todo esto será comentado en detalle en la sección de Discusión), no obstante presentaban frecuencias mucho mayores que las nuestras, y una de las preguntas que nos hicimos fue si esta diferencia se debía al origen de las cepas usadas.

Las investigaciones que condujeron a los resultados presentados en este trabajo se iniciaron alrededor de 1980 pero fueron inspiradas en diversas observaciones realizadas en los dos años previos. Por aquella época en el Laboratorio de Insectos del Instituto de Genética del INTA Castelar, se indujo la primera traslocación cromosómica ligando la herencia del cromosoma Y a la del marcador *ng*. Dicha traslocación fue inducida por medio de rayos X, seleccionada por su efecto reductor de la fertilidad de huevos y aislada directamente por observaciones citológicas (Lifschitz, Manso y González, observaciones sin publicar). A pesar de que esta cepa se extinguió en junio de 1980, ella permitió adjudicar el grupo de ligamiento *niger* al cromosoma 2 (observaciones sin publicar).

En insectos existen informes en la literatura que hablan de supervivencia más allá del periodo embrionario de cigotas "aneuploides parciales"* por translocación. Se puede encontrar un caso clásico en *Aedes* (Ved Brat y Rai, 1974) pero también hay ejemplos de ello en *Culex* (Sakai et al, 1972), *Glossinia* (Curtis et al 1972), *Hylemya* (Voselman y Heemert, 1980); incluso se ha informado que aneuploides para un brazo completo pueden llegar a empupar en *Drosophila* (Fitz-Earle y Holm, 1983). En *Ceratitidis capitata* se han descrito ocasionalmente fenómenos que podrían obedecer a una explicación semejante (Robinson y Heemert 1982, Robinson 1984) de manera que se decidió en este trabajo prestar atención también a la aparición de individuos abortivos, probables portadores de "aneuploidias parciales", en toda cepa portadora de una traslocación Y-autosoma.

En suma, con esta información previa y estos materiales disponibles se abordó el estudio por medio de marcadores genéticos dirigido a clarificar la verdadera magnitud de la recombinación génica en el macho de *Ceratitidis capitata* así como sobre el efecto que dicho fenómeno puede tener sobre la estabilidad de la herencia holândrica producida por las traslocaciones inducidas entre el cromosoma Y y uno de los autosomas.

* Tanto "aneuploide" como "trisómico" son términos usados para referirse a individuos con alteraciones de cromosomas enteros. En este trabajo los usamos también para hablar de individuos con duplicaciones de una parte del cromosoma.

MATERIALES Y METODOS

Mutaciones y moscas usadas en este trabajo. Los marcadores genéticos se enumeran en la Tabla MM.1. Las moscas utilizadas en este trabajo provinieron en su totalidad de la colección del Laboratorio de Insectos, Instituto de Genética, INTA Castelar (ver Tabla MM.2). El método general que se sigue para la obtención de traslocaciones Y-autosomas, usando un marcador *m* para su selección es el siguiente: los machos emergidos de pupas tratadas con radiación se cruzan con hembras homocigotas para una mutación *m* (Figura MM.1). Los machos hijos de este cruzamiento se retrocruzan luego por la cepa materna y se separan las familias que segregan machos salvajes y hembras *m*. Una vez aislada una traslocación entre el cromosoma Y y un marcador *m* (TY+/*m*), cualquier mutante al estado homocigota ligado a *m* puede ser usada, mediante cruce y retrocruce por el macho, para producir una cepa "macho salvaje - hembra mutante" (Figura MM.2). Siguiendo este procedimiento de retrocruce por la hembra fue como se construyeron a partir de la línea TY+/*ng* 5038 (Manso *et al* 1986) las cepas enumeradas en la Tabla MM.3. Para realizar esta investigación no se dispuso de cepas puras de origen mediterráneo, pero se contó con una cepa marcada con la mutación *w* (**white pupa**) del Dr. Rössler que en su origen había sido cruzada por moscas de Castelar (RG 17). De este cruzamiento ya había sido obtenida una cepa pura *w/w* que se mantenía en nuestro Laboratorio con la identificación RG 244. (El gen *w* se encuentra en otro grupo de ligamiento y no interviene para nada en el estudio, de manera que en el curso de la presente investigación su segregación en los distintos cruzamientos fue ignorada).

Condiciones generales de cría. El medio usado para alimentar las larvas, y el método de recolección de huevos fueron descritos previamente (Teràn 1977). Los huevos fueron recogidos en muestras de aproximadamente 200 y depositados sobre recipientes de alrededor de 30 cm³, llenos con el medio de cultivo de Teràn (1977). Todo el ciclo se completó a la temperatura ambiente en el laboratorio (26-28°C) y con un control aproximado de las condiciones de humedad (60-90%). En estas condiciones la duración del ciclo huevo-adulto es de 17 días. Las condiciones especiales de cría utilizadas en el experimento descrito en la Parte III consistieron en sembrar alrededor de 70 huevos por recipiente de 30 cm³ de alimento, mantener los huevos

en càmera hùmeda por 48-72 h y suplementar el medio de cultivo con unos 5 ml de agua corriente a los 4-6 días de desarrollo. En este caso todo el ciclo se completò en càmera de cria con temperatura regulada a 27°C (\pm 0,5).

Estimaciòn de la viabilidad embrionaria. Al contar huevos no eclosionados se debe discriminar entre los huevos embrionados (y por tanto genuinos abortos embrionarios) y los huevos simplemente no embrionados. Para ello se recurriò a la tècnica descrita por Cladera y Manso (1988). La misma consiste en lo siguiente: los huevos no eclosionados son tratados durante 30^m en hipoclorito de sodio al 4% con lo cual el corion y las membranas externas se hacen transparentes y es posible detectar la presencia de embriones abortivos observando a la lupa con iluminaciòn por transmisiòn. El nùmero de abortos al estado de larva se estimò por la diferencia entre embriones eclosionados y pupas obtenidas. Así fue como se realizaron las mediciones de letalidad a lo largo del desarrollo de la Tabla II.2 y de la Figuras III.3 y III.4.

Separaciòn electroforètica de los alelos de la esterasa pupal. La tècnica fue reportada previamente (Cladera 1981a). Las pupas se toman entre 24 y 48 horas despuès de que las larvas saltan a la cama de arena y se machacan en 0.1 ml de buffer del gel. Un cuadrado de 5 mm de papel Whattman N° 3 MM se embebe en esta suspensiòn y se introduce en una ranura previamente practicada en el gel, el cual se prepara con almidòn Connaught 12.5% en tris 76 mM-ácido citrico 5mM, pH 8.65. Las cubas se llenan con ácido bòrico 300 mM NaOH 60 mM. Se aplica una diferencia de potencial de 100 V entre las esponjas separadas 10 cm de negativo a positivo hasta que el frente alcanza la esponja anòdica (unas 3 horas), a 5° C. Una vez corrido y cortado horizontalmente en dos capas, el gel se preincuba 1/2 hora en ácido bòrico 50 mM. Luego se enjuaga y se incuba en 40 mg 1-naftilacetato disuelto en 1 ml de acetona y agregado sobre 40 mg de Fast Garnet GBC disuelto en 100 ml de buffer fosfato 100 mM pH 6.5. Cuando las bandas revelan satisfactoriamente, el gel se fija en 45 partes de metanol màs 55 partes de ácido acético 20%.

Tratamiento estadístico de los datos. Para la comparaciòn entre proporciones ubicadas demasiado cerca de los extremos se recomienda aplicar primero una transformaciòn matemàtica que normalice su

distribución. En este caso dichas frecuencias se normalizaron mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada (Sokal y Rohlf 1969); pero, además del test de t de los valores transformados, para probar diferencias entre frecuencias de recombinación masculina observadas en dos muestras se utilizaron las tablas de Kastenbaum y Bowman (1970); con las mismas se pudo establecer cuál es el número mínimo de recombinaciones que deben observarse en un grupo dado para considerar que el mismo presenta una frecuencia significativamente mayor de recombinaciones que un segundo grupo a comparar. Para el cálculo del tamaño de cada muestra comparada en los experimentos descritos en la Parte VI se procedió como sigue: Para detectar una dada diferencia entre proporciones, pongamos en nuestro caso entre 0,5% y 0,05%, hay una forma de calcular el tamaño muestral requerido, usando la transformación arcoseno de la raíz cuadrada (Sokal y Rohlf, 1969). Con ese método y en nuestro ejemplo, para una decisión con un nivel de significación del 0,05 y una probabilidad de éxito de 0,90 se debe utilizar un coeficiente igual a 17.249,8. Si dicho coeficiente se divide por el cuadrado de la diferencia de los arcosenos de 0,005 y 0,0005 se obtiene un valor de 2242,6. Se concluye que necesitamos comparar muestras de por lo menos 2243 individuos cada una. Para el cálculo del tamaño muestral requerido para obtener al menos un evento de recombinación en el experimento de la Parte VII se razonó así: suponiendo que la tasa de recombinación sea r , la probabilidad de fallo en n ensayos será $(1-r)^n$. Si deseamos que la dimensión del experimento sea tal que garantice éxito con una probabilidad de fallo $<p$, el tamaño muestral requerido se podría despejar de la ecuación $(1-r)^n < p$. Suponiendo conservadoramente que $r = 1/3 \times 10^{-3}$ y asignando a $p = 0,05$, con estos valores se puede calcular que $n > 9077$ y éste es el número buscado. La esperanza sería en este caso $1/3 \times 10^{-3} \times 9077 = 3,02$, o sea 3 casos como mínimo (cf. Tabla VII.3 donde se obtuvieron 4 casos en una muestra de 8.800 individuos).

Tabla MM. 1

Listado de marcadores utilizados en este trabajo.

<u>Nombre</u>	<u>Fenotipo</u>	<u>Referencias</u>
niger (ng)	pupa, adulto, y espiráculos larvarios negros	(1)
esterasa pupal (Es)	movilidad electroforética en pupa de 24-48 hs.	(2)
long pupa (lp)	pupario elongado	(3)
dark dorsal abdomen (dd)	adulto melánico	(4)
slow-mazzard (sw)	ojos color guinda y desarrollo lento	(5)

Referencias: (1) Manso y Lifschitz 1979; (2) Cladera 1981a; (3) Cladera et al.1987; (4) Lifschitz 1985, Wappner et al., 1987; (5) Cladera, 1990

Tabla MM.2

Listado de cepas puras usadas en este trabajo:

<u>Identificación</u>	<u>Marcadores al estado homocigota</u>
RG17	Ninguno (Cepa salvaje de referencia)
RG21	lp
RG32	ng
RG84	dd
RG110	sw
RG237	lp dd
RG244	w (Rossler 1979a)
RG272	lp dd sw

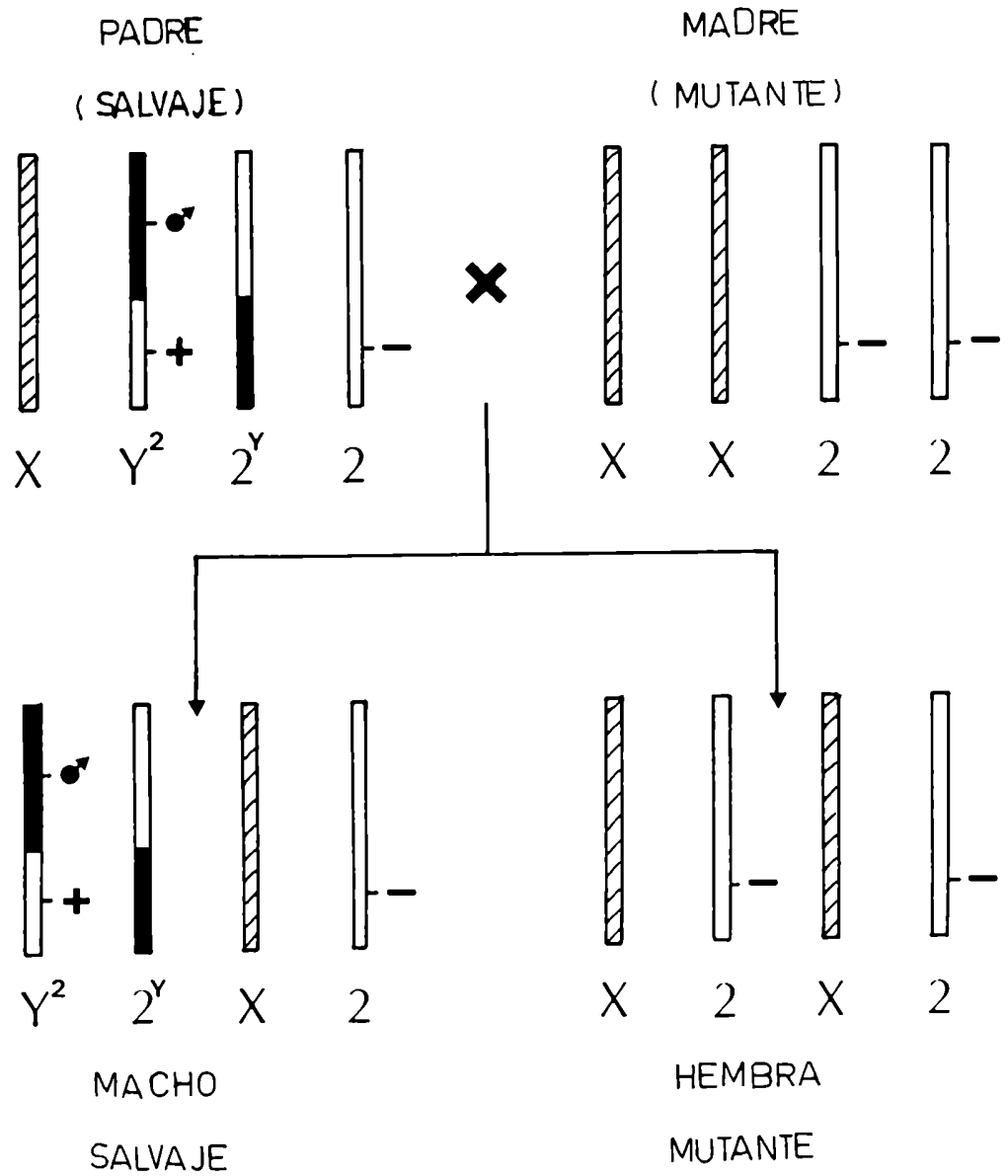
Tabla MM.3

Listado de cepas con herencia holandrica del alelo salvaje construidas para este trabajo a partir de la cepa TY+/ng 5038 (Manso et al., 1986)

<u>Identificación</u>	<u>Fenotipos</u>	
	<u>Macho</u>	<u>Hembra</u>
TY+/ng	+	ng
TY+/lp	+	lp
TY+/dd	+	dd
TY++/lp dd	+	lp dd
TY+++/lp dd sw	+	lp dd sw

Figura MM.2

Mantenimiento de la cepa T5038 con una traslocacion Y-autosoma2 causando la herencia holândrica del alelo salvaje de todo gen ubicado sobre dicho autosoma.



RESULTADOS

"La ciencias han sido tratadas o por los empiricos o por los dogmáticos. Los empiricos, semejantes a las hormigas, sólo saben recoger y gastar; los dogmáticos, semejantes a las arañas, forman telas que sacan de si mismos. La abeja, en cambio, recoge sus materiales en las flores, pero los transforma por una virtud que le es propia. Esta es la imagen del verdadero trabajo en la ciencia"
Novum organum, Libro I, Afor. 95

I. Establecimiento del primer grupo de ligamiento.

En el patrón que presentan las esterasas de la pupa a las 24-48 horas de haber empupado se hallaron dos bandas que podían faltar alternativamente o estar presentes ambas pero nunca faltar las dos (Figura I.1). Se postulò entonces que estas bandas eran dos alelos de un gen simple codominante. Esto fue luego confirmado por los resultados del cruzamiento entre las cepas homocigotas para ambos (Tabla I.1).

El siguiente paso fue establecer la relación de ligamiento entre dicho gen de la **esterasa pupal** (Es^a/Es^b) y el gen **niger** (ng) ya descrito previamente. Para ello se obtuvieron dos cepas: una $Es^a ng^-$ y otra $Es^b ng^+$ al estado homocigota. Se cruzaron entre si y se comprobò que la F_1 daba pupas de color salvaje y patrón doble de esterasas. Al hacer las retrocruzas se comprobò que estos dos genes recombinan casi libremente en la hembra pero no recombinan en el macho (Tabla I.2).

