

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**BASE GENÉTICA DE LA INVIABILIDAD EN HÍBRIDOS
DE LAS ESPECIES GEMELAS DROSOPHILA *koepferae*
Y DROSOPHILA *buzzatii***

ANTONIO CARVAJAL RODRÍGUEZ
A CORUÑA, MAYO DE 1999

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Base genética de la inviabilidad en híbridos de las especies gemelas *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii*

MEMORIA que para optar al grado de

Doctor en Biología presenta

Antonio Carvajal Rodríguez

A Coruña, Mayo de 1999

HORACIO NAVEIRA FACHAL, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Informa:

Que el trabajo titulado **Base genética de la inviabilidad en híbridos de las especies gemelas *Drosophila koepferae* y *Drosophila buzzatii***, que para la obtención del grado de Doctor presenta D. Antonio Carvajal Rodríguez, fue realizado bajo su dirección, que lo considera concluido y que autoriza su presentación al tribunal calificador.

A Coruña a 3 de Mayo de 1999.



Dr. Horacio Naveira Fachal

A mi familia

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Horacio Naveira Fachal que me brindó la oportunidad de realizar este trabajo. Además compartió siempre conmigo sus conocimientos y su tiempo para dirigir, plantear, analizar y discutir. Por todo ello mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. J. A. Edstrom de la Universidad de Lund en Suecia el cual posibilitó la realización de la microdissección. También a Carlos, Casimiro y J. Yañez que constituyen los mejores recuerdos de aquella estancia.

A la Universidad Autónoma de Barcelona que amablemente cedió muchas de las cepas de *Drosophila* utilizadas en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio durante tantos años, Xulio Maside y José Barral, con los cuales compartí no sólo los conocimientos sino una infinidad de buenos momentos. A Manuel que compartió parte de este trabajo y que fue también un amigo. A José Antonio, Xavi y todos los compañeros y compañeras de Santiago. También a Luis Rodríguez de "genética 2" y compañeiro de *in situs*.

Al Dr. Gonzalo Álvarez Jurado: él fue una de las personas que provocó en mí deseos de saber más sobre la base genética de la evolución.

También al Dr. Emilio Valadé presente en muchos de nuestros seminarios, compartiendo sus conocimientos y escuchando.

A todos y cada uno de mis compañeros y compañeras aquí en Coruña: A Elvira cuya verdadera amistad contrasté en los momentos más complicados. A Carlos, por lo mismo. Como no, a "Yulius" siempre tan amante de la ciencia y generoso. A mis compañeras de la "otra genética" Anita (y su amiga Chelo), Ruth y Sé. A Ana Rifón, a Silvia y a Luis. Todas ellas y ellos hicieron de los viernes un día especial.

A Eva por compartir tantos momentos de convivencia y aguantarme durante este último curso.

Finalmente a Delia que me dió tanto y a mi familia sin cuyo apoyo constante este trabajo no hubiera tenido lugar.

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de investigación:

XUGA-20006A91 Xunta de Galicia.

PB92-0386 DGICYT Ministerio de Educación y Ciencia.

XUGA-10305B95 Xunta de Galicia.

Además yo disfruté de las siguientes becas:

Una beca de la Universidad de Santiago de Compostela para estancias en el extranjero en el año 1993.

Una beca de viaje de la Universidad de A Coruña en 1994.

Ayuda predoctoral de la Universidad de A Coruña concedida en el curso 1994-95.

Una beca de viaje de la Universidad de A Coruña en 1996.

Beca Postdoctoral de la Universidad de A Coruña durante el curso 96-97.

Una beca de viaje de la Universidad de A Coruña en 1997

Beca Postdoctoral de la Universidad de A Coruña durante el curso 97-98.

ÍNDICE:

1- INTRODUCCIÓN

1.1- ACERCA DE LA BASE GENÉTICA DEL CAMBIO EVOLUTIVO	3
1.2- LA GENÉTICA DE LA ESPECIACIÓN	6
1.3- EL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO	12
1.4- BASE GENÉTICA DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO POSTZIGÓTICO EN ANIMALES	14
1.4.1- La regla de Haldane y el efecto del cromosoma X	14
1.4.2- Modelos generales de aislamiento reproductivo postzigótico	15
1.4.3- La inviabilidad híbrida	18
1.4.4- Los genes reguladores	20
1.5- UN BREVE APUNTE FINAL SOBRE LA TEORÍA DE SISTEMAS DINÁMICOS (O SISTÉMICA) Y LA EVOLUCIÓN	23
1.5.1- El concepto de evolución como proceso irreversible en el tiempo	23
1.5.2- La evolución y el nuevo enfoque de la física	25
1.5.3- La perspectiva sistémica de la vida y la evolución	26
1.6- OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
1.6.1- Objetivos	27
1.6.2- Hipótesis y estrategia experimental	28

2- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- MATERIAL BIOLÓGICO: <i>D. BUZZATHI</i> Y <i>D. KOEPFERAE</i>	33
2.1.1- Localización geográfica y nicho trófico	33
2.1.2- Relación citológica y filogenia	33
2.1.3- Relación reproductiva	34
2.1.4- Descripción de las cepas de laboratorio utilizadas	34
2.2- CULTIVO DE <i>DROSOPHILA</i>	37
2.3- ANÁLISIS GENÉTICO	38
2.3.1- Localización de regiones de interés en los cromosomas politénicos	38
2.3.2- Estudio de los cromosomas politénicos	40