Al poco tiempo se indujo en el laboratorio una nueva mutación recesiva afectando la forma y elongación del pupario, que fue denominada **long pupa** (lp) la cual está ligada al gen **niger** (Cladera et al. 1987). No fue posible en un primer momento obtener una cepa pura doble mutante $ng lp$ que sobreviviera. En consecuencia, para

poder medir la distancia de recombinación en la hembra y confeccionar de esta manera el primer mapa gènico fue necesario apelar a un complicado esquema de dobles retrocruzas. No vamos a describir ese experimento aquí y sólo nos quedaremos con el mapa más probable que resultò ser **lp-15-ng-48-Es** (ver Cladera et al. 1987).

Al llegar a este punto hubo de reconocerse que este conjunto de marcadores no ofrecía un sistema eficiente si se desea aumentar en forma considerable el número de recuentos. Por ejemplo para el experimento recién mencionado que rindiò solamente 121 observaciones fue necesario armar ese mismo número de familias, seguirlo por dos generaciones y analizar por electroforesis un número entre doble y triple que aquel de individuos.

Los siguientes avances dependieron de la identificación de nuevas mutaciones ubicadas en este mismo grupo de ligamiento, pero con la posibilidad de obtener una cepa pura doble recesiva con buena viabilidad y cuya manifestación fenotípica fuera suficientemente conspicua y de rápida observación. El primer marcador con estas características no fue obtenido inmediatamente; mientras tanto, y como resultado de tratamientos con rayos X, en el Instituto de Genética, del INTA Castelar, se indujeron traslocaciones ligando la herencia del sexo a la del grupo de ligamiento **niger**, con las cuales prosiguiò la investigación.

Tabla I.1

Individuos segregantes en el cruzamiento Esterasa a x Esterasa b.

Generación	Fenotipos			X ²
	Es ^a	Es ^a /Es ^b	Es ^b	
P1	17	0	0	
P2	0	0	18	
F1	0	6	0	
F2*	---44---		14 (3:1)	0.04 N.S.
"F2"	13	19	9 (1:2:1)	0.99 N.S.

* Corridas en las que no se distinguieron los patrones a/a de a/b.
 Datos reelaborados a partir de Cladera 1981a.

Tabla I.2

Recuento de segregantes en las retrocruzas de la F1 (ng⁺ Es^b/ng⁻ Es^a) por la cepa pura (ng⁻ Es^a / ng⁻ Es^a).

	Es ^a / Es ^a	Es ^b / Es ^a
Hembras		
Pupas +	13	20
Pupas ng	13	19
Machos		
Pupas +	0	28
Pupas ng	28	0

Datos agrupados de: Cladera 1981b y Cladera *et al.* 1987.

Figura I.1

Patrones detectados en la esterasa pupal: I= E^{sa}/E^{sb} ; II= E^{sa}/E^{sa} ;
III= E^{sb}/E^{sb} .



II. Individuos abortivos portadores de marcadores genéticos.

El estudio prosiguió entonces con una de estas cepas portadoras de una traslocación que fue denominada TY+/ng 5038 (Manso et al. 1986). En ella no se detectan cambios visibles en el largo de los brazos cromosómicos mitóticos ni en el aspecto general de la meiosis (Manso y Lifschitz, com. pers.), lo cual inclina a postular una traslocación igual y recíproca involucrando un fragmento traslocado muy pequeño.

De entre los adultos emergidos durante las 15 primeras generaciones se contaron 6173 machos que emergieron todos de puparios salvajes y 5383 hembras, todas emergidas de puparios ng, sin registrarse excepciones (Manso et al. 1986). Para una muestra de 28 parejas formadas con individuos de la cepa tomados al azar el promedio de eclosión de huevos fue de 68.2(± 1.5) % (Manso et al. 1986).

Desde que fue obtenida la cepa TY+/ng 5038 se observó una notable estabilidad en el ligamiento del cromosoma Y con el alelo + del gen ng. De hecho, esta cepa fue mantenida durante casi cinco años de cultivo rutinario y, habiendo transcurrido 55 generaciones, no se registraron indicios de desacople entre el gen ng y el sexo (Manso et al. 1986).

En ese momento fue cuando se inició un estudio de las propiedades de la cepa TY+/ng 5038, sobre el cual se informa a continuación.

Si se observan los datos previos mencionados más arriba, se notará que las hembras emergidas estaban en menor número que los machos ($X^2=50; p<0.01$). Sin embargo, al contar las pupas se observó un exceso de pupas ng (Tabla II.1); obviamente la diferencia se debe a que hay un número de pupas ng de las cuales no emergen los adultos. Se realizaron las disecciones de 170 de estos puparios y se comprobó (Figura II.1 y Tabla II.1) que la mayor parte de ellos contenían machos ng "farados" (adultos prácticamente a término pero que permanecen dentro del pupario); otra cantidad importante era abortos demasiado tempranos como para poder determinar el sexo (ver Tabla II.1). También se observaron unas pocas hembras ng a medio emerger, y algunos puparios salvajes que permanecían cerrados conteniendo exclusivamente machos a punto de emerger, pero jamás se observó una sola hembra de tipo salvaje.

Esta asimetría entre los individuos farados (128 machos

ng y ninguna hembra tipo salvaje) fue explicada de la siguiente manera: (ver Figura II.2) supongamos que algunas veces, durante la meiosis el autosoma traslocado migra junto con el cromosoma X a una de las gameta y que el autosoma entero migra junto con el cromosoma Y a la otra gameta; el resultado seria una gameta deficiente para un trozo del autosoma en el primer caso, y una gameta con dicha regiòn duplicada y tan solo deficiente para un trozo (dispensable) del cromosoma Y en el segundo.

Postulamos aqui que si bien todas las cigotas aneuploides inician su desarrollo embrionario, las cigotas duplicadas serian capaces de llegar mäs lejos que las deficientes a lo largo del ese desarrollo. Estas cigotas parcialmente duplicadas serian entonces las que se manifiestan como abortos tardios de machos portadores del marcador. Si esto fuera cierto deberia esperarse un gran número de abortos en estadios mäs tempranos.

Con el objeto de poner a prueba esta predicciòn se decidiò realizar observaciones sobre el número de abortos producidos en esta cepa a lo largo de todo el desarrollo, incluyendo los primeros estadios. Al realizar los recuentos segùn la tècnica descrita en Materiales y Mètodos, se observò que sòlo la mitad o menos de las cigotas llegan a adulto; pero debe destacarse ademàs que las cigotas abortivas incluyen no sòlo abortos embrionarios sino tambièn una elevada proporciòn de individuos que eclosionan del huevo y que alcanzan por tanto el estado de larva (Tabla II.2).

Reuniendo la informaciòn de las Tablas II.1 y II.2 en un gràfico se podrà observar claramente el destino predecible para cada cigota producida en la cepa **TY+/ng 5038** (Figura II.3): aproximadamente un cuarto darà machos tipo salvaje, otro cuarto darà hembras **ng** y el resto darà cigotas que abortaràn a lo largo del desarrollo; de entre ellas, las que llegaràn a pupa seran siempre los "machos **ng**".

Ahora bien, si observamos nuevamente la Figura II.2 podremos reparar en que solamente los marcadores ubicados sobre el segmento no traslocado del autosoma (señalados por D-) daràn origen a machos farados marcados, ya que los marcadores ubicados sobre el sector homòlogo del segmento traslocado al cromosoma Y (señalados P-) estaràn cubiertos por el alelo salvaje que se encuentra en el trozo traslocado sobre el cromosoma Y (P+), y para estos marcadores los machos farados deberian ser salvajes. En la Tabla II.3 se ha realizado el recuento completo de dosis y alelos en las cigotas

formadas en cada caso. En la parte de la izquierda están los individuos normales de la cepa y en la de la derecha los individuos que se espera encontrar como abortos. Como se ve, solo es dable esperar machos farados tipo mutante para aquellos marcadores ubicados en la región D.

Cabe entonces preguntarse cuántos de los marcadores conocidos y ligados a **ng** presentarán esta característica viabilidad de los machos marcados y, por lo tanto, estarán ubicados sobre el segmento no traslocado del autosoma. La respuesta a esta pregunta será abordada en la siguiente sección.

Tabla II.1

Individuos que alcanzaron el estado de pupa producidos por la cepa TY+/ng 5038.

	<u>salvaje</u>	<u>niger</u>		<u>Total</u>
Pupas	630	788		
-----	-----	-----		1418
	macho	hembra	macho (?)	
Adultos	630	618	128 42	

.Se han sumado los datos de varias familias observadas a lo largo de tres generaciones. Datos presentados en Cladera, 1989.

Tabla II.2.

Individuos que alcanzaron (pero no sobrepasaron) cada estadio del desarrollo en la cepa TY+/ng 5038. Letalidad acumulada en cada estadio expresada en porcentaje entre paréntesis.

<u>Abortos al estado de:</u>			<u>Adultos</u>	<u>Total</u>
<u>Embrión</u>	<u>Larva</u>	<u>Pupa</u>	<u>obtenidos</u>	<u>cigotas</u>
232	223	58	407	920
(25.2)	(49.4)	(55.8)		

Se han sumado siete muestras. Datos presentados en Cladera 1989.

Tabla II.3

Comportamiento diverso de los marcadores ubicados sobre el segmento autosómico traslocado (tipo P) y de los marcadores ubicados sobre el segmento autosómico no traslocado (tipo D).

Marcador	Cigotas euploides				Cigotas aneuploides					
	macho		hembra		macho fardo		hembra (aborto)			
	Y	(2)	2	2	2	Y	2	2	(2)	2
tipo P	+	0	-	-	-	+	-	-	0	-
tipo D	0	+	-	-	-	0	-	-	+	-

Y: cromosoma Y portador del segmento autosómico traslocado; (2): autosoma deficiente para el segmento traslocado; 2: autosoma estándar.

Figura II.1

Macho farado **niger** obtenido en una cepa portadora de la traslocación T5038. La flecha señala la "ceta espatulada", caracter sexual secundario característico del macho.



Figura II.2

Segregación cromosómica en el macho traslocado dando origen a dos gametas euploides y a dos gametas aneuploides parciales para la región autosómica traslocada, una deficiente y una duplicada.

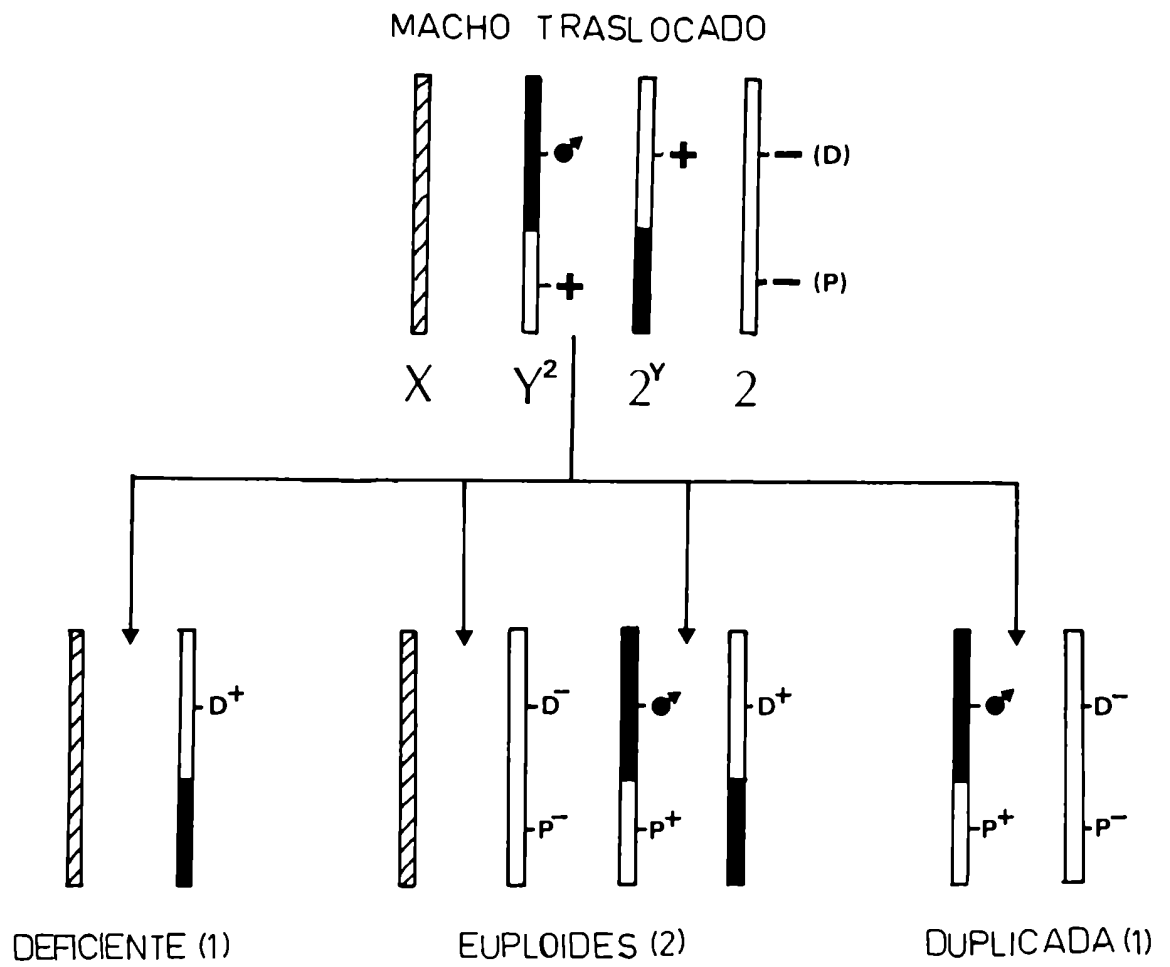
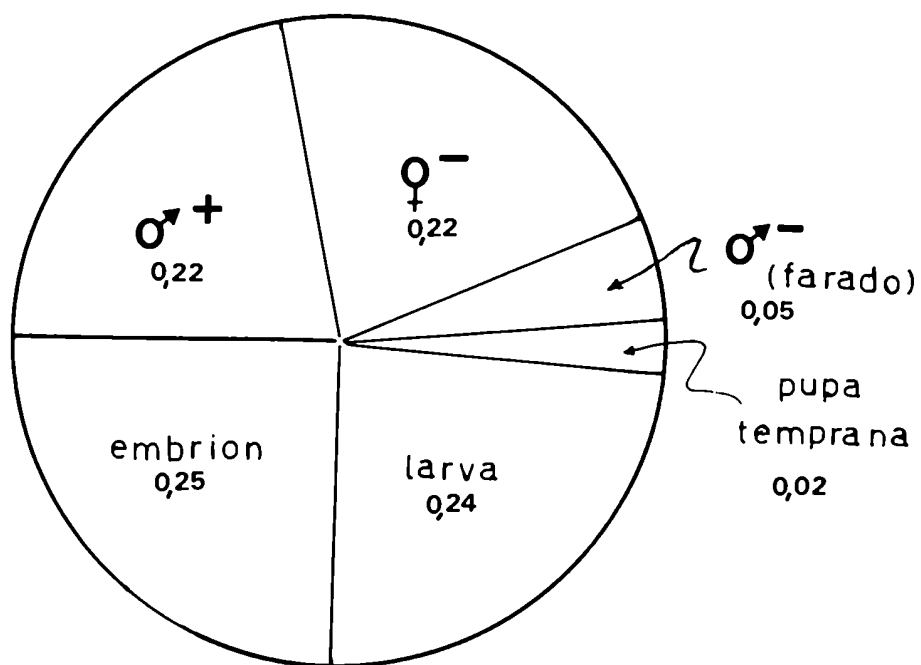


Figura II.3

Representación gráfica de las viabilidades alcanzadas y las proporciones observadas de las distintas clases de cigotas producidas por la cepa TY+/ng 5038. (En base a datos de las Tablas II.1 y II.2).



III. Ubicación de marcadores respecto de la traslocación

Para responder a la pregunta formulada al final de la sección anterior fue necesario construir cepas portadoras de la misma traslocación, pero con otros marcadores ubicados en el mismo grupo de ligamiento. Esto se logra utilizando el esquema de retrocruzas por la cepa materna que fue descrito en Materiales y Métodos (cf. Figuras MM.1 y MM.2) Siguiendo este método se construyeron las cepas **TY+/lp** con el marcador **long pupa** mencionado más arriba, y **TY+/dd** con el marcador **dark dorsal abdomen** (Lifschitz 1985). Este último es un gen recesivo que causa oscurecimiento general de la mosca y aparición de manchas melánicas en varias partes del cuerpo del adulto y particularmente en la región dorsal del abdomen (Figura III.1, A). Tal como se esperaba en estas cepas los machos presentaron el fenotipo salvaje y las hembras el fenotipo mutante (**lp** en un caso y **dd** en el otro). Una observación cuidadosa de estas cepas mostró que en ellas también se podían producir pupas abortivas. La disección de estas pupas abortivas (Tabla III.1) permitió generalizar la regla de que no se obtienen hembras de tipo salvaje; en el caso de **lp** los puparios no emergidos que rindió este experimento fueron demasiado escasos como para extraer conclusiones definitivas. (Sin embargo, la detección de 2 machos **lp** farados es sugestiva). En cambio, parece concluyente la evidencia de que **dd** se comporta como un marcador ubicado sobre el segmento autosómico no traslocado (ver marcador tipo D, Tabla II.3); debe remarcarse que, siendo este último un marcador de cutícula adulta, sólo puede ser observado en imagos "a término" (Figura III.1, B), cosa que no ocurre con **ng** y **lp** por ser ellos marcadores de pupa. Esta es la razón por la que aparecen individuos cuyo sexo fue determinado pero cuya cutícula no llegó a pigmentarse lo suficiente como para discriminar entre el color salvaje y el mutante (Tabla III.1).

Al poco tiempo se aisló en el laboratorio un nuevo marcador ligado a los anteriores, el cual se caracteriza por presentar una tasa de desarrollo más baja que el salvaje y por un tono diferente en el color de ojos. El mismo fue denominado **slow-mazzard** (**sw**) y nuevamente fue usado para construir una cepa pseudoligada, que en este caso es **TY+/sw**. También esta cepa rindió machos salvajes y hembras mutantes (**sw**) y pupas abortivas conteniendo machos farados de fenotipo mutante (Figura III.2).

Con el fin de comparar los efectos sobre la letalidad

temprana de los distintos marcadores se realizaron recuentos de abortos a lo largo del desarrollo con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos y los resultados se muestran en la Figura III.3. Se observa que si bien la presencia de uno u otro marcador puede alterar un poco el patrón de supervivencia de las cigotas abortivas (por ej. mayor letalidad embrionaria con lp, mayor letalidad larvaria con sw, mayor rendimiento de pupas abortivas con dd, siempre en comparación con ng), sin embargo, en términos generales el comportamiento de las distintas cepas es básicamente semejante al presentado previamente por TY +/-ng (Resultados, II Parte).

El último experimento de esta serie fue realizado luego de sintetizar la cepa doble marcada lp dd/lp dd (RG237). Con la cepa RG237 se obtuvo la cepa doble ligada TY ++/lp dd, que presenta machos salvajes y hembras doble marcadas lp dd. Precisamente con esta cepa se hizo el último experimento de esta serie. Se decidió incluir esta vez la cepa homocigota (RG237) como testigo no traslocado. Además de realizarlo en condiciones estandar, se hizo un tratamiento en condiciones "especiales" de humedad (ver Materiales y Métodos) y se probaron dos niveles de densidad de cultivo, el nivel estándar y un nivel de densidad que equivale a 1/3 del estándar.

Los resultados se han graficado en porcentaje de letalidad acumulada en la Figura III.4. En suma se observó lo siguiente: 1) en condiciones estándar la viabilidad a adulto del testigo homocigota fue de un 74% mientras que en la cepa traslocada dicha cifra se redujo aproximadamente a la mitad (37%). 2) Las condiciones "especiales" de cria tienden a favorecer el pasaje de un mayor número de "escapes" como se refleja en la reducción de la letalidad embrionaria y larvaria, y en la acumulación de un mayor porcentaje de abortos al estado de pupa (del 6% pasa al 14-17%). 3) Incluso la baja en la densidad del cultivo parece tener cierto efecto en la misma dirección, aunque menos marcado que las condiciones de humedad.

En resumen podemos generalizar que en presencia de la traslocación T5038 se ha comprobado invariablemente la producción de al menos un 50% de cigotas abortivas de las cuales a su vez la mitad o más superan el periodo embrionario, y al menos un 5% de ellas llegan a imago formado; estos últimos son invariablemente machos mutantes. Se propone aquí que ellos representan casos de "escapes": individuos portadores de una aneuploidia parcial para la región del autosoma involucrada en la traslocación, los cuales bajo ciertas circunstancias favorables llegan a imago. Dichas

"circunstancias" podrian incluir, segùn se ha mostrado aqui, factores ambientales tales como humedad suplementaria o baja densidad de cultivo.

Tabla III.1

Machos marcados encontrados dentro del pupario en cepas portadoras de la traslocaciòn T5038 y de los marcadores genéticos lp y dd.

Fenotipo	<u>salvaje</u>	<u>mutante</u>		<u>(?)</u>			
Sexo:	macho	hembra	macho (?)	macho (?)		Total	
TY +/lp	219	179	2	6	0	0	406
TY+/dd	487	434	74	0	11	53	1059

Datos presentados en Cladera, 1989.

Figura III.1

A. Abdomen en vista dorsal de tipo salvaje (derecha) y de tipo mutante **dark dorsal abdomen** (izquierda).

B. Macho farado **dark dorsal abdomen** obtenido en una cepa con la traslocación T5038. La flecha señala la ceta espatulada del macho.



Figura III.2

Macho farado **slow-mazzard** obtenido en una cepa con la traslocación T5038. Flecha: ceta espatulada.



Figura III.3

Porcentaje de letalidad acumulada en cada estadio del desarrollo en las cepas TY+/ng, TY+/lp, TY+/sw y TY+/dd, todas portadoras de la traslocación T5038. Tamaños muestrales entre paréntesis.

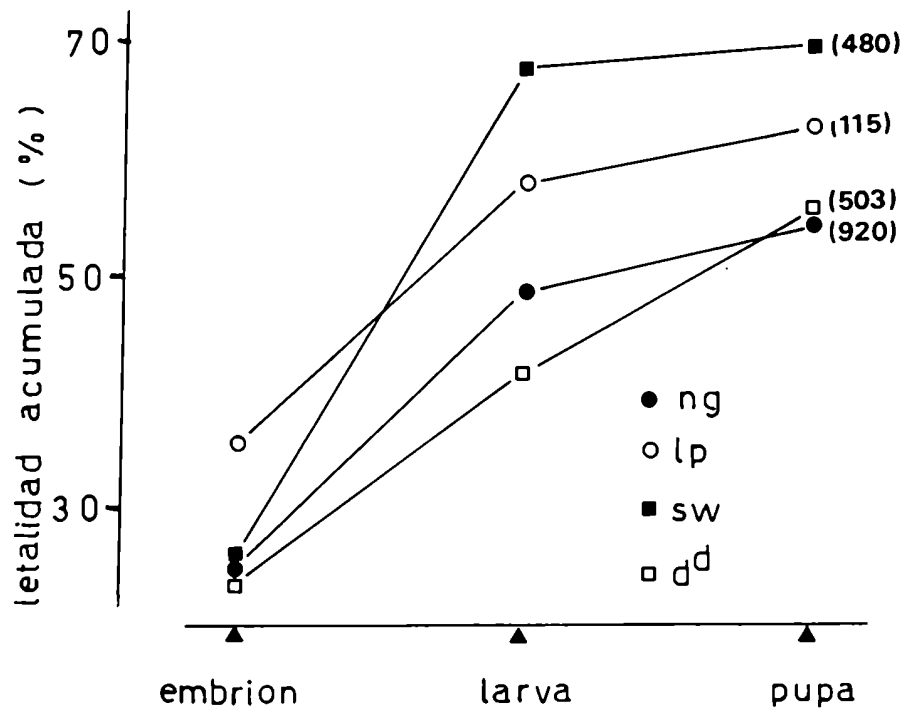
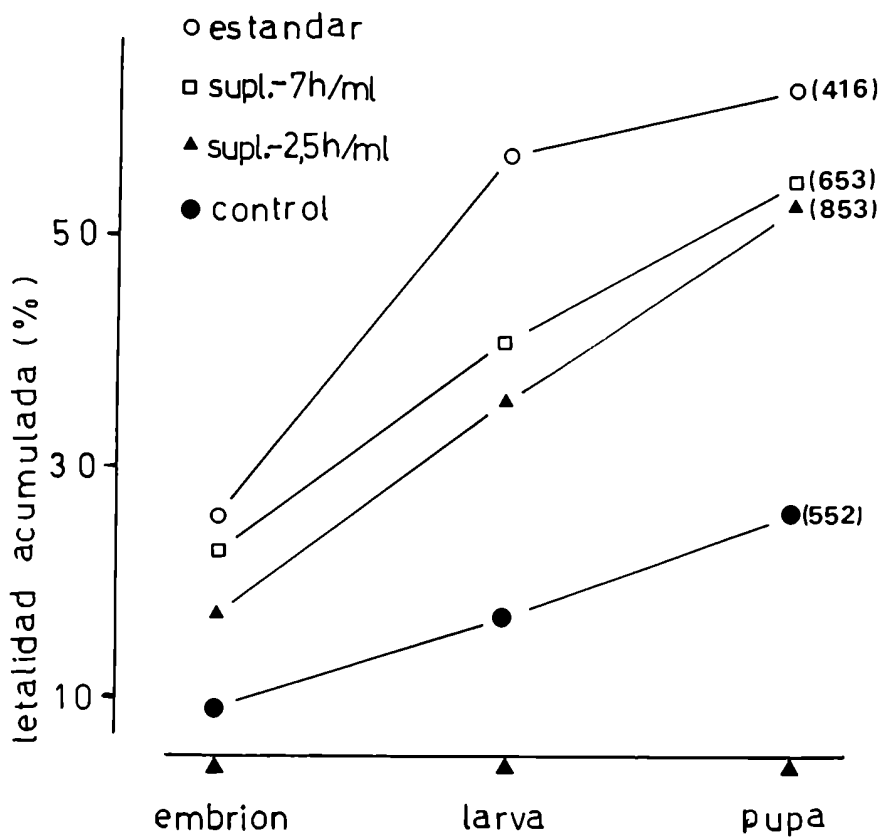


Figura III.4

Porcentaje de letalidad acumulada en cada estadio del desarrollo por la cepa TY+/+lp dd bajo condiciones de densidad de cultivo estándar (7 huevos/ml) y densidad baja (2,5 huevos/ml), y bajo condiciones de humedad estándar y suplementaria (supl.). La cepa RG237 criada en condiciones estándar fue incluida como control. Tamaño de muestra entre paréntesis.



IV. Casos fidedignos de recombinación masculina

Vamos a ocuparnos ahora de un fenómeno diferente: el aislamiento de verdaderos productos de recombinación en el macho. El primero de ellos fue aislado en uno de los experimentos cuyos resultados se presentaron en la Tabla III.1 pero no se hizo mención de ello hasta ahora para facilitar la presentación. En aquel experimento, trabajando con la cepa TY+/dd, de 503 cigotas iniciales se obtuvieron 221 moscas adultas (macho salvaje o hembra dd), pero entre ellas aparecieron dos individuos excepcionales, una hembra de tipo salvaje y un macho dd. La hembra, al ser cruzada por la cepa homocigota RG84 se probó heterocigota para el marcador (Tabla IV.1,A). En cuanto al macho, éste fue cruzado por dos cepas diferentes. Cruzado por hembras dd/dd se mostró homocigota para el marcador (Tabla IV.1,B) pero con la aparición de machos farados mutantes. Cruzado por la cepa salvaje segregó de una manera extraña en F₂ (Tabla IV.1,C): 1) los machos segregaron 1:1 ($X^2 = 0.22$), 2) las hembras no segregaron, 3) aparecieron individuos farados salvajes tanto en F₁ como en F₂.

Estos resultados podrían ser interpretados suponiendo que un evento de recombinación genética hubiera tenido lugar entre el marcador y el punto de ruptura (Figura IV.1,A). El resultado esperado al cruzar este macho excepcional con la cepa salvaje se muestra en la Figura IV.1,B. Al cruzar entre sí los machos heterocigotas y las hembras heterocigotas de la Figura IV.1,B se espera obtener una F₂ en la que todas las hijas reciban un alelo salvaje del padre (100% hembra salvaje) y que los hijos, al recibir el alelo mutante ligado al cromosoma Y del padre, segreguen salvaje y mutante, según cual alelo reciban de la madre.

Sería importante para corroborar esta hipótesis, mostrar que la traslocación permaneció intacta. Esto fue logrado usando los machos provenientes de la F₁ de los individuos cuyo recuento aparece en el cruzamiento B de la Tabla IV.1, los cuales se supone son TYdd/dd. Dichos machos se cruzaron y retrocruzaron por las cepas portadoras de cada uno de los marcadores disponibles del grupo de ligamiento y los resultados aparecen en la Tabla IV. 2. Como se ve, la capacidad de producir el ligamiento entre el factor masculinizante del cromosoma Y y cada uno de los marcadores permaneció intacta en el macho "excepcional" original. Debemos pues concluir, ante la evidencia presentada, que hemos sido capaces de aislar los dos productos de un

raro evento de recombinación en el macho, inmediatamente después de que éste se produjera.

El segundo ejemplo de esto se encontró en la cepa TY++/lp dd que fue descrita en el apartado anterior (Figura III.4). Las observaciones realizadas sobre esta cepa se han resumido en la Tabla IV.3. En conjunto se observaron 24 individuos excepcionales los cuales fueron cruzados por la cepa lp dd/lp dd (RG 237). En la Tabla IV.4 se explicita el criterio usado para inferir el genotipo de los individuos excepcionales en base a las segregaciones de sus cruzamientos por la cepa doble homocigota recesiva (RG237). El resultado fue que de 18 individuos que dejaron descendencia, solo 2 probaron ser auténticos casos de recombinación entre el marcador dd y el marcador lp; debe concluirse que los otros fueron simplemente casos de mala clasificación de los caracteres.

Al llegar a este punto, vale la pena hacer un resumen de las causas de aparición de individuos excepcionales en la traslocación T5038 que habían sido detectadas hasta aquí, y sus incidencias respectivas: 1) Viabilidad avanzada de aneuploides parciales para el segmento involucrado en la traslocación, la cual origina fundamentalmente imagos farados y cuya frecuencia está en el orden de 10%; 2) mala clasificación de los caracteres, evento que ocurre con una frecuencia de 1-2 % y que es descartado por la prueba de progenie, y 3) raros eventos de recombinación en el macho que al llegar a este punto habían sido demostrados fehacientemente por nosotros en dos ocasiones solamente.

Con este estudio previo se llegó al convencimiento de que para estudiar un fenómeno de frecuencia tan baja como este último el mismo debía, en una primera aproximación, estudiarse en cepas sin la traslocación, ya que las cepas traslocadas presentan una fertilidad que es la mitad de la de cepas no traslocadas. Este fue el objetivo perseguido por los experimentos descritos en las siguientes dos secciones.

Tabla IV.1.

Segregaciones obtenidas en los distintos cruzamientos realizados con los individuos "excepcionales".

A. Hembra excepcional (fenotipo +) x macho dd/dd (RG 84)						
	+		dd		N	X ²
F ₁	11		14		25	(1:1) 0.36

B. Macho excepcional (fenotipo dd) x hembra dd/dd (RG 84)				
	+	dd		dd
		macho	hembra	(macho farado)
F ₁	0	38	32	22
F ₂	0	59	50	34

C. Macho excepcional (fenotipo dd) x hembra +/+ (RG 17)						
	+		dd		+ dd (?)	
	macho	hembra	macho	hembra	(machos farados)	
F ₁	21	19	0	0	9	0 0
F ₂	38	60	34	0	12	5 14

Tabla IV.2.

Segregaciones observadas en cruzamientos de machos TYdd/dd (tomados de entre la descendencia del cruzamiento B de la Tabla IV.1), con hembras de las diversas cepas indicadas.

Cruzamiento	Salvajes	Mutantes	X ² (1:1)
x hembra ng/ng (RG32)	> 60	0	
macho F ₁ x idem	66 (machos)	67 (hembras)	0.01 NS
x hembra lp/lp (RG 21)	> 40	0	
macho F ₁ x idem	48 (machos)	52 (hembras)	0.16 NS
x hembra sw/sw (RG 242)	> 50	0	
macho F ₁ x idem	22 (machos)	17 (hembras)	0.64 NS

Tabla IV.3.

Segregación de los adultos emergidos de la cepa TY++/lp dd.

	<u>++</u>	<u>+ dd</u>	<u>lp +</u>	<u>lp dd</u>
macho	876	3	14	0
hembra	0	8	1	800

Se probaron verdaderos : 1 hembra lp + y 1 macho + dd.

Tabla IV.4.

Clasificación de los supuestos casos de recombinación según la prueba de progenie por RG 237.

<u>Supuesto</u>	<u>Segregación en la progenie</u>	<u>Conclusión</u>
Macho lp +	Segrega macho ++ y hembra lp dd:	debe ser macho ++
	Segrega macho lp + y hembra lp dd:	debe ser verdadero
Hembra lp +	No segrega (todo lp dd):	debe ser hembra lp dd
	Segrega lp + y lp dd:	debe ser verdadera
Macho + dd	Segrega macho ++ y hembra lp dd:	debe ser macho ++
	Segrega macho + dd y hembra lp dd:	debe ser verdadero
Hembra + dd	No segrega (todo lp dd):	debe ser hembra lp dd
	Segrega: + dd y lp dd	debe ser verdadera

Figura IV.1.A

Probable origen de dos individuos "excepcionales" observados en la progenie de la cepa $TY+/dd$.