2.3.3- Puesta en homocigosis de una región cromosómica híbrida	43
2.3.4- Análisis de los machos híbridos inviables	45
2.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
2.4.1- Datos sin transformar	46
2.4.1.1- Análisis de frecuencias	46
2.4.1.2- Contraste de hipótesis relativas a la media de una población binomial.	
Muestras grandes.	49
2.4.1.3- Contraste secuencial de Bonferroni	50
2.4.1.4- Cálculo de la potencia en un contraste para una variable aleatoria	
binomial $B(n,p)$	51
2.4.2- Datos transformados. Transformación por la raíz cuadrada del arcoseno	52
2.4.3- Cadenas de Markov	53
2.4.3.1- Modelo de cadenas de Markov	54
2.4.3.2- Aplicación del modelo de cadenas de Markov a sistemas de letal-supresores	
dentro de las especies de <i>Drosophila</i>	57
2.4.4- La función generatriz de momentos. Cálculo de la varianza de $R_c = P_j/P_i$	59
2.5- ANÁLISIS MOLECULAR	61
2.5.1- Obtención de ADN para sonda	61
2.5.1.1- Extracción de ADN a partir de una mosca	61
2.5.1.2- Electroforesis de ADN en gel de agarosa	62
2.5.1.3- Amplificación por RCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	63
2.5.1.4- Ligación de ADN amplificado al vector pGEM-T	64
2.5.1.5- Transformación bacteriana	64
2.5.1.6- Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes	
(complementación- α)	65
2.5.1.7- Minipreparación de plásmido	67
2.5.1.8- Digestión de ADN con enzimas de restricción	68
2.5.1.9- Maxipreparación de plásmido	68
2.5.2- Hibridación <i>in situ</i> sobre cromosomas politénicos	70
2.5.2.1- Preparaciones de cromosomas politénicos	70
2.5.2.2- Marcaje de ADN con digoxigenina mediante la técnica de iniciación al azar	72
2.5.2.3- Marcaje de ADN con biotina mediante la técnica de traslado de mella	73

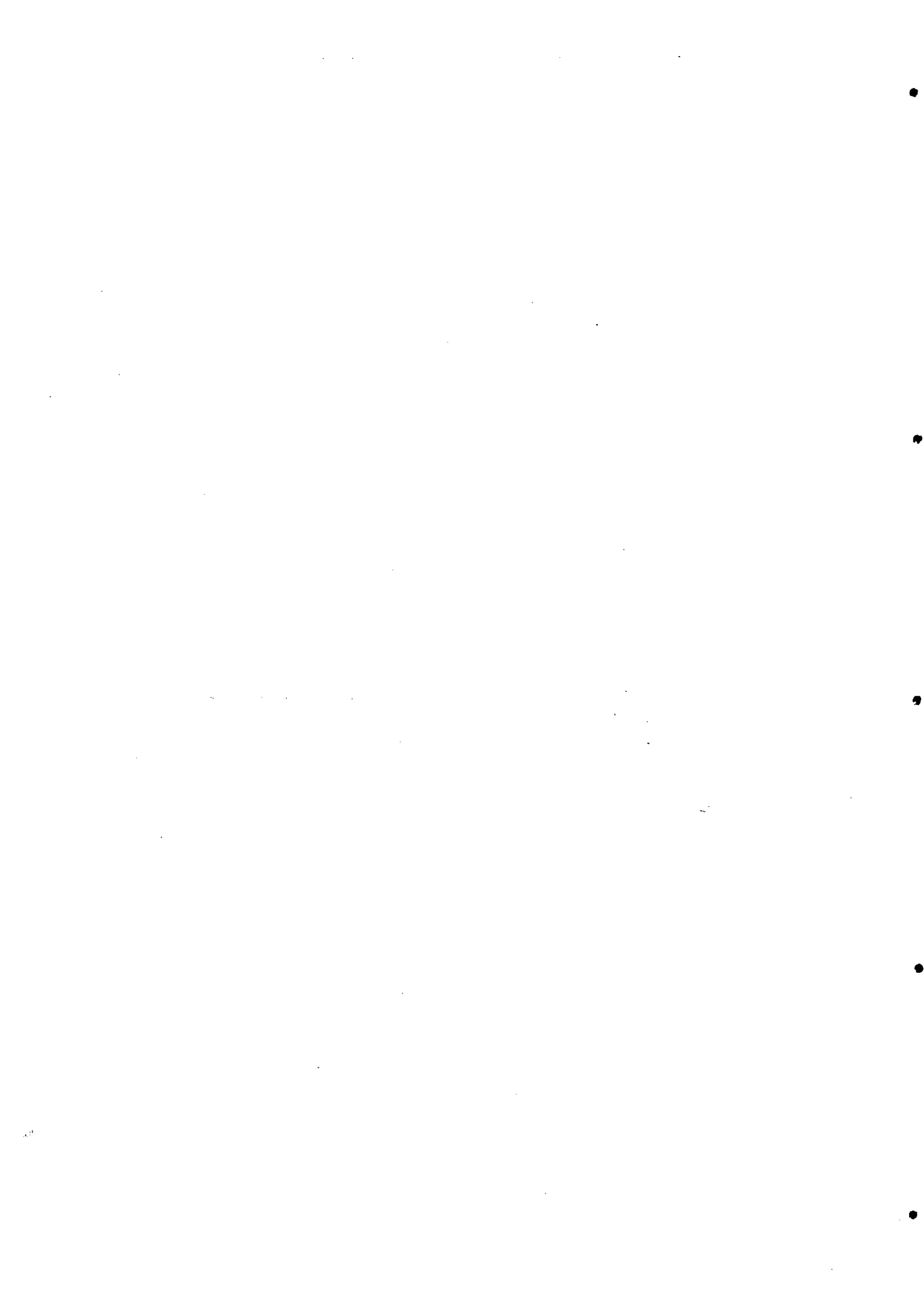
2.5.2.4- Desnaturalización de los cromosomas politénicos antes de la hibridación	75
2.5.2.5- Hibridación	76
2.5.2.6- Posthibridación (fosfatasa alcalina)	77
2.5.2.7- Posthibridación (peroxidasa)	78
2.5.3- Obtención de una microgenoteca de la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i>	80
2.5.3.1- Preparación de cromosomas politénicos para microdissección	80
2.5.3.2- Microdissección y microclonación de la región XA2a-A2c del cromosoma X politénico de <i>D. koepferae</i>	82
2.5.3.3- Recuperación de fagos con inserto	87
2.5.4- Hibridación de sondas de ADNc de <i>Broad-Complex</i> de <i>D. melanogaster</i> y ADNc obtenido a partir de ARNm de larvas de 3er estadio de <i>D. buzzatii</i> , sobre la microgenoteca del XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i> .	89
2.5.4.1- Transferencia del ADN de las colonias a membrana	89
2.5.4.2- Marcaje de la sonda de ADNc de <i>Broad-Complex</i> con P ³²	90
2.5.4.3- Síntesis de la sonda de ADNc marcada con P ³² a partir de ARNm de larvas de 3er estadio de <i>D. buzzatii</i>	92
2.5.4.4- Hibridación y detección	94
2.5.4.4.1- Sonda radiactiva	94
2.5.4.4.2- Sonda no radiactiva (biotina)	95
3- RESULTADOS	
3.1- LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE UN FACTOR DE INVIABILIDAD HÍBRIDA	99
3.1.1- Estudio de las generaciones F ₁ y R1 híbridas	99
3.1.1.1- Análisis de los datos sin transformar	103
3.1.1.2- Análisis de los datos transformados	106
3.1.2- Localización cromosómica de un factor perteneciente a un sistema de genes complementarios	108
3.1.2.1- Localización de un factor próximo al telómero: Estima de la frecuencia de recombinación con el locus <i>white</i>	108
3.1.3- Análisis de la fase de desarrollo afectada por la letalidad en los machos híbridos inviables	116
3.1.4- Análisis en profundidad de los datos de las tablas 3.1.1.1 y 3.1.1.2	118

3.2- LOCALIZACIÓN DE UN FACTOR AUTOSÓMICO COMPLEMENTARIO AL CONTENIDO EN XA2A-A2c	121
3.2.1- Frecuencias relativas de machos híbridos portadores de la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i> a lo largo de 6 generaciones de retrocruzamientos	121
3.2.1.1- Descendencia R2	123
3.2.1.2- Descendencias de R3 a R7	124
3.2.1.3- Estudio de las varianzas de los retrocruces	131
3.2.2- Estudio del efecto de la región 4D1-D5 sobre la región XA2a-A2c, ambas de <i>D. koepferae</i> , en un fondo genético de <i>D. buzzatii</i>	132
3.3- EL SISTEMA XA2A-A2c, 4D1-D5 DE <i>D. KOEPFERAE</i> EN LA ESPECIE GEMELA <i>D. BUZZATII</i>	142
3.3.1- Puesta en homocigosis de la región 4D1-D5 de <i>D. koepferae</i> en un fondo genético de <i>D. buzzatii</i> SL-inv4s	142
3.3.2- Cruces de hembras de inviabilidad con machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5	144
3.3.3- Estudio de la viabilidad y aparición de alteraciones morfológicas en híbridos introgresados con la región XA1a-B4a en heterocigosis o hemizocigosis y la región 4D1-D5 en homocigosis	148
3.4- EFECTO DEL FACTOR CONTENIDO EN XA2A-A2c DE <i>D. KOEPFERAE</i> EN DISTINTAS CEPAS DE <i>D. BUZZATII</i>	159
3.4.1- Análisis de los resultados de los cruces de hembras híbridas portadoras en heterocigosis de la región XA1a-B4a de <i>D. koepfere</i> introgresada en <i>D.</i> <i>buzzatii</i> SL-101 (hembras de inviabilidad), con machos de distintas cepas de <i>D. buzzatii</i>	161
3.4.2- Estima del número de factores complementarios, supresores del efecto letal de la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i> en <i>D. buzzatii</i> , presentes en la cepa <i>D. buzzatii</i> SL-5	173
3.4.2.1- Retrocruces hacia la cepa <i>D. buzzatii</i> SL-101	173
3.4.2.2- Modelos mediante cadenas de Markov	176
3.4.2.3- Análisis de los datos de las descendencias R1 y R2	179
3.4.2.3.1- Análisis	180
3.5- ANÁLISIS MOLECULAR	185