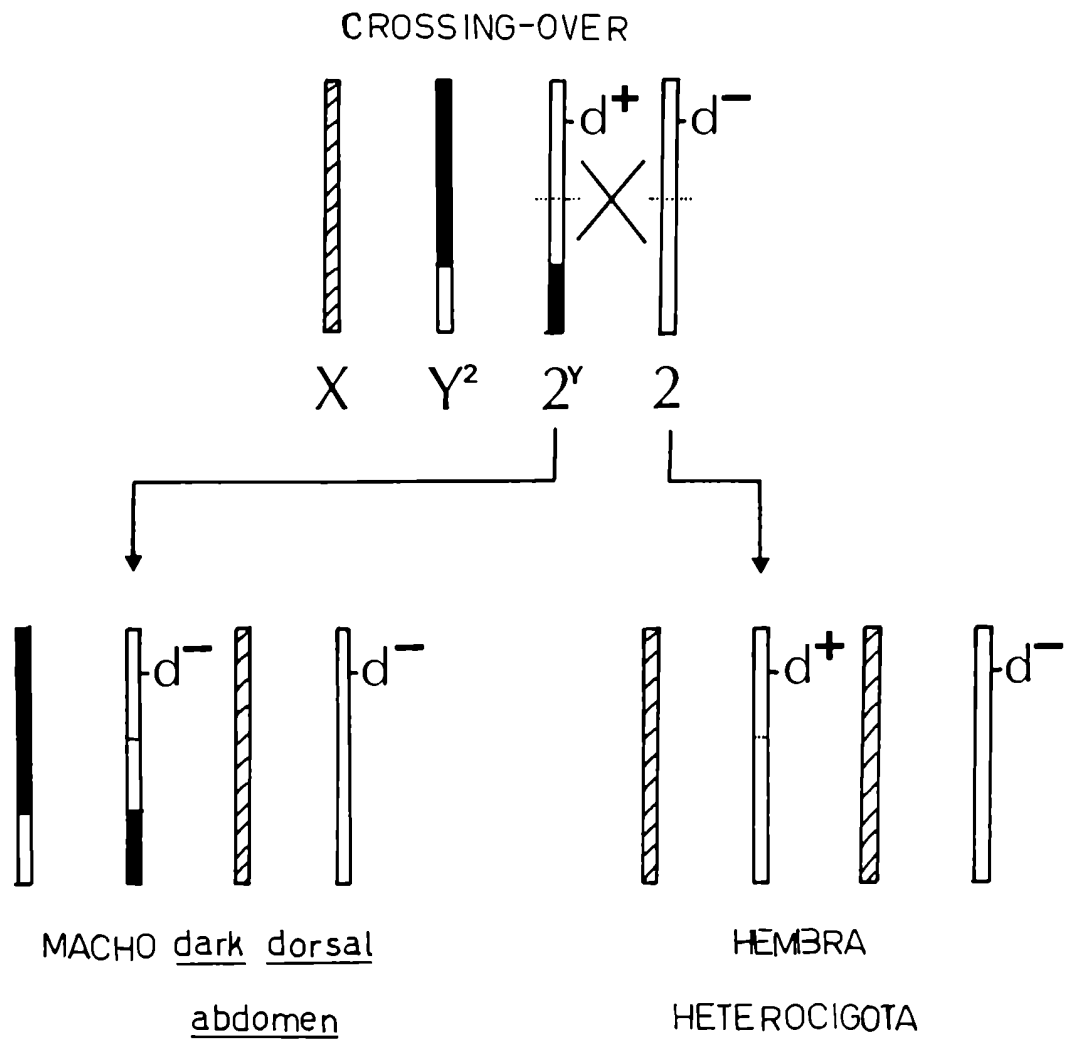
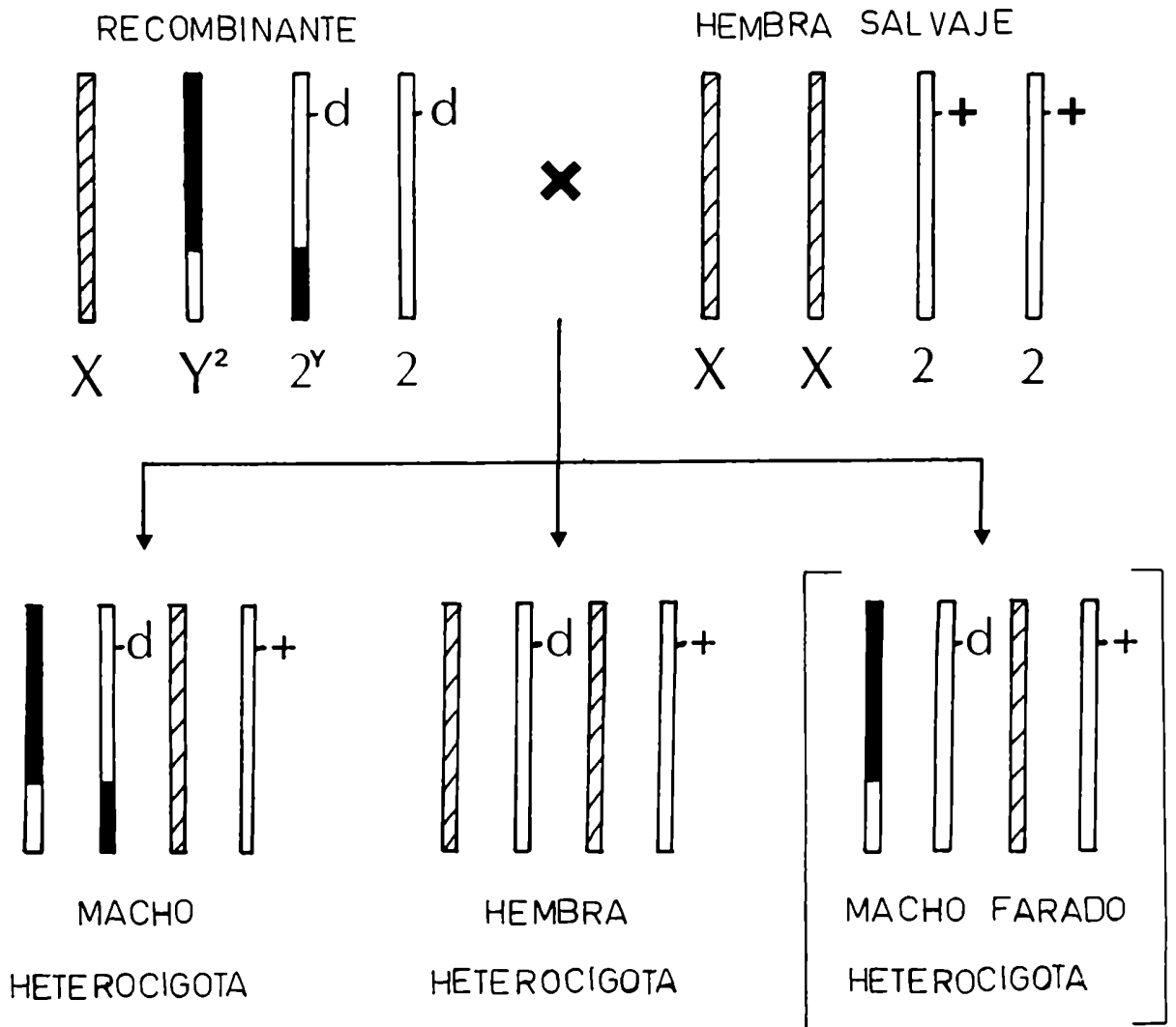


Figura IV. 1.B

Interpretación del cruzamiento entre el macho "excepcional" aislado en la cepa $TY+/dd$, y una hembra salvaje (RG 17).



V: Primeros experimentos e hipótesis de trabajo

El objetivo era entonces medir la frecuencia de recombinación masculina entre los marcadores *lp* y *dd* en una línea de moscas sin la traslocación. En primer lugar, disponiendo de la cepa doble marcada RG237, fue posible medir la distancia de recombinación (en la hembra) entre *lp* y *dd*. Para ello se realizó el cruzamiento RG237 x RG17, se separaron las hembras F_1 y se las retrocruzó por machos RG237. Los resultados obtenidos se ven en la Tabla V.1. La distancia entre los marcadores resulta ser: 0.4702 (± 0.0131). En estos datos de segregación se advierte, como ya fuera observado antes, una falta significativa ($X^2 = 4.28$) de individuos *lp*.

Por el otro lado, cuando se tomaron los machos F_1 y se los retrocruzó por RG237 se obtuvieron los resultados de la Tabla V.2. En el primer experimento se cruzaron machos RG17 por hembras RG237, y los machos F_1 obtenidos se retrocruzaron por la cepa doble recesiva RG237. Los recombinantes obtenidos (que fueron confirmados por prueba de progenie) fueron cinco en 1839 individuos, o sea entre dos y tres por mil (Tabla V.2,A). Se hizo una pequeña experiencia para ver si esta frecuencia era mayor en el cruzamiento recíproco y se observó que ello no ocurría (Tabla V.2,B). Tampoco se logró obtener una frecuencia mayor usando la cepa parcialmente de origen externo RG244 (Tabla V.2,C).

Concluidos estos experimentos exploratorios se llegó al convencimiento de que estábamos en presencia de un fenómeno de muy baja incidencia: 6 casos en 5.107 individuos de la cepa no traslocada (Tabla V.2), y 2 casos en 1702 individuos en la cepa traslocada (Tabla IV.3). Este fenómeno requería entonces diseñar un experimento de gran envergadura para poder probar hipótesis. Se hizo el cálculo del tamaño muestral requerido (ver Materiales y Métodos), y lo siguiente fue decidir cómo se elegirían las entradas. Se pensó en probar las siguientes hipótesis respecto al parámetro tasa de recombinación en el macho F_1 :

- 1º) Si había diferencias entre familias que registraban un caso previo comprobado de recombinación y familias que no lo registraban.
- 2º) Si había diferencia entre probar estas familias cruzándolas por una o por otra cepa original (RG17 y RG237).
- 3º) Si había diferencia al cruzar por la cepa RG244, parcialmente de origen externo.
- 4º) En cada uno de los casos anteriores, probar si había diferencia

entre los machos provenientes de los cruzamientos recíprocos.

Para este experimento se prepararon las siguientes familias:
1°) De individuos que habían registrado un caso "bona fide" de recombinación (Tabla V.2) se derivaron tres familias doble marcadas (lp dd/lp dd): F156--, F129-- y F145--, 2°) Como testigos y a partir del mismo material se derivaron dos familias que no registraron caso previo de recombinación; sólo que en este caso se obtuvieron dos subfamilias derivadas de cada una de ellas, una doble salvaje (++)/++ y la otra doble marcada : F154++ y F154-- ; F134++ y F134--. 3°) Además se decidió incluir la cepa de origen externo RG244.

Estas familias fueron cruzadas por las cepas RG17 o RG237 según correspondiera, a saber: F156--, F129--, F145--, F154-- y F134-- por la primera; y F154++, F134++ y RG244 por la segunda; en cada caso se hizo el cruzamiento directo y el recíproco. (Naturalmente que en todos los casos los machos F₁ obtenidos deben ser retrocruzados por la cepa probadora RG237). De cada uno de estos cruzamientos se prepararon las cosas como para tratar de superar los 2243 individuos (ver Materiales y Métodos) recontados en la progenie de cada retrocruza macho F₁ x hembra RG237.

Tabla V.1.

Individuos segregantes en la retrocruza de la hembra F₁ (RG17 x RG237) x macho RG 237.

	<u>+</u> <u>+</u>	<u>+</u> <u>dd</u>	<u>+</u> <u>lp</u>	<u>lp</u> <u>dd</u>
macho	215	195	172	185
hembra	189	170	149	184
	404	365	321	369

Tabla V.2.

Casos de recombinación masculina hallados en experimentos exploratorios. A: Macho F₁ (padre RG17 x madre RG237) x hembra RG237. B: Macho F₁(padre RG237 x madre RG17) x hembra RG237. C: Macho F₁ (RG244 x RG237) x hembra RG237.

	<u>+</u> <u>dd</u>		<u>lp</u> <u>+</u>		<u>Total</u>
	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	<u>macho</u>	<u>hembra</u>	
A	0	1	3	1	1839
B	0	0	0	0	705
C	1	0	0	0	2563
Total	1	1	3	1	5107

VI. Estudio pormenorizado y estimación de la frecuencia.

En total fueron revisadas en este experimento 44639 moscas. Entre ellas se separaron 495 productos aparentes de recombinación. De los que dejaron progenie en los 406 cruzamientos-prueba realizados 357 resultaron ser falsos positivos según un criterio semejante al de la Tabla IV.4, y 49 casos se probaron genuinos productos de recombinación. Dichos casos genuinos de recombinación resumidos en la Tabla VI.1, se presentaron en forma independiente del sexo de su portador y en frecuencia comparable para cada uno de los dos productos ($X^2 = 0.03$).

El detalle de los casos genuinos demostrados (x), tamaño de la muestra observada (n), frecuencia expresada en tanto por mil y su valor transformado por el arcoseno de la raíz cuadrada, se ha recopilado en la Tabla VI.2. Los valores de frecuencia de recombinación normalizados por la transformación arcoseno de la raíz han sido graficados en la Figura VI.1. Dicho gráfico permite visualizar el agrupamiento y la dispersión de los valores obtenidos en este experimento.

La primera comparación realizada fue entre el cruzamiento directo y el recíproco realizado dentro de cada familia. En la Tabla VI.3 se han volcado los valores de $t(S+R)$ de Sokal y Rohlf (1969), calculados usando la transformación matemática antedicha, obtenidos en cada par de comparaciones. Se ve que todos ellos son no significativos ($t < 1.96$ para $p < 0.05$). Aplicando un test independiente del anterior se usaron las tablas de Kastenbaum y Bowman (1970) de las que se extrajo el valor $c(K+B)$ para un $p < 0.05$; para ser significativa la diferencia entre las dos frecuencias comparadas (cruzamiento directo vs. recíproco), el mayor de los dos x observados en cada caso (Tabla VI.2), debe ser al menos igual al $c(K+B)$ que figura en la Tabla VI.3. Esto no ocurrió en ningún caso; se concluye que, en cuanto a frecuencia de recombinación en los machos F_1 , no hay diferencias entre los cruzamientos directos y los recíprocos. Se procedió, en consecuencia, a agrupar los datos por familias, en la parte final de la Tabla VI.3.

La siguiente comparación fue realizada entre las familias dentro de cada "grupo"; en el caso donde había tres familias, las comparaciones se hicieron tomándolas de a dos (Tabla VI.4). El resultado fue que no hubo diferencias significativas cuando se compa-

raron las tres familias con un caso previo de recombinación entre sí. Tampoco hubo diferencias entre las dos familias testigos cuando se las cruzó por RG17. En cambio, curiosamente, la diferencia de frecuencia observada entre cada una de las dos familias testigo cruzada por RG237 alcanzó el límite de significancia ($p < 0,05$) por ambos test estadísticos (Tabla VI.4). En consecuencia, sólo se agruparon los números observados en los "grupos" primero (un caso previo de recombinación) y segundo (testigo x RG17) y no así en el tercero (testigo x RG237).

A continuación las frecuencias observadas en el grupo de familias que registraban un caso previo de recombinación fueron comparadas con las frecuencias de los testigos (Tabla VI.5). Se observa que no hay diferencias significativas con los grupos testigos, sea el testigo x RG17 (2 familias agrupadas) o cada una de las 2 familias del testigo x RG237. No obstante ello, no debe pasarse por alto que la comparación con el cruzamiento F134++ x RG237 dio valores muy próximos a los niveles de rechazo ($t = 1,85$ vs $t = 1.96$ y $C = 14$ vs $C = 15$, respectivamente en cada test). Este mismo efecto se incrementa ($t = 1.93$) si este último cruzamiento se compara con todos los cruzamientos x RG17 agrupados (Tabla VI.5, parte inferior).

Resta entonces comparar las frecuencias obtenidas con machos F₁ del cruzamiento RG244 por RG237. Esto se hizo en la Tabla VI.6. Como se ve, en este caso el cruzamiento en cuestión no presentó una frecuencia de recombinación diferente del testigo F134++ x RG237; sin embargo, fue significativa la diferencia con respecto al testigo F154++ x RG237. También alcanzó el nivel de significancia la diferencia entre el cruzamiento en cuestión y todos los cruzamientos por RG17.