3.5.1- Hibridación <i>in situ</i> sobre cromosomas politénicos	185
3.5.1.1- Genes <i>scute</i> y <i>Sex-lethal</i>	185
3.5.1.2- Gen <i>Broad-Complex</i>	186
3.5.2- Intento de rescate del gen <i>Broad-Complex</i> de la microgenoteca de la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i>	188
3.5.3- Rescate de diferentes clones conteniendo insertos de ADN de genes que se expresan en la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i> durante el estadio de pupa	189
3.6- LA INVIABILIDAD VERSUS LA ESTERILIDAD EN HÍBRIDOS DE <i>DROSOPHILA</i>	190
4- DISCUSIÓN	
4.1- INVIABILIDAD HÍBRIDA Y COMPLEJOS GÉNICOS COADAPTADOS	207
4.1.1- Estudio de las generaciones F ₁ y R ₁ híbridas: La regla de Haldane para la inviabilidad en los híbridos de <i>D. koepferae</i> y <i>D. buzzatii</i>	207
4.1.2- Localización cromosómica de un factor perteneciente al sistema de genes complementarios	211
4.1.3- La región cromosómica 4D1-D5	212
4.1.3.1- Interpretación de las varianzas de los retrocruces	212
4.1.3.2- El efecto de la región 4D1-D5	213
4.1.4- Estudio de la reciprocidad en las relaciones de las regiones XA2a-A2c y 4D1-D5 de <i>D. koepferae</i> introgresadas en <i>D. buzzatii</i>	215
4.1.5- Estudio del efecto de la región XA2a-A2c de <i>D. koepferae</i> sobre distintas cepas de <i>D. buzzatii</i>	216
4.1.6- Sobre la estima del número de supresores presentes en buzSL-5	218
4.1.7- El significado de la variabilidad intraespecífica	219
4.1.8- El nivel molecular: Un paisaje complejo	220
4.1.8.1- Las hormonas morfogenéticas	220
4.1.8.1.1- La ecdisona	222
4.1.8.1.2- La hormona juvenil	222
4.1.8.2- Tres genes de respuesta a ecdisona	223
4.1.8.2.1- <i>Dopadecarboxilasa (Ddc)</i> y la <i>esterasa-6 (est-6)</i>	224
4.1.8.2.2- <i>Broad-Complex (BR-C)</i>	224
4.1.8.3- Análisis molecular de la región XA2a-A2c	226

4.1.9- La regla de Haldane: ¿especificidad o recesividad?	227
4.1.10- Comparación entre las tasas relativas de esterilidad e inviabilidad	229
4.2- REGULACIÓN, INTERACCIONES Y ESPECIACIÓN	230
4.2.1- Aspectos de importancia evolutiva en la regulación génica	230
4.2.2- Nivel genético: Interacciones y aislamiento reproductivo	233
4.2.2.1- Modelo de dos loci y dos alelos de Wagner <i>et al</i>	235
4.2.2.2- Modelo de las incompatibilidades	238
4.2.2.3- Modelo de la dominancia de Turelli y Orr	239
5- CONCLUSIONES	243
6- BIBLIOGRAFÍA	249
7- APÉNDICES	
7.1- SOLUCIONES DE RESERVA, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO	273
7.2- ABREVIATURAS	274

1. INTRODUCCIÓN



1.1 ACERCA DE LA BASE GENÉTICA DEL CAMBIO EVOLUTIVO.

“ Fue en el siglo XIX cuando la vida, las diferentes especies, la existencia de los hombres y de sus sociedades se concibieron como productos de la evolución. En la actualidad, a finales del siglo XX, nada parece que pueda escapar ya en el futuro a este modo de inteligibilidad, ni la materia ni siquiera el espacio-tiempo”. *Ilya Prigogine*.

En 1858 se presentó en la Linnean Society de Londres el artículo “On the Tendency of Species to form Varieties, and on the Perpetuation by Natural Means of Selection” de Darwin y Wallace. Al año siguiente se publicó “On the Origin of Species by means of Natural Selection...” de Darwin. Poco después Mendel publicaba sus trabajos sobre los factores hereditarios, pero no sería hasta 1900 que estos fueron redescubiertos.

Desde el redescubrimiento de los trabajos de Mendel a comienzos de siglo, la fusión de las ideas de las leyes mendelianas sobre la herencia y la teoría de la selección natural de Darwin tardó 40 años en ocurrir. Durante la primera mitad de siglo, Fisher, Haldane, Muller y Wright sentaron las bases de una teoría genética sobre la evolución. La aportación de estos autores fue tan significativa y magnífica que la influencia de sus primeros trabajos se deja sentir aún hoy en día. Así, por ejemplo, la teoría de la evolución de la dominancia de Fisher (1930), el desarrollo de los estadísticos F para la medida de la heterozigosis de Wright (1932, 1935, 1948) o el concepto de lastre genético de Haldane (1937) y Muller (1950). Fundamental fue también la publicación del libro “Genetics and the Origins of Species” de Dobzhansky (1937) que dió cuerpo biológico a las conclusiones matemáticas de los trabajos de Fisher, Haldane y Wright. Posteriormente se extendió la síntesis neodarwinista, formulada principalmente en términos genéticos por Dobzhansky, a otras disciplinas biológicas. Así, Mayr (1942) y Huxley (1942) extendieron la síntesis de Dobzhansky a la zoología y sistemática animal, Simpson (1944) a la paleontología, y Stebbins al reino vegetal (1950).

En 1953 Watson y Crick descubren la estructura del ADN (Watson & Crick,

1953). En 1968 Kimura propone su teoría neutralista de la evolución molecular (para una revisión, véase Kimura 1983). Durante los años sesenta y hasta nuestros días se han desarrollado las técnicas de electroforesis e hibridación de ADN, los mapas de restricción, el análisis de secuencias de ADN, el ADN "fingerprinting", la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), el análisis de mini y microsátélites y finalmente las técnicas automáticas de secuenciación. Todo ello, junto al incesante avance en la tecnología de computadores y comunicaciones, que ha permitido la construcción de ingentes bases de datos y su puesta a disposición de toda la comunidad científica, ha permitido abordar muchas cuestiones y problemas evolutivos que eran previamente intratables para las técnicas genéticas, ecológicas y etológicas tradicionales (Majerus *et al*, 1996). Si bien, al mismo tiempo, surgían nuevas cuestiones y nuevos, o incluso viejos, problemas eran planteados.

Por ejemplo, con la aparición de las técnicas electroforéticas se tuvo por primera vez conocimiento de la variabilidad existente a nivel molecular, lo cual llevaría posteriormente al enunciado de la teoría neutralista de la evolución molecular (Kimura 1983). Todo ello reavivó un debate que llega hasta nuestros días; a saber: el de la teoría equilibradora versus la teoría neoclásica sobre el origen y mantenimiento de la variabilidad genética existente.

En pocas palabras, se puede decir que la teoría equilibradora considera a la selección natural como preservadora de la variación dentro de las poblaciones, y por el contrario la teoría neoclásica postula que la selección natural tiene un papel, principalmente, como eliminadora de variabilidad (las mutaciones con valor selectivo son, mayormente, deletéreas). Según esta última teoría, la gran cantidad de variación observada a nivel nucleotídico en las poblaciones sería neutra, es decir, resultaría de un equilibrio dinámico entre mutación y deriva. Una fascinante exposición de los pros y contras de ambas teorías se puede leer en el capítulo "The paradox of variation" del libro "The genetic basis of evolutionary change" de Lewontin (1974) (aparece también una muy buena exposición de los principios, predicciones y contrastes en torno a la teoría neutralista en el capítulo 8 de Hart & Clark, 1997).

De todos modos, al día de hoy, la teoría neutralista parece haber revertido a una variante más suave llamada la teoría cuasi-neutralista y ambas teorías, cuasi-neutralista y

seleccionista (equilibradora), difieren apenas en que mientras la primera predice rápida evolución en pequeñas poblaciones, la segunda indica que será en grandes poblaciones donde la evolución ocurrirá más rápidamente (Ohta & Kreitman, 1996).

Sin embargo, es raro que la vida se ajuste a las simples dicotomías que a menudo emergen como posturas enfrentadas en ciencia. En este sentido, se sabe hoy de procesos como la deriva molecular (que incluye fenómenos como la conversión génica y el "slippage" o deslizamiento de cadena), que podrían modificar las conclusiones basadas únicamente en los procesos de selección natural y deriva génica (Dover, 1997).

Para finalizar este apartado, diremos que se puede definir la evolución como un proceso de cambio en el espacio-tiempo. Pero de un modo más concreto diríamos que lo que nos atañe, ya desde la publicación del libro de Darwin, es el estudio del origen y desarrollo de la diversidad biológica a lo largo de ese continuo espacio-tiempo. A su vez sabemos que esa diversidad es el sustrato de la evolución.

Ese proceso de cambio se traduce en la evolución filética dentro de un linaje, sin subdivisión o separación en dos o más linajes (anagénesis), pero también en el origen y diversificación de nuevas especies a partir de las existentes (cladogénesis). En torno a este último evento de aparición de nuevas especies o especiación se mantiene hoy día un intenso debate.

1.2 LA GENÉTICA DE LA ESPECIACIÓN.

Se estudian, desde una perspectiva genética, los procesos que conducen a la formación de especies. Es clave, en este campo de estudio, el llamado concepto biológico de especie (CBE), que fue enunciado por Mayr (1942): “las especies son grupos de poblaciones naturales con cruzamiento entre sí, que están aisladas reproductivamente de otros grupos”. Desde esta perspectiva se redefine la genética de la especiación como el estudio de la base genética del aislamiento reproductivo.

Actualmente no existe un concepto de especie universalmente aceptado sino que en función del campo de investigación se utilizan unos u otros conceptos (Sluys, 1991). En términos generales distinguimos dos tipos de conceptos de especie:

- i) Aquellos en que las especies son definidas en función del flujo génico. Incluye los conceptos biológico (Mayr, 1942), cladístico (Henning, 1966), de reconocimiento (Paterson, 1985) y cohesivo (Templeton, 1989) de especie.
- ii) Aquellos en que las especies se definen en relación a su genealogía. Incluye el concepto evolutivo (Simpson, 1961), y el concepto filogenético de especie en sus diversos sentidos (Cracraft, 1983; Mishler & Donoghe, 1982).

La utilidad del CBE, desde la perspectiva de la genética evolutiva, es que permite reducir el concepto de especiación al del aislamiento reproductivo, si bien es poco operativo tanto en los casos donde no hay sexo (reproducción asexual) como en aquellos donde hay “mucho sexo” (taxa donde el fenómeno de hibridación no es raro, como en vegetales). Además, no se aplica en la dimensión temporal, quedando reducida su aplicabilidad al estudio de las especies bisexuales y especiación cladogenética.

Basándose en el CBE, Mayr postuló el modelo general de especiación geográfica (Mayr, 1954, 1963, 1982) que, siguiendo a Lewontin (1974), se puede desglosar en tres estadios:

- 1) Subdivisión de una población en dos o más, aisladas geográficamente (alopatría). Esta situación, de interrupción del flujo génico, permite la divergencia

genética entre las poblaciones. La acumulación de diferencias genéticas, debido a las diferentes presiones de selección en los diferentes ambientes y/o a la deriva, provocará que el hipotético intercambio genético entre las poblaciones separadas, de producirse, se vería dificultado.

2) Contacto secundario. Las poblaciones entran de nuevo en contacto. Se consolidará el aislamiento porque la selección natural favorecerá la acumulación de alelos que reduzcan el apareamiento interespecífico (esta es la teoría del reforzamiento propuesta por Dobzhansky, 1940) minimizando la producción de una descendencia híbrida teóricamente de menor eficacia biológica.

3) Evolución independiente de cada una de las especies.

Este modelo de especiación, así como el CBE, son claramente concepciones referidas a la evolución de los taxa zoológicos. De hecho Stebbins habla de concepto zoológico de especie para referirse al CBE (Stebbins, 1989), lo cual no es sorprendente porque los fundadores de la moderna síntesis evolutiva eran en su mayoría zoólogos. En este sentido es interesante resaltar que, recientemente, se ha replanteado la cuestión sobre el verdadero papel de la hibridación interespecífica en el proceso evolutivo (Endler, 1998).