En consecuencia, los datos parecen agruparse en dos categorías o niveles de frecuencia : cruzamientos en los que los machos F₁ presentan valores de recombinación masculina en torno al 0,13% y cruzamientos con alrededor de 0,042%. Haciendo un agrupamiento "a posteriori" de los datos si se compara la frecuencia global observada en los cruzamientos por RG17 más el cruzamiento F154++ x RG237, por un lado, contra la observada en los cruzamientos por RG237 con excepción del antedicho, por el otro, se puede comprobar que la diferencia entre ambas resulta altamente significativa por ambos tests ($t = 3.03$ y $c = 44$; $p < 0.01$).

Tabla VI.1.

Resumen de los casos genuinos de recombinación masculina recuperados entre 44639 individuos observados.

	<u>+ dd</u>	<u>lp +</u>	
macho	11	10	21
hembra	<u>14</u>	<u>14</u>	<u>28</u>
	25	24	49

Tabla VI.2

Planilla general de resultados. (Grupo, hace referencia a los grupos a comparar, a saber: familias que presentaron previamente un caso de recombinación vs familias que no lo hicieron; estas últimas comparadas en dos cruzamientos. Hay además una cepa de otro origen para ser comparada con las restantes.)

		Cruzamiento		x	n	$(x/n)10^3$	$\arcsen(x/n)^{0.5}$
Grupo	Familia	Padre	Madre				
Un caso de c-o previo	F156--	lp dd	RG17	3	3187	0.94	1.76
		RG17	lp dd	1	1966	0.51	1.29
	F129--	lp dd	RG17	5	2750	1.82	2.44
		RG17	lp dd	2	2565	0.78	1.60
	F145--	lp dd	RG17	2	2047	0.98	1.79
		RG17	lp dd	5	2172	2.30	2.75
Testigos	F154--	lp dd	RG17	3	2643	1.13	1.93
		RG17	lp dd	3	2494	1.20	1.99
x RG17	F134--	lp dd	RG17	3	2393	1.25	2.03
		RG17	lp dd	5	2650	1.89	2.49
Testigos	F154++	+ +	RG237	9	4651	1.93	2.52
		RG237	+ +	3	3156	0.95	1.77
x RG237	F134++	+ +	RG237	1	3383	0.29	0.98
		RG237	+ +	2	2756	0.72	1.54
Externo	RG244++	+ +	RG237	1	2968	0.34	1.05
		RG237	+ +	1	2809	0.36	1.08
Total				49	44590	1.10	1.90

Tabla VI.3.

Comparación entre los cruzamientos directos y recíprocos; posterior agrupamiento de datos por familias.

Cruzamiento	t (S+R)	c(K+B)	x	n	(x/n)10 ³	arcsen(x/n) ^{0.5}
F156 x RG17	0.57	-(obs.3)	4	5153	0.78	1.60
F129 x RG17	1.07	7(obs.5)	7	5315	1.32	2.08
F145 x RG17	-1.09	7(obs.5)	7	4219	1.66	2.33
F154 x RG17	-0.07	6(obs.3)	6	5137	1.17	1.96
F134 x RG17	-0.57	7(obs.5)	8	5043	1.59	2.28
F154 x RG237	1.44	11(obs.9)	12	7807	1.54	2.25
F134 x RG237	-0.76	-(obs.2)	3	6139	0.49	1.27
RG244 x RG237	-0.04	-(obs.1)	2	5777	0.35	1.07

Tabla VI.4.

Prueba de homogeneidad dentro de grupos y agrupamiento de datos por grupos (excepto en el caso en que hubo diferencias significativas).

Comparación	t(S+R)	c (K+B)	x	n	(x/n)10 ³	arcsen(x/n) ^{0.5}
F156 vs F129	-0.86	9(obs.7)				
F156 vs F145	-1.24	9(obs.7)	18	14687	1.22	2.01
F129 vs F145	-0.43	10(obs.7)				
F154 vs F134 (xRG17)	-0.57	11(obs.8)	14	10180	1.37	2.12
F154 vs F134 (xRG237)	2.00*	12(obs.12)*	15	13946	-	-

* Diferencia significativa p <0.05

Tabla VI.5.

Comparación entre el grupo de familias que registran un caso previo de recombinación y los testigos. Agrupamiento posterior de datos y nueva comparación posterior al agrupamiento.

Comparacion	t (S+R)	c(K+B)	x	n	(x/n)10 ³	arcsen(x/n) ^{0.5}
c-o previo						
vs testigo (x RG17)	-0.32	19 (14)	32	24867	1.29	2.05
c-o previo vsF154						
vs testigo xRG237 (xRG237) vsF134	-0.28	16 (12)	26	11987	2.17	2.67
xRG237	1.85 [®]	15 (14) [®]	17	16319	1.04	1.04
c-o previo vsF154						
+ testigo xRG237 (xRG17) vsF134	-0.51	16 (12)	44	32674	1.35	2.10
xRG237	1.93 [®]	33 (32) [®]	35	31006	-	-

[®] Diferencia no significativa, pero muy próxima al nivel de significancia.

Tabla VI.6.

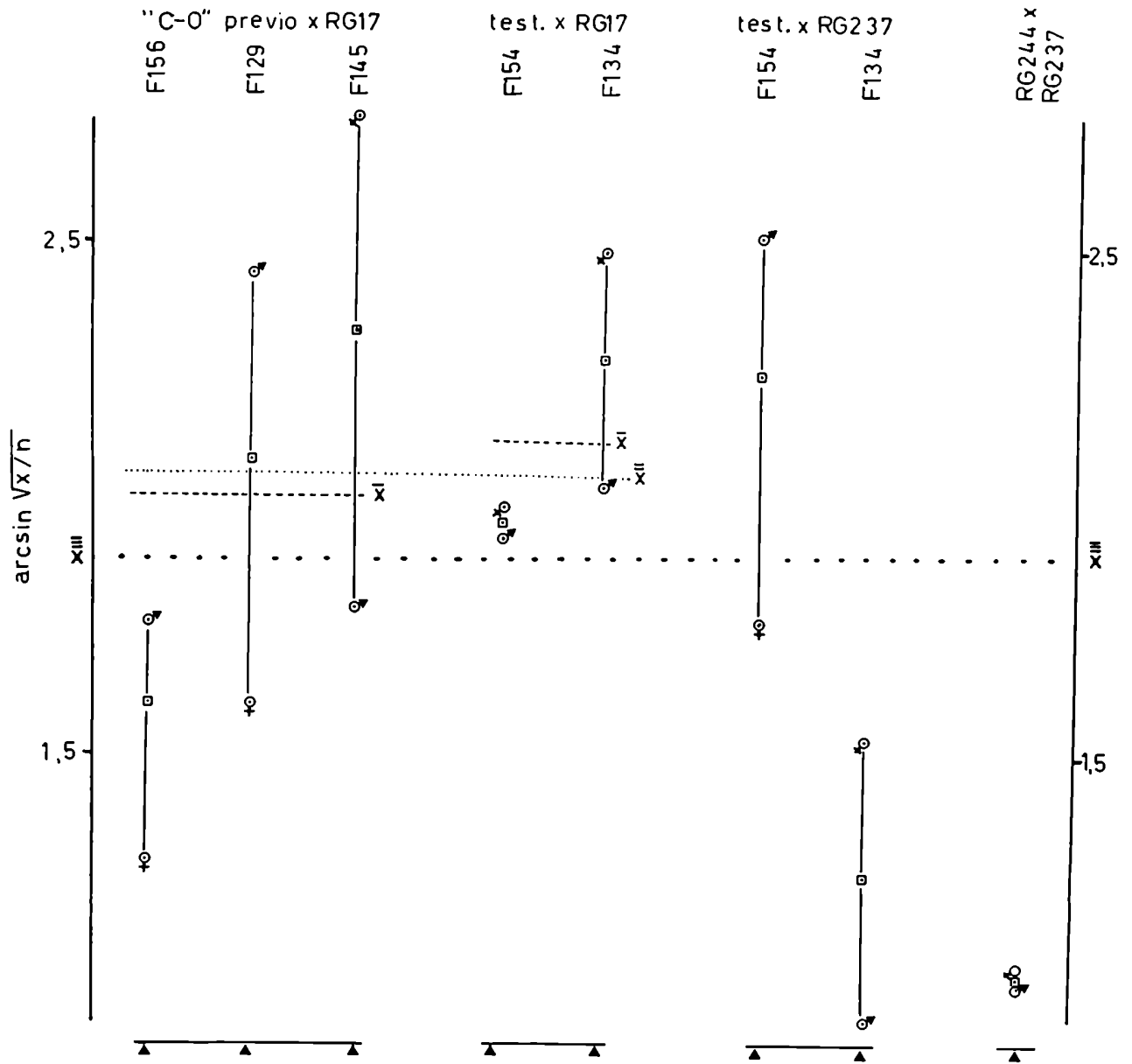
Comparación de la cepa RG244 con su testigo y con el resto de los datos (homogéneos) agrupados.

Comparacion	t(S+R)	c(K+B)	x	n	(x/n)10 ³	arcsen(x/n) ^{0.5}
vsF154						
RG244 xRG237	-2.37*	12(12)*	14	13584	-	-
x vsF134						
RG237 xRG237	-0.38	5(3)	5	11916	0.42	1.17
vs c-o previo						
+ testigos (xRG17)	2.36*	32(32)*	34	30644	-	-

* Diferencia significativa p<0.05

Figura VI.1.

Representación gráfica de los valores de frecuencia de recombinación masculina, normalizados por la transformación arcoseno de la raíz (σ^{\prime} : familia en cuestión usada como padre; σ : familia en cuestión usada como madre; σ : cruzamientos recíprocos agrupados; \bar{x} : frecuencia media de cada "grupo"; \bar{x} : frecuencia media de todos los cruzamientos por RG 17; \bar{x} : media global del experimento).



VII. Ubicación del punto de ruptura en el mapa genético.

En una sección anterior (Resultados, Parte III) se mencionó la mutación **sw** (**slow-mazzard**), ligada a las restantes usadas en este trabajo y caracterizada por un color de ojos diferente y por causar un retraso general del desarrollo (Cladera, 1990). En cuanto fue posible sintetizar la cepa pura triple marcada **lp-dd-sw**, que fue registrada con la identificación **RG272**, se hizo posible también estudiar las distancias de recombinación (en la hembra) entre dichos marcadores e intentar el establecimiento del orden genético por medio de una prueba de tres puntos. Se realizó con este fin el cruzamiento **RG272 x RG17**. Las segregaciones obtenidas cuando las hembras **F1** se retrocruzaron por **RG272** se presentan en la Tabla VII.1; se realizaron tres repeticiones. Los resultados mostraron desvios que no llegaron a ser significativos entre sexos: $X^2_{\text{global}} = 3.79$, 1 g.l. (n.s.); $X^2_{\text{heterog.}} = 1.98$, 2 g.l. (n.s.). La segregación del marcador **lp**, como ya había sido observado antes (Tabla V,1) mostró una falta significativa de individuos marcados ($X^2_{\text{global}} = 19.7$, $p < 0.01$; $X^2_{\text{heterog.}} = 2.4$, n.s.). La segregación del marcador **dd** fue de acuerdo con lo esperado ($X^2_{\text{global}} = 0.06$, n.s.; $X^2_{\text{heterog.}} = 0.77$, n.s.), y finalmente la segregación del marcador **sw** también mostró una falta significativa del marcador ($X^2_{\text{global}} = 19.1$, $p < 0,01$; $X^2_{\text{heterog.}} = 1.15$, n.s.).

En la Tabla VII.2 se muestran los recuentos globales de gametas recombinantes en las que cada marcador ha recombinado respecto de los otros dos. Observando los números de la Tabla VII.2 con la debida precaución se puede concluir que el marcador **dd** está ubicado en el medio de los otros dos marcadores: Aún cuando no se considere la frecuencia de **+ sw lp** por la baja viabilidad de **lp** y **sw**, de todos modos **+ + dd**, que tiene viabilidad normal, aparece en frecuencia más baja que cualquiera de las otras combinaciones (**+ + sw** y **+ + lp**, las cuales de hecho si tienen viabilidad menguada como vimos más arriba). Si es cierto el orden genético **lp-dd-sw**, las distancias calculadas entre ellos (ignorando viabilidad reducida) serían $394+1004/2799 = 49.95 \%$ y $542+394/2799=33.44 \%$, respectivamente. En la parte V ya se hizo una estimación de la distancia **lp-dd**; ambos experimentos conjuntamente arrojan una mejor estimación de dicha distancia que es igual a $(686+1398)/(1459+2799) = 0.489 \pm 0,0076$.

En cuanto la cepa **RG 272** fue sintetizada, se empezó a trabajar en la construcción de una cepa con la traslocación **T5038**

y las hembras triple marcadas. Finalmente cuando estuvo lista la cepa que fue identificada como **TY+++ / lp dd sw**, una primera observación de la misma permitió comprobar además del funcionamiento esperado (todos los machos salvajes, todas las hembras ---), que la falta de hembras se hace más severa al agregar marcadores (se obtuvieron 317 machos y 120 hembras). En esta observación preliminar se pudo detectar la aparición de una hembra de fenotipo **lp ++**. A pesar de que su genotipo no llegó a comprobarse por prueba de progenie, la aparición de este individuo sugirió la posibilidad de utilizar estos recombinantes para mapear de qué lado está ubicado el punto de ruptura de la traslocación. Previamente había sido establecido que el mismo debía encontrarse por fuera del conjunto de marcadores **lp dd sw** (ver III Parte); faltaba saber ahora de qué lado. Supongamos ahora el siguiente esquema **T(1)lp(2)dd(3)sw(4)** donde T representa el sitio de ruptura de la traslocación, ubicado a la izquierda, y su esquema alternativo: **(1)lp(2)dd(3)sw(4)T**, donde T está ubicado a la derecha; y los números del 1 al 4, señalan los sitios donde se podría verificar el entrecruzamiento. En la Tabla VII.3 se han representado los productos de recombinación y sus probabilidades asociadas en cada hipótesis (suponiendo que la probabilidad de cada evento de recombinación sea independiente). Teóricamente, con identificar un solo producto comprobado de recombinación bastaría para tomar una decisión sobre cual es el lado más probable donde debe ubicarse T.

Se preparó un experimento con el objeto de observar el fenotipo de un número mayor a 9077 moscas (ver Materiales y Métodos) entre machos y hembras producidos por la cepa **TY+++ / lp dd sw**, separar los supuestos recombinantes y cruzarlos por la cepa **RG272** para comprobar su genotipo. En total se revisaron 5578 machos y 3230 hembras de entre los cuales se separaron 42 casos supuestos. De ellos 30 individuos dejaron descendencia en la prueba de progenie, 25 resultaron falsos pero 5 se probaron genuinos casos de recombinación, a saber: 3 machos + **dd sw**, 1 hembra **lp ++** y 1 macho **++ sw**. O sea obtuvimos 4 productos de recombinación en el sitio (2) y uno en el sitio (3) probándose en consecuencia que el punto de ruptura en T5038 debe más probablemente quedar a la izquierda de **lp dd sw**.

Tabla VII.1.

Segregación de los caracteres **long pupa**, **dark dorsal** y **slow-mazzard** observada en la retrocruza de la hembra F1 (RG17 x RG272) por la cepa triple marcada RG 272 a través de tres repeticiones.

<u>Pupa</u>	<u>+</u>				<u>lp</u>			
<u>Dorso</u>	<u>+</u>		<u>dd</u>		<u>+</u>		<u>dd</u>	
<u>Ojo</u>	<u>+</u>	<u>sw</u>	<u>+</u>	<u>sw</u>	<u>+</u>	<u>sw</u>	<u>+</u>	<u>sw</u>
I macho	109	59	59	119	121	37	66	77
I hembra	118	71	64	123	139	38	77	91
II macho	65	38	40	67	53	16	38	45
II hembra	64	32	31	81	73	29	36	52
III macho	75	26	16	73	52	14	37	46
III hembra	70	29	32	56	47	18	33	47
	501	255	242	519	495	152	287	358

Tabla VII.2.

Recuento de recombinantes para cada marcador respecto de los otros dos (Prueba de tres puntos).

<u>slow-mazzard</u>	<u>dark dorsal</u>	<u>long pupa</u>
<u>+ + sw</u>	<u>+ + dd</u>	<u>+ + lp</u>
255	242	485
<u>+ lp dd</u>	<u>+ sw lp</u>	<u>+ dd sw</u>
287	152	519
542	394	1004

Tabla VII.3.

Productos de recombinación masculina, sus probabilidades asociadas en cada hipótesis, y las frecuencias observadas en cada caso.