Por otro lado, conviene tener presente como trasfondo la teoría del “shifting balance” (o equilibrio cambiante) de Wright (1932, 1977), sobre la evolución de la variabilidad genética en las poblaciones. En primer lugar se define el concepto de topografía adaptativa como “una hipotética representación tridimensional de la interacción entre las frecuencias genotípicas de dos o más loci y los valores de eficacia biológica (“fitness”), en la cual el eje vertical corresponde a la eficacia biológica. Los puntos más altos (la altura se representa por líneas topográficas) son llamados picos adaptativos y representan máximos locales de eficacia biológica donde pequeños cambios en el genotipo resultan en una disminución de la eficacia biológica promedio de los individuos, y los valles corresponden a regiones de baja eficacia biológica” (Hedrick, 1985; Majerus *et al*, 1996). Bajo este modelo, la selección lleva a la población a máximos locales, pero, para pasar de un máximo local a otro superior, es necesario atravesar el “valle”, lo cual es algo que la selección por sí sola no puede realizar porque conlleva una reducción temporal en eficacia biológica. Sin embargo, teóricamente, la

deriva genética puede cambiar a la población desde un equilibrio local estable (un pico) a través de un valle, hasta una región donde es atraída por otro equilibrio local estable que corresponde a un pico de mayor eficacia biológica que el de partida. El proceso de "shifting balance" incluye tres fases distintas (Hartl & Clark, 1997):

1) Deriva génica en torno a un sistema de equilibrio local estable, característico de un pico adaptativo en particular. Es una fase exploratoria, en la cual la deriva juega un importante papel permitiendo que pequeñas subpoblaciones exploren su topografía adaptativa.

2) Una fase de selección masal, en la cual las combinaciones genéticas favorables surgidas por azar en la fase de deriva son rápidamente incorporadas en el genoma de subpoblaciones locales por medio de la selección natural. De modo que si las frecuencias génicas se alejan lo suficiente de un máximo local estable y se aproximan al área de influencia de otro máximo, habrá un cambio de pico adaptativo.

3) Selección interdémica que ocurre entre pequeñas subpoblaciones semiaisladas (demos) cuando los demos más exitosos aumentan su tamaño y tasa de migración; este exceso de migración cambia las frecuencias alélicas de las subpoblaciones vecinas hasta caer bajo el control del nuevo pico adaptativo superior. Los genotipos favorecidos se extienden de este modo por toda la población. Cuando dos distintas regiones de expansión solapan puede formarse un nuevo y aún más favorable genotipo, convirtiéndose en un nuevo impulso para la selección interdémica. De este modo es posible que se explore toda la geografía adaptativa existiendo un continuo cambio desde unos picos a otros superiores.

Los modelos de especiación, que el propio Mayr y otros desarrollaron a partir del modelo de especiación geográfica, tenían como trasfondo el planteamiento wrightiano de evolución, en que se enfatiza la importancia de la interacción entre los genes a la hora de determinar la eficacia biológica (la importancia de los complejos de genes coadaptados).

En su modelo de especiación peripátrica Mayr (1982) propone que los procesos de especiación son consecuencia de una revolución genética que tiene lugar durante la dispersión y readaptación al ambiente de las poblaciones colonizadoras de nuevos nichos,

procedentes de la periferia ecológica de una especie o población ancestral. Se daría entonces un efecto fundador debido a los pequeños tamaños de las poblaciones colonizadoras, provocando una gran pérdida de la variabilidad subyacente en la población de partida y los correspondientes cambios en los complejos de genes coadaptados existentes en aquella población.

Se propusieron también mecanismos alternativos a la revolución genética, pero que mantienen la importancia del efecto fundador: así, el "founder-flush" (Carson, 1968, 1975, 1982) y el "genetic transilience" (Templeton, 1980, 1982, revisado en Carson & Templeton, 1984).

La importancia del efecto fundador como factor significativo durante el proceso de transición de una población a un nuevo pico adaptativo, ha sido cuestionada en una serie de trabajos (Lande, 1980; Charlesworth *et al*, 1982; Barton & Charlesworth, 1984; Rouhani & Barton, 1987; Barton, 1989b), donde se muestra que, si bien es posible que, en algún caso, en el proceso de transición de pico adaptativo y especiación, el efecto fundador tenga importancia significativa, nada hace parecer probable, antes bien al contrario, que sea éste el modo en que la evolución del aislamiento reproductivo ocurra en general.

Es importante notar que tanto los mencionados modelos clásicos de efecto fundador (Mayr, Carson y Templeton), como los trabajos que cuestionaron la importancia de los mismos, se centraron en una mayor o menor reducción de la variabilidad genética directamente afectada por la selección (varianza aditiva) que ocurre tras el efecto fundador (no así el "founder-flush" de Carson, pero aquí es necesario presuponer una relajación de la selección para que ocurra el incremento de la varianza aditiva que el modelo postula). En ninguno de estos trabajos se tiene en cuenta la varianza de interacción o epistática. Sin embargo Goodnight (1987, 1988, ver también Templeton, 1996) demuestra que parte de la varianza genética epistática presente en la población ancestral se transforma en varianza aditiva tras un efecto fundador, y que este efecto se ve magnificado si el tamaño de población se mantiene pequeño y no hay migración. Además, como el mismo Goodnight (1987) hace notar, "los caracteres relacionados con la eficacia biológica tienen poca varianza aditiva pero bastante cantidad de varianza epistática"; por todo ello, la epistasis, que tiene relativamente poca

importancia tras un efecto fundador, tendrá implicaciones evolutivas mayores si la deriva continua actuando durante varias generaciones.

Pero sigamos con nuestro recorrido a lo largo de los diferentes modelos de especiación propuestos. Barton y Charlesworth (1984) mostraban que la especiación por efecto fundador podía contemplarse como “un caso extremo dentro de un rango de posibilidades continuo, donde el aislamiento geográfico completo es innecesario, la formación de bloques de genes completamente adaptados es improbable y la divergencia puede ser conducida de muchas maneras sin necesidad de grandes cambios externos”. Siguiendo esta línea de argumentación cobran fuerza los modelos de especiación simpátrida, es decir, aquellos que no consideran necesario el requisito de aislamiento geográfico para la acumulación de las diferencias genéticas entre poblaciones. Desde la publicación de los modelos originales de Levene (1953) y Maynard Smith (1966), ha sido posible identificar distintos hechos biológicos (apareamiento discriminativo, adaptación a nuevos recursos, selección dependiente de nicho...) que pueden permitir la divergencia genética sin necesidad de recurrir al aislamiento geográfico (revisado en Howard & Berlocher, 1998).

Ahora, hagamos una breve recapitulación de lo expuesto, antes de pasar al problema de la base genética del aislamiento reproductivo.

Hasta aquí, hemos mencionado de modo sucinto cómo la fusión de la teoría de Darwin y los trabajos de Mendel dieron lugar al desarrollo de una teoría genética de la evolución de los organismos por medio de la selección natural: la síntesis neodarwinista. También se mencionó, cómo las nuevas técnicas de la biología molecular permitieron descubrir la abundante variabilidad subyacente a nivel molecular y cómo Kimura formalizó, en su teoría “neutralista”, la importancia del papel de los equilibrios entre tasa de mutación neutra y deriva genética (o efecto de muestreo) en la evolución molecular de las poblaciones, así como postuló el papel mayormente depurador de la selección natural. Hemos mencionado también la teoría del “shifting balance” de Wright, que prioriza el papel de las relaciones entre los genes en el proceso de evolución de la variabilidad. Luego, dimos paso a los modelos de especiación generados a partir del modelo de aislamiento geográfico de Mayr donde notamos cómo se echa de menos la incorporación de los trabajos que muestran cómo la varianza epistática (a priori

variabilidad que no condiciona la respuesta a la selección de un carácter o de la eficacia biológica) se puede convertir en aditiva (variabilidad que sí condiciona la respuesta a la selección). Por otro lado, también se mencionó que el aislamiento geográfico no es requisito *sine qua non* para la especiación.

Quedan por aludir los trabajos que consideran la importancia de las reordenaciones cromosómicas en los eventos de la especiación (Wilson, 1974; White, 1978), y finalmente, antes de pasar al siguiente apartado, debemos recordar el ya mencionado sesgo zoológico de la síntesis neodarwinista, y por tanto de las explicaciones que de ella se obtienen respecto al problema de la especiación (Stebbins, 1989). Sólo así se comprende la escasa importancia, en los modelos actuales de especiación, que un fenómeno como la hibridación, ampliamente extendido en el reino vegetal, tiene (Endler, 1998).

Pasamos, entonces, ya directamente, al problema del estudio de la base genética del aislamiento reproductivo, especialmente el aislamiento reproductivo postzigótico en animales.

1.3 EL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO.

A los mecanismos que impiden el flujo de genes entre las especies se los denomina barreras de aislamiento reproductivo. La clasificación más aceptada de las barreras de aislamiento reproductivo es la propuesta por Dobzhansky (1970) en que se diferencian dos tipos principales, pre y postzigóticas, según se establezcan antes o después de la fecundación respectivamente.

Entre las barreras prezigóticas cabe destacar: la incompatibilidad mecánica de los aparatos reproductores, el no reconocimiento de los gametos de distinta procedencia o la letalidad de los gametos masculinos (debido al ambiente bioquímico) en el interior de la hembra y las diferencias en la pauta del cortejo sexual previo a la cópula; esta última se incluiría en el caso más general de aislamiento sexual donde tienen especial importancia las feromonas (véase, para *Drosophila*, Coyne *et al*, 1994; Coyne, 1996).

Las barreras de aislamiento postzigótico son básicamente dos: la esterilidad que corresponde a disrupciones que afectan a la línea germinal del híbrido y la inviabilidad que afecta a la línea somática, impidiendo el desarrollo del híbrido. Aunque, cabe destacar una tercera que sería la pérdida de eficacia biológica (fertilidad o viabilidad) de la F₂.

Existen algunas generalizaciones acerca de las pautas que parece seguir la dinámica del aislamiento reproductivo (Coyne & Orr, 1989a):

- i) La intensidad del aislamiento reproductivo muestra una correlación positiva con el tiempo transcurrido desde la divergencia entre pares de especies (figura 4 en Coyne & Orr, 1989a) estimada a partir de la distancia genética (Nei, 1987). Ello conlleva que parece haber una gradación en el desarrollo del aislamiento reproductivo; siendo más estricto (ambos sexos afectados) sólo en el caso de mayores distancias genéticas.
- ii) Si bien las barreras de aislamiento reproductivo pre y postzigótico se desarrollan a tasas similares entre especies alopátricas (no comparten habitat), el aislamiento prezigótico es mucho más frecuente e intenso entre especies

simpátridas (figura 7 en Coyne & Orr, 1989a).