Productos (macho/hembra)	<u>T a l a i q u i e r d a</u>		<u>T a l a d e r e c h a</u>		Frecuencia observada
	Origen (c-o en:)	Probab. (ord.mag.)	Origen (c-o en:)	Probab. (ord.mag.)	
+ dd sw/lp + +	2	10^{-3}	2 y 4	10^{-6}	4/8808
+ + +/lp dd +	3	10^{-3}	3 y 4	10^{-6}	1/8808
+ dd lp/sw + +	1 y 3	10^{-6}	3	10^{-3}	0
+ + lp/sw dd +	1 y 3	10^{-6}	2	10^{-3}	0

DISCUSION

"El espíritu humano se siente inclinado naturalmente a suponer en las cosas mas orden y semejanza del que en ellas encuentra; y mientras que la naturaleza està llena de excepciones y de diferencias, el espíritu ve por doquier armonia, acuerdo y similitud".
Novum organum Libro I Afor. 45.

Baja frecuencia de recombinación masculina

La primera conclusión firme de este trabajo es que se ha probado inequívocamente la existencia de gametas recombinantes producidas en los machos F₁ de Ceratitidis capitata (Tabla IV.1). Pero el estudio pormenorizado revelò que la frecuencia de dicho fenómeno es muy baja. En nuestras condiciones la misma oscilò en torno al 0,11% (Tabla VI.2) con un intervalo de confianza del 95% que va aproximadamente desde 0.25% hasta 0.02%, con otras palabras entre 2.5 por mil y 2 por diez mil.

En la Tabla D.1 se han resumido las observaciones publicadas previamente sobre recombinación masculina entre los marcadores **ap-dc** y **w-or** (Rössler 1982a y b). La primera objeción que surge al contemplar estos datos, en el caso del par **ap-dc**, es la gran asimetría entre los números obtenidos de cada uno de los dos supuestos productos de la recombinación (7:0, 60:0; 72:46 y 197:4). En el caso del par **w-or**, el autor no proporciona los recuentos, de manera que no podemos saber si la respuesta fue más simétrica que en el anterior. La conclusión a la que el autor llega parece un tanto apresurada ya que descarta como falsos (por asimétricos) los casos observados en la cepa sin traslocar y a continuación acepta como verdaderos todos los casos (no importa su asimetría) observados en la cepa con la traslocación **TY +/dp** (Rössler, 1982a). Si se toma el valor más alto reportado por este autor (Tabla D.1, cuarta línea) y se ignoran como falsos los casos **++** (tal como el autor procedió con los resultados anotados en la segunda línea), el valor calculado con los 4 casos **ap dc** daría una frecuencia de

$4/(0.5)5069 = 0,04\%$;el valor más bajo para el mismo autor! Por otra parte debe hacerse notar que una seria objeción a estos resultados es la utilización del marcador de el cual presenta penetrancia incompleta y variable expresividad (Saul y Rossler 1984). Debe reconocerse, por fin, que sin hacer las pruebas de progenie apropiadas en cada caso, resulta imposible distinguir a ciencia cierta entre falsos y verdaderos casos de recombinación.

En la Figura D.1 se han graficado los valores normalizados por la transformación arcoseno de la raíz de las frecuencias de recombinación en el macho tomadas de la literatura (Tabla D.1) junto a las reportados en el presente trabajo (Tabla VI.3). Se advierte que nuestros valores no sólo son más bajos sino que se encuentran mucho menos dispersos que los valores de la literatura. Por otra parte, obsérvese que si en lugar de hacer las pruebas de progenie correspondientes, se hubieran tomado los datos "crudos", es decir, contabilizando todos los casos observados, sin hacer las pruebas de progenie, la media global de nuestros datos daría $495/44639 = 1,11\%$, o sea bien en el centro de la distribución de los datos publicados previamente (ver " \bar{x} " en Figura. D.1). Es atractiva la idea que sugiere esta observación: si en los experimentos de Rössler se hubieran realizado las pruebas de progenie apropiadas en cada caso, es probable que los valores medios observados, así como su dispersión, fueran mucho más próximos a los datos reportados aquí, y a su vez, más próximos a los que nosotros juzgamos verdaderos valores. Esta conclusión ha sido básicamente corroborada por un trabajo de muy reciente aparición; en el mismo se confirma el orden de magnitud de los valores de frecuencia de recombinación masculina hallados aquí y se acepta la premisa de que cada caso excepcional debe ser sometido a prueba de progenie (Busch-Petersen 1989).

Viabilidad avanzada de trisómicos parciales

La segunda conclusión que se extrae de esta investigación es que en la cepa traslocada T 5038, en la cual sólo un 44% de las cigotas llega a adulto, existe un gran número de abortos que superan la fase embrionaria alcanzando incluso a empupar (Figura II.3). Dentro del pupario, los individuos que alcanzan a diferenciarse son invariablemente machos. Se postula aquí, que estos individuos representan cigotas trisómicas parciales para la región del autosoma traslocado sobre el cromosoma Y. Se sugiere además que

dichos machos "farados" (encerrados dentro del pupario) deben presentar el fenotipo de todo marcador ubicado en la porción no traslocada del autosoma. Dicha predicción llegó a ser confirmada para los marcadores *ng*, *dd* y *sw* (Figuras II.1; III.1,B; y III.2). Respecto del marcador *lp* existen unas pocas observaciones de su presencia en machos farados que necesitan ser extendidas, y aunque estos datos no son concluyentes respecto de dicho marcador, debe destacarse sin embargo que los mismos no muestran ni un solo individuo "macho salvaje farado" que sería lo esperado en el caso de que la hipótesis alternativa fuera cierta.

Las dos traslocaciones Y-autosoma reportadas previamente en *C. capitata* empleando para su selección la herencia holandrica de un marcador genético, *TY +/dp 69* y *TY +/dp 127*, no fueron descriptas como presentando abortos tardíos al estado de pupa (Rossler, 1979b), sin embargo este mismo autor menciona en otra parte una cepa suya descrita como *TY +/w 93*, mantenida en su laboratorio por 18 generaciones y que daba iguales proporciones de machos salvajes, hembras mutantes y "machos mutantes" (Rossler, 1981). En este contexto Robinson y Heemert (1982) reportaron una cepa *TY ap⁻/ap⁺ 176*, cuyo comportamiento resultó inexplicable para estos autores. En dicha cepa los machos *TY ap⁻/ap⁺* cruzados por hembras *ap⁻/ap⁻*, producían en la progenie, además de los machos *apricot (TY ap⁻/ap⁻)* y de las hembras tipo salvaje (*ap⁺/ap⁻*) un porcentaje variable (4.4% a 16.7%) de machos tipo salvaje, estériles (Robinson y Heemert, 1982). Nuestra sugerencia de que las cigotas duplicadas para la región autosómica traslocada sobre el Y podrían sobrevivir hasta muy tarde en el desarrollo (en este caso adulto estéril) podría explicar satisfactoriamente estos resultados. Debemos mencionar también un reporte sobre aparición de pequeños machos estériles con fenotipo mutante en unas líneas traslocadas que fueron explicados, al igual que en nuestra investigación, como hiperploides parciales para el sector traslocado (Saul 1984).

Finalmente, el mismo Robinson (1984) obtuvo tres traslocaciones Y-autosoma ligando al cromosoma masculino la herencia del gen *w* mencionado antes; en dos de ellas, *TY+/w 23* y *TY+/w 49*, se observa exceso de pupas *w* pero baja emergencia de adultos (Robinson, 1984). Este autor intenta explicar este fenómeno por la supervivencia hasta pupa de aneuploides, pero dice que disecando las pupas *w* no emergidas se encuentra que todas son "hembras" (aunque no muestra recuentos ni fotos de ello). Lo que parece no encajar en el

caso de las traslocaciones TY+/w 23 y TY+/w 49 recién mencionadas sería que el portador de la "deficiencia autosómica" (Figura II.2) sobreviviera hasta más tarde que el portador de la "duplicación"; debe hacerse notar sin embargo, que estas dos cepas presentaron supervivencias hasta adulto mucho más bajas que una tercera, TY+/w 101, obtenida en el mismo rastreo, la cual a su vez no presentaba exceso de pupas w ni abortos tardíos. Es tentadora la idea de que haya más de una traslocación involucrada en la dos primeras cepas, posibilidad que el propio autor no descarta (Ibidem, p. 213).

Mapeo del punto de ruptura de la traslocación

Párrafo aparte merece el mapeo del punto de ruptura de la traslocación T5038. En primer lugar, podemos concluir, tal como se mencionó más arriba, que los marcadores ng, dd, y sw deben estar ubicados sobre el segmento no traslocado del autosoma, siendo sugerido otro tanto para el marcador lp. En segundo lugar, se han aportado evidencias de que el orden más probable debe ser (arrancando en el punto de ruptura) lp-dd-sw (Tablas VII.2 y VII.3). Se han publicado datos parecidos, obtenidos sobre la traslocación TY+/ap 4, respecto al ya mencionado par ap-dc (Rosšler, 1985). En un trabajo muy reciente, y usando una metodología similar, se ha establecido el orden or-T101-w, para un tercer grupo de ligamiento (Busch-Petersen 1989). Estos mapas han sido representados en la Figura D.2.

Queda implícito en todos estos estudios el supuesto de que cuanto más próximo está un marcador al punto de ruptura de la traslocación, más raro será un evento de recombinación masculina entre ambos. No habiéndose observado en nuestros experimentos ni un solo caso de recombinación entre ng-lp (dist. 14,9; Cladera *et al* 1987) y el punto de ruptura de T5038 debe concluirse que ellos deben estar muy próximos al mismo.

Recombinación masculina en presencia de una traslocación

Se concluye además que no hay fundamentos experimentales que avalen la sugerencia (cf. Rosšler 1982a) de que las cepas con traslocaciones presenten mayores frecuencias de recombinación en machos que las cepas sin traslocaciones. Curiosamente, en los dos experimentos referidos (Figura D.1) la frecuencia de recombinación entre cada uno de los dos pares de marcadores (lp-dd y ap-dc respectivamente) observada cuando el cromosoma portador de los marcadores está involucrado en una traslocación, se ubica muy

cerca del extremo inferior del rango de valores observados para el mismo par de marcadores cuando ellos están ubicados sobre un cromosoma estándar (ver T4 y T5038, Figura D.1); luego, sería posible que dichas frecuencias fueran en todo caso menores y no mayores. Recientemente, Busch-Petersen y Southern (1987), en un experimento destinado a aislar supresores de la recombinación entre **ap** y **dc** en la hembra de C. capitata obtuvieron 5 nuevas traslocaciones autosoma-autosoma involucrando al cromosoma portador de los genes **ap** y **dc** (Busch-Petersen y Southern, 1987). Estos autores proponen que la recombinación (en la hembra) fue suprimida en los individuos heterocigotas para las traslocaciones por uno de estos dos mecanismos: 1) por letalidad de las gametas aneuploides producidas por un evento de recombinación ocurrido en el segmento intersticial entre el centrómero y el punto de ruptura de la traslocación, o 2) por una interferencia con el inicio o mantenimiento de la sinapsis y, por ese mecanismo, un impedimento físico del cross-over. Un efecto semejante debería verificarse en la recombinación masculina, en presencia de una traslocación Y-autosoma, si es que su mecanismo depende de la sinapsis

Estabilidad del ligamiento ng-sexo en la T5038

Una observación destacable que surge de los datos informados aquí es la notable estabilidad de la cepa **TY +/ng 5038**. La misma fue recuperada luego de 55 generaciones (5 años) de cultivo rutinario sin indicios de desacople entre el marcador **ng** y el sexo, y conservando además una letalidad de huevo a adulto de al menos un 50%. Este hecho es muy importante porque sugiere al menos dos cosas: 1º) que no se ha producido una reversión del rearrreglo cromosómico a la configuración estándar como ocurrió con una traslocación Y-autosoma en Lucilia (Foster et al. 1980), y 2º) que tampoco se ha producido selección para una predominancia de la "segregación alternada" sobre la "segregación adyacente" (Strickberger 1968) como ha sido sugerido que puede ocurrir teóricamente (Nei 1969), y como de hecho ha sido reportado que ocurrió con una traslocación Y-autosoma en Hylemya (Heemert & Voelman, 1979). Lo primero fue probado por los datos de la Tabla VI.2, y lo segundo por los datos de la Figura II.3. Estos hechos, unidos a la proximidad en el mapa genético con el punto de ruptura (sugerida más arriba) explica la estabilidad de la línea **TY+/ng 5038** de manera satisfactoria.

En este contexto, el comportamiento de la cepa **T +/ng 5038**

coincide con lo observado por otros, quienes reportan que el grado de esterilidad parcial heredable en dos cepas de Ceratitidis capitata portadoras de sendas traslocaciones Y-autosoma permaneciò igual luego de 4 años (màs de 40 generaciones) sin selecciòn alguna (Steffens, 1983). Asimismo, el hecho de que cuando aparecen individuos excepcionales, la propiedad de pseudoligamiento asociada con la traslocaciòn permanece intacta en ellos, tambièn ha sido observado recientemente por otro autor (Busch-Petersen 1989).

Tabla D.1.

Casos de recombinaciòn genètica en machos de Ceratitidis capitata reportados previamente en la literatura.

Genotipo macho	+	+	ap	+	+	dc	ap	dc	(x/n)x10 ³
+ +/ap dc	2473		7		0		2463		1,42
ap +/+ dc	60		3339		2866		0		9,67
Y+/dp; + +/ap dc	2955		72		46		2860		20,29
Y+/dp; ap +/+ dc	197		2604		2465		4		39,65
	<u>Total</u>		Nº recombinantes (deducido)						
+ +/w or	4407				17				4,00
+ or/w +	6937				73				10,50

Datos tomados de Rössler 1982a y b.

Figura D.1

Representación gráfica de los valores de frecuencia de recombinación en macho de *Ceratitidis capitata*, normalizados por la transformación arcoseno de la raíz. Línea superior: valores de Tabla D.1 (A1 = ap-dc normal, A2 = ap-dc, TY+/dp; B = w-or; T4 = TY+ +/ap dc). Línea inferior = valores de Tabla VI.3 (\bar{X} = media del experimento; "X" = frecuencia observada sin hacer pruebas de progeñie; T5038 = TY+++/ lp dd sw).

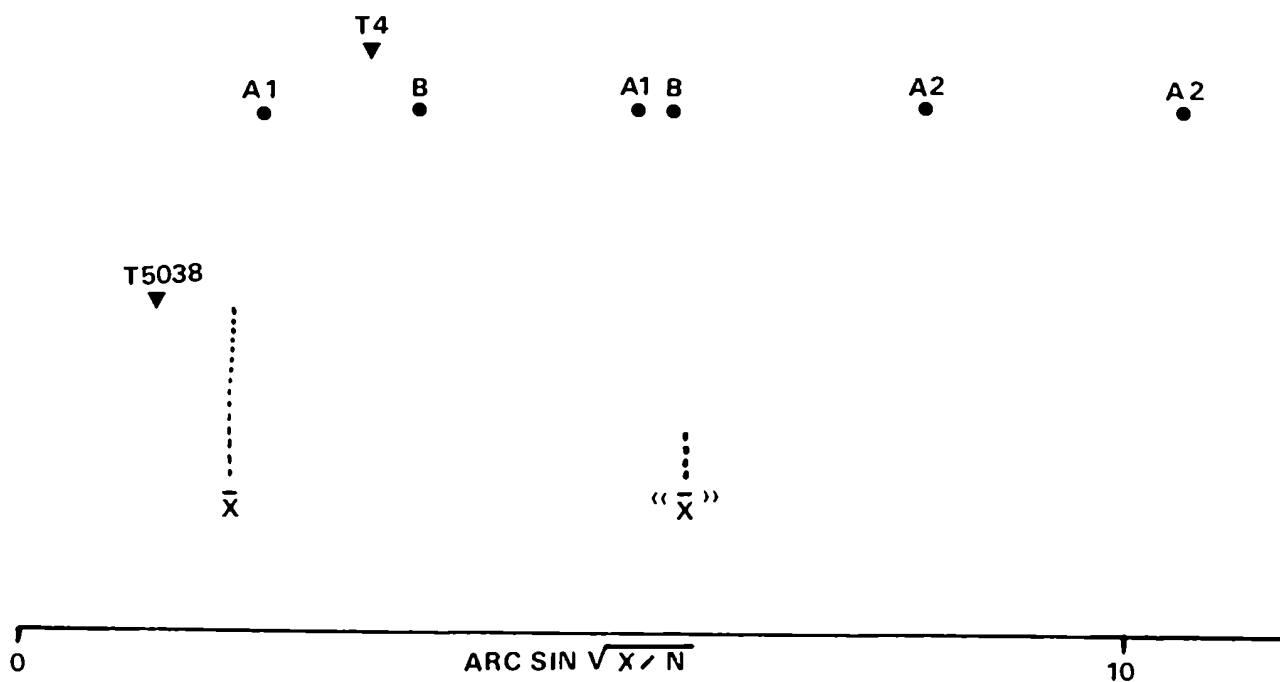


Figura D.2

Mapeo del punto de ruptura de tres translocaciones; c-o macho: frecuencia de recombinación masculina (en tanto por mil); distancia: frecuencia de recombinación en la hembra (por ciento). Referencias: T4, Rössler, 1985; T101, Busch-Petersen, 1989, (distancia: Rössler, 1982b); T5038, este trabajo .

T4

	<u>T</u>	<u>ap</u>	<u>dc</u>
c-o macho	0,4		3,0
distancia	(-)		20

T101

	<u>or</u>	<u>T</u>	<u>w</u>
c-o macho	0,5		2,0
distancia	/	49	/

T5038

	<u>T</u>	<u>lp</u>	<u>dd</u>	<u>sw</u>
c-o macho	0		0,4	0,1
distancia	(-)		49	33

Evaluación final de los resultados y sus implicancias

Es importante evaluar en primer término cuáles son las implicancias de estos resultados sobre el problema práctico del desarrollo de una cepa con "autosexado genético" para mejorar la técnica de la liberación de insectos estériles como método de control de la mosca del Mediterráneo, plaga de los frutales. En este sentido puede afirmarse que la baja tasa de recombinación de caracteres observada en los machos no representa un serio obstáculo para la estabilidad del sistema autosexante: es posible predecir mediante un modelo de simulación que con una tasa de recombinación masculina del 0,1% se necesitarían 63 generaciones para encontrar un 5% de hembras tipo salvaje contaminando la cepa (Rösler 1985). Por otra parte la estabilidad observada en el curso de la presente investigación en las líneas portadoras de la traslocación T5038 corroboran dicha predicción en forma elocuente.

En segundo lugar corresponde evaluar los resultados desde el punto de vista biológico. Frente a la rareza del evento de recombinación masculina demostrado fehacientemente en este trabajo y su aparente constancia en C. capitata cabe preguntarse ¿De qué naturaleza es este fenómeno?, ¿Es acaso el producto de un evento de recombinación semejante al que ocurre en la hembra, solo que regulado a mucha más baja frecuencia, o en realidad se trata de un fenómeno de otra naturaleza? Por otra parte cabe también preguntarse ¿Este raro evento cumple algún papel adaptativo o más bien se trata de una falla o escape de un sistema cuasi perfecto destinado a eliminar la recombinación en uno de los sexos por alguna razón evolutiva?

Considerando el problema de la supresión de la recombinación en un sexo, desde el punto de vista teórico sabemos que en una población donde exista "desequilibrio de ligamiento" o "desequilibrio gamético", éste irá decayendo con el tiempo por acción de la recombinación. Muy simples consideraciones llevan a la conclusión de que en organismos donde la recombinación ocurre en un solo sexo, la aproximación al equilibrio será la mitad de rápida que en organismos donde la recombinación ocurre en ambos sexos (Hedrick 1983). Tal vez en esta línea de pensamiento se ha postulado que la supresión de la recombinación en un sexo cumple la función de reducir la "carga de recombinación" (Ebinuma 1987); este último autor propone además, siguiendo a Darlington, el

concepto de "herencia de dos vías": el sexo heterogamético se asociaría con la estabilidad y la apreciación selectiva, y el homogamético, con la variabilidad. Sin embargo ésta no pasa de ser aparentemente una mera descripción del fenómeno.

Nei (1969) ha sido quien más ha elaborado este fenómeno desde el punto de vista teórico; su hipótesis es que la ausencia de recombinación en el sexo heterogamético ha evolucionado como consecuencia de la aparición de los cromosomas sexuales. En organismos como la levadura y Neurospora, razona Nei, el sexo está determinado por un solo gen, pero en organismos superiores, donde se requiere de muchos genes para la determinación completa del sexo es esencial que estos genes se hereden como una unidad, lo cual requiere de la inhibición de la recombinación entre los cromosomas sexuales. Esto puede lograrse por medio de inversiones cromosómicas o bien por acción de los propios genes que controlan el proceso de la recombinación, los cuales afectan por igual tanto a los cromosomas sexuales como a los autosomas. Si bien se conocen ejemplos de lo primero en Chironomus, concluye este autor, la regla parece haber sido la evolución hacia el segundo mecanismo como en Drosophila y B. mori. Recientes descubrimientos han revelado una tercera posibilidad explotada por los vertebrados: un sistema de control localizado. Se ha visto que existen dos regiones en el par de cromosomas sexuales (XY en machos de mamíferos, ZW en hembras de aves). En una corta región telomérica los cromosomas del sexo heterogamético comparten homología, se aparean, presentan nódulos de recombinación y consecuentemente, los marcadores genéticos ubicados allí recombinan. En el resto del cromosoma sucede exactamente lo contrario, y es justamente en esta última región donde se localizan los determinantes sexuales; por lo tanto estos genes no pueden recombinar excepto en rarísimos casos anómalos (ver revisiones en Roberts, 1988 y Solari, 1989). Al menos en mamíferos la especialización de los cromosomas X e Y parece haber ocurrido en forma gradual a partir de un par homomórfico ancestral (Marshall Graves, 1987).

Volviendo a los insectos, una prueba adicional en favor de la hipótesis de Nei surge al considerar que en especies en las que el sexo está determinado por un solo gen, no aparecen cromosomas sexuales diferenciados y además se verifica libre recombinación en ambos sexos (por ejemplo en mosquitos como Culex, Aedes, etc.). La hipótesis de Nei puede convertirse en una interesante predicción

dando vuelta la implicancia: debería esperarse que todo organismo en el cual el sexo heterogamético presente tasas muy reducidas de recombinación posea dos o más genes determinante del sexo ubicados sobre el cromosoma sexual. Si esto es cierto debería ser posible predecir la existencia de otros genes determinantes del sexo en Ceratitis capitata, además del factor masculinizante (Lifschitz y Cladera 1989) ubicado en el brazo corto del cromosoma Y.

En el caso del macho de Drosophila melanogaster, la recombinación no es producida por un mecanismo de tipo "general" semejante al de la hembra, sino más bien por uno del tipo llamado recombinación "específica de lugar", por lo que en esta especie la supresión de la recombinación general en el macho parece ser eficiente en un 100%.

No existe información equivalente sobre la hembra de Bombyx mori, pero la extremada rareza del fenómeno espontáneo, que es dos órdenes de magnitud menor que en la mosca del vinagre, nos inclinan a pensar nuevamente en una explicación para el mismo que no pasa por el mecanismo de la recombinación general. (Tener en cuenta además la ausencia de nódulos de recombinación que ya fue mencionada antes).

Por fin, y pese a la frecuencia relativamente mayor del fenómeno en Drosophila ananassae, el hecho de que se reporten niveles variables de recombinación en machos de diferentes cepas no parece argumentar en favor de una recombinación regular como la de la hembra. Incluso la asociación de este fenómeno con distorsiones de la segregación (Mukherjee y Das 1971) y más recientemente con genes hipermutables (Tobari y Moriwaki 1983, aunque ver también Hinton 1983), inclinarían más bien a emparentarlo con la disgenesia mencionada más arriba para D. melanogaster.

También en el caso de la especie que nos ocupa debemos postular que la extremada rareza del fenómeno reportado en este trabajo ($1,1 \times 10^{-3}$) argumenta en favor de un mecanismo de recombinación en el macho de Ceratitis capitata que debe ser de una naturaleza diferente al que se verifica regularmente en la hembra de la propia especie. A la pregunta sobre si este raro evento de recombinación en el macho está causado por la movilización de un trasposón, o si se trata de algún fenómeno similar a la recombinación ilegítima, aún no estamos en condiciones de responderla. Sin embargo debemos hacer notar una diferencia clara con la disgenesia unidireccional observada en la mosca del vinagre: en

Ceratitis capitata la recombinación masculina se ha probado bidireccional (no observándose diferencias entre los cruzamientos directos y recíprocos; Tabla VI. 3). Tampoco fue posible demostrar alguna heredabilidad del fenómeno (no hubo diferencia entre los individuos con y sin un caso de recombinación masculina en la generación previa, Tabla VI. 5). Por último, parece interesante la posibilidad insinuada aquí de que existan dos niveles de frecuencia (Tabla VI.6) cuyos valores estimados serían $1,3 \times 10^{-3}$ y $4,2 \times 10^{-4}$, aunque no puede descartarse la alternativa de que esto se deba a un artificio exagerado aún más por el agrupamiento "a posteriori" de los datos.

Se podría considerar la posibilidad de la "conversión génica" como explicación de estos raros eventos. Según el conocimiento actual, la conversión génica se verifica en estrecha vinculación con el fenómeno de recombinación general (ver Introducción). Uno de los ejemplos mejor estudiados de conversión génica en organismos superiores es el del locus **rosy** que afecta a la deshidrogenasa de la xantina (XDH) en Drosophila melanogaster. La falta de actividad de dicha enzima en esta especie produce letalidad de los homocigotas mutantes en un medio suplementado con purina. En este medio solo individuos tipo salvaje sobreviven y entre la progenie de un individuo heterocigótico (por ejemplo **ry⁴¹/ry⁶**) solo podría originarse un individuo salvaje por recombinación intragénica o por conversión génica. Dicho individuo será recuperado como único sobreviviente en un medio selectivo, y su condición de recombinante o convertido se comprueba con la ayuda de marcadores laterales: si conserva ambos, es una conversión, si conserva solo uno entonces es el producto de una recombinación. En el caso concreto que nos ocupa resulta difícil reconciliar la hipótesis de la conversión génica con los cuatro individuos recombinantes para dos marcadores (**dd** y **sw**), y no recombinantes para otros dos (**lp** y **sexo**) que aparecen en la Tabla VII.3.

Debe mencionarse también una explicación de la recombinación masculina observada en varios dípteros superiores que esta ganando aceptación entre los especialistas. La idea es que no se trataría en este caso de eventos ocurridos durante la meiosis sino que sería más bien el producto de un evento de recombinación somática o mitótica que ocurriría premeiòticamente en la línea celular que luego originaría las gonias (Gethmann 1988). Una consecuencia genética predecible bajo esta hipótesis sería el

agrupamiento ("clustering") de los productos de recombinación. No se han observado indicios de ello en los datos presentados aquí.

Si es que una conclusión final puede extraerse de los ejemplos mencionados, ésta es que los mecanismos destinados a controlar o suprimir la recombinación en un sexo en diversos insectos parecen haber evolucionado por separado en cada especie; por ello es más conveniente estudiar dichos mecanismos en cada especie sin atarse demasiado a moldes previos. No obstante ello, un cierto patrón general parece indicar que los mecanismos evolucionados para suprimir la recombinación general no resultan eficaces para evitar que se verifiquen raros (o no tan raros) casos de recombinación del tipo específica de lugar, o bien de origen premeiòtico.

A la luz de estos hechos, y de su escaso impacto en la población la cuestión sobre el valor adaptativo para estas "excepciones" aparece de menor relevancia frente al papel que puede desempeñar en las poblaciones la supresión de la recombinación en un sexo como tal. Ya sea que se le asigne el rol de mantener ligados genes determinantes sexuales (Nei 1969) o el de reducir la "carga por recombinación" (Ebinuma 1987), dicha supresión parece importante desde el punto de vista evolutivo y debe encontrarse una explicación para ella. Nos inclinamos por la primera hipótesis y en este contexto surge la siguiente explicación: aunque los insectos no son el único grupo que presentan este fenómeno, la supresión de la recombinación en el sexo heterogamético ha sido reportada tan solo en invertebrados. Se podría concluir que esto se debe a que en los vertebrados existen mecanismos capaces de limitar la represión de la recombinación a una región especializada dentro del par de cromosomas sexuales que hacen innecesaria la supresión de la recombinación en el genoma completo. En ausencia de esta especialización la represión de la recombinación en todo el genoma sería la alta alternativa obligada cuando una especie debe mantener ligados dos o más genes determinantes sexuales. Sin embargo, un reciente informe sobre modificadores de acción localizada en B. mori (Ebinuma 1987), de ser confirmado, aportaría una prueba en contra de esta idea.

Este campo ofrece todavía un amplio horizonte para la especulación teórica y para la investigación genética tanto por los métodos clásicos como moleculares, y no cabe duda que la diversidad desplegada por los insectos provee unos materiales excelentes para el estudio del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento en primer lugar al Ing. Favret por su apoyo incondicional a èste proyecto y por una direcciòn de tesis plena de calidez, y no por ello exenta de los necesarios acicates, ni de una rigurosa discusiòn de los resultados.

Ademàs quiero expresar mi deuda de gratitud con Fanny Manso y Ernesto Lifschitz, no solo por proporcionar los materiales y las facilidades, sino especialmente por su aliento incansable y por su generosa ayuda durante la realizaciòn de los experimentos.

Agradezco tambièn a la Directora del Instituto, Rut Solari, por su apoyo material y espiritual, al Sr. Civitillo por su experimentada ayuda durante la toma de las fotografias, al Sr. Campagno por su minucioso auxilio tècnico, a Edith Garcia y a Jovita Avalos por tipear el original con diligencia y paciencia infinitas, a Adriana Fuica y Horacio Guitou por ayudarme gentilmente con el procesamiento del texto, a Daniel Fontagnol por el diseño de la portada, a Esteban Hopp, Enrique Suàrez, Alberto Prina, Daniel Diaz, y a los investigadores del Instituto de Genètica en su conjunto por su lectura, sus críticas, y sus valiosas sugerencias para mejorar la presentaciòn.

Mi gratitud llegue tambièn a mi Consejero de estudios, Prof. Juan Hunziker, a cuya fidelidad y perseverancia debo en gran medida haber completado finalmente mi doctorado.

DEDICADORIA

Dedico este trabajo a mis seres màs queridos: a Julia, la compañera y la amiga, a Jorge Luis y Gonzalo, mi alegría de vivir, y a mis padres, quienes sacrificaron su salud y su juventud en aras de mi educaciòn.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. "Biología Molecular de la célula" (1986). Ed. Omega.
- Ayala, F.J. (1977). "Nothing in biology makes sense except in the light of evolution." *J. Heredity* 68:3-10.
- Baker B.S. and Carpenter, A.T.C. (1972). Genetic analysis of sex chromosomal meiotic mutants in Drosophila melanogaster. *Genetics* 71: 255.
- Bernstein, H., Byerly, H.C., Hopf, F.A., Michod, R.E. (1985). Genetic damage, mutation and the evolution of sex. *Science* 229:1277-1280.
- Burt, A. y Bell, G. (1987). Mammalian chiasma frequencies as a test of two theories of recombination. *Nature* 326:803-805. Sus réplicas: *Nature* 330:116-118 y *Nature* 331:491-492.
- Busch-Petersen, E. (1989). Male recombination in a genetic sexing strain of Ceratitis capitata and its effects on stability. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82(6): 778-784.
- Busch-Petersen, E., Southern, D.I. (1987). Induced suppression of genetic recombination in females of the Mediterranean fruit fly by translocation heterozygosity. *Genetica* 72:161-169.
- Carpenter A.T.C. (1979). Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination defective females of Drosophila melanogaster. *Chromosoma* 75: 259-92.
- Carpenter A.T.C. (1982). Mismatch repair, gene conversion, and crossing over in two recombination-defective mutants of Drosophila melanogaster. *P.N.A.S.U.S.A.* 79: 5961-65.
- Carpenter A.T.C. (1984). Meiotic roles of crossing over and of gene conversion. *C.S.H.S.Q.B. XLIX. Recombination at the DNA level*, pp. 23-29.
- Carpenter A.T.C. (1987). Gene conversion, recombination nodules, and the initiation of meiotic synapsis. *Bio Essays*, vol. 6, N° 5, pp. 232-236.
- Cavichi S. 1972. Selección for larval developmental rate in Ceratitis capitata. *Boll. Zool* 38: 327-335
- Cavichi S. 1973. An orbital bristle mutant in Ceratitis capitata. *Genetica Agraria* 27: 204-208.
- Cavichi S. y Bellettini S. 1973. Genetic polymorphism of puparium color en Ceratitis capitata. *Monitore Zool. Ital. (N.S.)* 7: 135-149.
- Cladera, J.L. (1981a). Genética de alozimas en Ceratitis capitata. Dos alelos de la esterasa pupal. *Mendeliana* 5(1):33-38.
- Cladera, J.L. (1981b). Absence of recombination in the male of Ceratitis capitata. *Experientia* 37:342.
- Cladera J.L. (1989). Viabilidad de cigotas desbalanceadas portadoras de marcadores genéticos en Ceratitis capitata. XX Congr. Argent. de Genética. Bahía Blanca, Argentina.
- Cladera J.L. (1990) A major gene controlling developmental rate (En preparación).
- Cladera, J.L., Lifschitz, E. y Manso, F. (1987). New evidence in the problem of recombination in Ceratitis capitata males. A pupal marker and the effect of an altered Y-chromosome. *Genet. Agrar.* 41:57-70.
- Cladera, J.L., Manso, F.C. (1988). The limit of tolerance to heat pulses during embryogénesis in Ceratitis capitata. *Insect Sci. Applic.* 9:61-67.
- Clark S.H., Hilliker, A.J. and Chormick, A. (1988). Recombination can initiate and terminate at a large number of sites within the rosy locus of Drosophila melanogaster. *Genetics* 118: 261-266.
- Clarke, C.A., y Sheppard, P.M. (1971). Further studies on the genetics

- of the mimetic butterfly Papilio memnon L. Phil. Trans. Roy. Soc. London. B263:35-70.
- Clarke, C.A., Sheppard, P.M. (1977). A new tailed female form of Papilio memnon L. and its probable genetic control. Syst. Entomol. 2:17-19.
- Cooper, K.W. (1949). The cytogenetics of meiosis in Drosophila. Mitotic and meiotic autosomal chiasmata without crossing-over in the male. Jour. Morph. 84:81-122.
- Creighton, H.B. y McClintock, B. (1931). A correlation of cytological and genetical crossing-over in Zea mays. Proc. Nat. Acad. Scien. USA, 17:485-497.
- Crow, J.F. y Kimura, M. (1979). Efficiency of truncation selection. Proc. N.A. Sci. USA, 76:396-399.
- Curtis, C.F., Southern, D.I., Pell, P.E., Claig-Cameron, T.A. (1972). Chromosome translocations in Glossinia austendi. Genet. Res., Camb. 20:101-113, ver pag. 110.
- Charlesworth, B., y Charlesworth, D., (1985). Genetic variation in recombination in Drosophila. II Genetic analysis of a high recombination stock. Heredity 54:85-98.
- Darlington, C.D. (1930). A cytological demonstration of "genetic" crossing over. Proc. Roy. Soc. B. 107:50-59.
- Deweese, A.A. (1967). Sex differences in recombination values for linkage group V of T. castaneum. Tribolium Inform. Bull. 10:89-90.
- Deweese, A.A. (1975). Genetic modification of recombination rate in Tribolium castaneum. Genetics 81:537-552.
- Dresser, M.E. (1987). The synaptonemal complex and meiosis, in: Moens, P.B. ed. "Meiosis". Academic Press.
- Dunn, L.C., y Bennet, D. (1967). Sex differences in recombination of linked genes in animals. Genet. Res. 9:211-220.
- Ebinuma, H. (1987). Selective recombination system in Bombyx mori. I. Chromosome specificity of the modification effect. Genetics 117:521-531.
- Exley, K.A. y Eggleston, P. (1989). Structure, frequency and distribution of P elements in relation to P-M hybrid dysgenic male recombination in Drosophila melanogaster. Gen. Res. 53:163-171.
- Feldman, M.W., Christiansen, F.B., y Brooks, L.D. (1980). Evolution of recombination in a constant environment. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77:4838-4841.
- Finnerty, V. (1976). Gene conversion in Drosophila, in: Ashburner M. and E. Novitsky eds. "The Genetics and Biology of Drosophila". Academic Press.
- Fisher, R.A. (1958). "The genetical theory of natural selection". 2nd editon. Dover Publications Inc., New York.
- Fitz-Earle, M., Holm, D.G. (1983). Drosophila melanogaster models for the control of insect pests. In Ashburner, M. Carson, H.L., Thompson, J.N., "The Genetics and Biology of Drosophila" Vol. 3C., Academic Press, ver pag. 411.
- Foster, G.G., Maden, R.H., Miles, A.T. (1980). Genetic instability in mass-rearing colonies of a sex-linked translocation strain of Lucilia cuprina. Theor. Appl. Genet. 58:169-175.
- Franca, Z.M. DaCunha, A.B. y Garrido, C. (1968). Recombination in Drosophila willistoni. Heredity 23:199-204.
- Gethmann R.C. Crossing over in males of higher Diptera. J. Heredity 79: 344-350.
- González G.P. y Solari A.J. 1981. Localización de heterocromatina constitutiva en los cromosomas de Ceratitis capitata. X Congreso Latinoamericano de Genética, Viña del Mar, Chile.
- Grell, R.F., Bank, H., Gassner, G. (1972). Meiotic exchange without

- the synaptonemal complex. *Nature New Biol.* 240:155-157.
- Grindley N.D.F. y Reed R.R. (1985). Transpositional recombination in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 863-896.
- Hasimoto, H. (1957). The study of crossing over between Striped and Yellow in the silkworm (en japonès). *Sanshi Kenkyu* 20:10-11.
- Hastings P.J. (1987)a. Meiotic recombination interpreted as heteroduplex correction, in: Moens, P.B. ed. "Meiosis" Academic Press.
- Hastings P.J. (1987)b. Models of heteroduplex formation, in: Moens, P.B. ed. "Meiosis". Academic Press.
- Hedrick, P.W. (1983). "Genetics of populations". Science Books International, Boston.
- Heemert C. van, Vosselman, L. (1979). A male-linked translocation with high fertility in the onion fly Hylemya antiqua. *Genetica* 51(2):111-114
- Hinton C.W. 1983. Relations between factors controlling crossing-over and mutability in males of Drosophila ananassae. *Genetics* 104: 95-112.
- Hinton, C.W., Downs, J.E. (1975). The mitotic, polytene, and meiotic chromosomes of Drosophila ananassae. *J. Heredity* 66:353-361.
- Hiraizumi, Y. (1971). Spontaneous recombination in Drosophila melanogaster. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:268-270.
- Huettnner, A. (1930). The spermatogenesis of Drosophila melanogaster. *Z. Zellforsch.* 11-615-637.
- Kastenbaum, M.A. y Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research* 9:527-549.
- Kidwell, M.G. (1972). Genetic change of recombination value in Drosophila melanogaster. I. Artificial selection for high and low recombination-modifying genes. *Genetics* 70:419-432.
- Kikkawa, H. (1935). Crossing-over in the male of Drosophila virilis. *Cytologia* 6:190-194.
- Kikkawa, H. (1937). Spontaneous crossing-over in the male of Drosophila ananassae. *Zool. Mag. Tokyo* 49:159-160.
- Kimura, M. (1956). A model of a genetic system which leads to closer linkage by natural selection. *Evolution* 10:278-287.
- Kirkpatrick, M., y Jenkins, Ch. D. (1989). Genetic segregation and the maintenance of sexual reproduction. *Nature* 339:300-301.
- Kondrashov, A.S. (1984). Deleterious mutations as an evolutionary factor. I. The advantage of recombination. *Genet. Res. Camb.* 44:199-217.
- Kucherlapati, R. y Smith, G.R. (1988) eds. "Genetic Recombination". American Society for Microbiology. Revisado por Symonds, N. (1989) An abundance of analysis. *T.I.G.* 5(6):197
- Lacy, R.C. (1980). The evolution of ensociality in termites: a haplodiploid analogy?. *Am. Nat.* 116:449-451.
- Leinaas, H.P. (1983). A haplodiploid analogy in the evolution of termite sociality? Reply to Lacy. *Am. Nat.* 121:302-304.
- Lifschitz, E. (1985). New mutations in the Medfly (Ceratitidis capitata). Rep. Res. Coord. Meet. on Devel. Sexing Mechan. in Fruit Flies. 15-19 July 1985, Vienna, Austria join FAO/IAEA Division (Mimeografiado).
- Lifschitz, E. y Cladera, J.L. (1989). Ceratitidis capitata. Cytogenetics and sex determination. In Robinson, A.S. and Hooper, G. (editors) "Fruit flies, Their Biology, Natural Enemies and Control". Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Lumme J., Lankiner, P. (1981). Close to equal crossing-over in males and females in Drosophila littorales. *Hereditas* 94: 285-286.
- Manso, F., Cladera, J.L., y Lifschitz, E. (1986). Screening for a sex limited temperature-sensitive lethal mutation induced on a Y-autosome translocated strain in Ceratitidis capitata. In

- Econompoulos, A.P. (editor) 1987. "Fruit flies. Proc. II Int. Symp" Elsevier Sc. Pub. Co.
- Manso F. y Lifschitz E. 1979. Two morphological mutations found in the Mediterranean fruitfly Ceratitidis capitata. Bol.Gen.Inst.-Fitotec.10: 31-32.
- Marshall Graves, J.A. (1987). The evolution of mammalian sex chromosomes and dosage compensation: clues from marsupials and monotremes. T.I.G. 3(9):252-256.
- Matsuda M., Imai, H.T., Tobari Y.N. (1983). Cytogenetic analysis of recombination in males of Drosophila ananassae. Chromosoma 88: 286-292.
- Maynard Smith, J. (1977). Why the genome does not congeal. Nature 268:693-696.
- Mendes L.O.T. 1958. Observacoes citologicas em "Moscas das frutas". Bragantia 17 (Nota No 7): XXIX-XL.
- Meselson M.S. and Radding C.R. (1975). A general model for genetic recombination. P.N.A.S.U.S.A. 72: 358-361.
- Meyer, G.F. (1960). The fine structure of spermatocyte nuclei of Drosophila melanogaster. En "Proc. Eur. Reg. Conf. Electron Microscopy, Delf" Houwink, A.L. y Spit, B.J. editors. pp. 951-954
- Miya, K., Kurihara, M. y Tanimura, J. (1970). Electron microscope studies on the oogenesis of the silkworm Bombyx mori. J. Fac. Agric. Iwate Univ. 10:59-83.
- Morgan, T.H. (1912) Complete linkage in the second chromosome of the male Drosophila. Science 36:719-720.
- Moriwaki, D. (1935). A preliminary experiment on crossing-over in the female of Bombyx mori. Proc. Imp. Acad. (Tokyo) 11:242.
- Moriwaki, D. (1937). A high ratio of crossing-over in Drosophila ananassae. Z. Indukt, Abstammungs-Vererbungsl. 74:17-23.
- Moriwaki, D. y Tobari, Y.N. (1975). Drosophila ananassae. Capitulo 19 en "Handbook of Genetics" Vol. 3., editor King, R.E. Plenum Press.
- Moriwaki, D., Tsujita, M. (1974). Synaptonemal complex and male crossing-over in Drosophila ananassae. Cytologia 39:829-838.
- Mukherjee, A.S. y Das, A.K. (1971). Segregation distortion and crossing-over in males of Drosophila annassae. Genetics 67:521-532.
- Murakami, A. (1976). X-ray-induced recombination during oogenesis in the silkworm Bombyx mori L.). Rad. and Environm. Biophys. 13:187-195.
- Nei, M. (1969). Linkage modification and sex differences in recombination. Genetics 63:681-699.
- Paterson, J.T. y Suche, M.L. (1934). Crossin-over induced by x-ray in Drosophila males. Genetics 10:223-236.
- Phillips, V. (1944). Crossing over in the males of Drosophila subobscura. Nature 153:223.
- Radu M., Rossler Y. y Koltin Y. 1975. The chromosomes of the Mediterranean fruitfly Ceratitidis capitata. Karyotype and chromosomal organization. Cytologia 40: 823-828.
- Roberts, L. (1988). Zeroing in on the sex switch. Science 239:21-23.
- Robinson, A.S. (1984). Unexpected segregation ratios from male-linked translocations in the Mediterranean fruitfly. Genetica 62:209-215.
- Robinson, A.S., y Heemert, C. van (1982). Ceratitidis capitata a suitable case for genetic sexing. Genetica 58:229-237.
- Rosler Y. (1979a). The genetics of the Mediterranean fruitfly: a "white pupae" mutant. Ann.Entomol.Soc. Am. 72: 583-585.
- Rosler, Y. (1979b). Automated sexing of Ceratitidis capitata: The development of strains with inherited sex-limited pupal color dimorphism. Entomophaga 24:411-416.

- Rossler, Y. (1981) Genetic sexing of insects by phenotypic characteristics, with special reference to the Mediterranean fruit fly. In "Sterile Insect Technique and Radiation in Insect Control". Proc. Symp. Neuherberg, IAEA, Vienna, pàg. 297.
- Rossler, Y. (1982a) Genetic recombination in males of the Mediterranean fruit fly, and its relation to automated sexing methods. Ann. Entomol. Soc. Am. 75:28-31.
- Rossler, Y. (1982b) Recombination in males and females of the Mediterranean fruit fly with and without chromosomal aberrations. Ann. Entomol. Soc. Am. 75:619-622.
- Rossler, Y. (1985). Effect of genetic recombination in males of the Mediterranean fruitfly on the integrity of "genetic sexing" strains produced for sterile-insect releases. Ann. Entomol. Soc. Amer. 78:265-270.
- Rossler, Y y Koltin Y. 1976. The genetics of the Mediterranean fruitfly Ceratitidis capitata. Three morphological mutations. Ann. Entomol. Soc. Amer. 69: 604-608.
- Rowell, D.M. (1985). Complex sex-linked translocation heterozygosity and its role in the evolution of social behaviour. Can. J. Genet. Cytol. 28:168-170.
- Sakai, R.K., Baker, R.H., Mian, A., (1972). Linkage group-chromosome correlation in a mosquito. Jour. Hered. 62:90-100, ver pag.95.
- Saul, S.H., Rossler, Y. (1984). Sparkling eye trait and the dc locus in the Mediterranean Fruit Fly. Ann. Entomol. Soc. Am. 77:561-563.
- Sharp J.L. y Chambers D.L. 1973. A white-eyed mutant of the Mediterranean fruit fly. J.Econ.Entomol.66: 560-561.
- Singh, B.N. (1985). Drosophila ananassae - a genetically unique species. Nucleus 28:169-176.
- Singh, B.N. y Singh, A.K. (1988). Crossing over between linked inversions in Drosophila ananassae. Hereditas 109:15-19.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1969) "Biometry". Freeman and Co. San Francisco.
- Sokoloff, A. (1964). Sex and crossing over in Tribolium castaneum. Genetics 50:491-496.
- Solari, A.J. (1989). Sobre machos y hembras. Ciencia Hoy 1(3):8-10.
- Southern D.I.1976. Cytogenetics observation in Ceratitidis capitata. Experimentia 32: 20-22.
- Stahl F.W. (1987). Genetic recombination. Sc.Amr. 256(2): 52-63.
- Steffens, R.J. (1983). Methodology of translocation production and stability of translocations in the Mediterranean fruit fly. Z. ang. Ent. 95:181-188.
- Stern, C. (1931). Zytologisch-genetische untersuchungen als Beweise fur die Morgansche Theorie des Faktorenaustanschs. Biologisches Zentralblatt 51:547-587.
- Strickberger, M.W. (1968). "Genetics". The Macmillan Co. New York.pag. 498.
- Sturtevant, A.H. (1915). No crossing-over in the female silkworm moth. Amer. Natur. 49:42-44.
- Tanda, S., Shrimpton A.E., Hinton, C.W. y Langley Ch.H. Analysis of the Om (1D) locus in Drosophila ananassae. Genetics 123: 495-502.
- Teràn, H. (1977). Comportamiento alimentario y su correlaciòn a la reproducciòn en hembras de Ceratitidis capitatis. Rev. Agron. N.O. Argentino 14:17-34.
- Tobari, Y., Moriwaki, D. (1983). Positive correlation between male recombination and Minute mutation frequencies in Drosophila ananassae. Jpn.J.Genet. 58: 159-163.
- Turner, J.R.G. (1967). Why does the genotype not congeal?. Evolution 21:645-656.
- Turner, J.R.G. (1979). Genetic control of recombination in the silkworm. I. Multigenic control of chromosome 2. Heredity

43:273-293.

- Ved Brat, S., y Rai, K.S. (1974). Duplication deficiency heterozygotes in Aedes aegypti. *Heredity* 32(2):225-230.
- Von Wettstein, D., Rasmussen, S.W. y Holm, P.B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann. Rev. Genet.* 18:331-413.
- Vosselman, L., Heemet, C. van. (1980). Meiotic disjunction and embryonic lethality in sex-linked double traslocation heterozygous males of the onion fly. *Theor. Appl.Genet.* 58:161-167, ver pag. 164.
- Wappner P., Manso F.C., Lifschitz, E. y Cladera J.L. (1987). Relaciones alélicas y de ligamiento entre mutaciones que afectan la pigmentación cuticular en Ceratitis capitata. XVIII Congr.Argent.Genetica, U.C.A., Buenos Aires, Argentina.
- Woodruff, R.C. y Bortolozzi, J. (1976). Spontaneous recombination in males of Drosophila simulans. *Heredity* 37:295-298.