Respecto a este último punto, debe tomarse en consideración la hipótesis del reforzamiento (Dobzhansky, 1940) que implica precisamente un incremento en el aislamiento prezigótico precopulatorio entre las incipientes especies debido a la existencia de selección en contra de los híbridos. Por ello esperaríamos, justamente como describe el punto (ii), más aislamiento prezigótico en poblaciones simpátridas que en alopátridas. A pesar de ello, la evidencia del reforzamiento fue criticada porque la mayoría de los casos potenciales implicaban especies que no se sabía que hibridaran en la naturaleza o produjesen descendencia fértil en el laboratorio (Butlin, 1987, 1989). Sin embargo, no hace mucho se ha encontrado evidencia de reforzamiento entre las especies *D. pseudobscura* y *D. persimilis*, las cuales, se sabe, hibridan en la naturaleza dando lugar a hembras fértiles (Noor, 1995). También recientemente se ha mostrado, mediante un modelo teórico, cómo la epistasis X-autosomas en la determinación de la eficacia biológica híbrida tiene importantes efectos sobre la posible ocurrencia de reforzamiento (Kelly & Noor, 1996).

iii) Una tercera generalización a considerar sería la diferencia en las tasas de evolución de la esterilidad y la inviabilidad híbridas, observándose una mayor tasa de evolución de esterilidad de machos híbridos (Wu, 1992).

En cuanto a la descripción de la base genética del aislamiento reproductivo, ésta es escasa. Especialmente en cuanto al aislamiento prezigótico, siendo, en este último caso, en *Drosophila* donde tradicionalmente han tenido lugar los mayores avances (Coyne 1983, 1985a, 1989; Coyne & Kreitman, 1986; Coyne *et al.*, 1991; Carracedo *et al.*, 1998). Aunque recientes trabajos profundizan en las bases moleculares del aislamiento prezigótico (en particular, aislamiento mediado por la incompatibilidad del espermatozoide y el óvulo), tanto en el "caballito de mar" (Metz & Palumbi, 1996; Cameron *et al.*, 1996) como en el molusco abalone (Swanson & Vacquier, 1998). También debe citarse el caso de aislamiento prezigótico postcopulatorio descrito en el género *Tribolium* (escarabajo de la harina) (Wade *et al.*, 1994b).

Dados los conocimientos actuales sobre el tema, parece que tanto las bases genéticas (Coyne *et al.*, 1991) como la dinámica evolutiva (Coyne & Orr, 1989a) son bien distintas entre el aislamiento pre y postzigótico.

1.4 BASE GENÉTICA DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO POSTZIGÓTICO EN ANIMALES.

Es en el aislamiento postzigótico donde se ha alcanzado una mayor resolución genética y donde el debate continua, aún hoy, siendo más intenso.

La genética del aislamiento postzigótico se centró en los últimos años en la búsqueda de patrones genéticos que dieran cuenta de las dos generalizaciones empíricas conocidas como las dos reglas de especiación (Coyne & Orr, 1989b), a saber: la regla de Haldane (1922) y el desproporcionado efecto del cromosoma X sobre la inviabilidad y esterilidad híbridas.

1.4.1 La regla de Haldane y el efecto del cromosoma X.

Haldane observó (1922) que la reducción de la eficacia biológica en los híbridos de especies animales próximas era mayor en el sexo heterogamético (machos en mamíferos y en la mayoría de insectos, y hembras en Lepidoptera y pájaros) que en el homogamético.

Entre las diversas hipótesis enunciadas para tratar de explicar la regla de Haldane destaca la inicialmente propuesta por Muller (1940) según la cual el sexo heterogamético se ve afectado en los híbridos debido a un mal balance X/autosomas, puesto que en este caso falta el X de una especie mientras que hay una dotación autosómica completa de cada especie. Esta explicación fue puesta en tela de juicio, al menos para la esterilidad, cuando Coyne (1985b) demostró que hembras híbridas portadoras de dos cromosomas X procedentes de la misma especie (*D. simulans*) y de una dotación autosómica haploide de cada una de las especies parentales (*D. simulans* y *D. mauritiana*), y por tanto con el mismo grado de desequilibrio cromosómico que presentan los machos híbridos entre el X y los autosomas, eran fértiles mientras los machos eran completamente estériles. Este resultado se repitió en otras especies de *Drosophila* (Orr, 1987, 1989b). Actualmente, y

tras un arduo debate que ha incluido modelos sobre deriva meiótica (Frank, 1991; Hurst & Pomiankowski, 1991), compensación de dosis (Orr 1989a) y epigenéticos (Jablonka & Lamb, 1989, 1991, 1998, pero ver también Johnson, 1998) entre otros, parece lo más probable que la regla de Haldane sea una regla compuesta, es decir, con una arquitectura genética no necesariamente idéntica, para los fenómenos de esterilidad e inviabilidad (Orr, 1993; Wu & Davis, 1993). Para otros, sobre una misma base genética supuesta para la esterilidad e inviabilidad (ver más adelante) deben añadirse, para el caso de la esterilidad, consideraciones como la mayor tasa de acumulación de incompatibilidades afectando a la esterilidad masculina (Turelli & Orr, 1995; Orr & Turelli, 1996), entre otros posibles efectos, debido a la peculiaridad de estar considerando eventos que afectan a la línea germinal y no a la somática.

En cuanto al papel del cromosoma X en el aislamiento reproductivo postzigótico; la hipótesis de una mayor concentración de factores, afectando a la eficacia biológica del híbrido, en el cromosoma X que en los autosomas, ha sido seriamente cuestionada, en el sentido del posible sesgo debido a estar comparando factores en hemizigosis en el caso del X y en heterozigosis en el caso de los autosomas (Hollocher & Wu, 1996). Aunque, debe añadirse, que los resultados que cuestionan el papel del X se basan en tamaños de muestra muy pequeños (15 individuos en el mejor de los casos) y se refieren a introgresiones autosómicas en homocigosis de tamaños muy grandes (60-100 unidades de mapa) lo cual desvirtúa las comparaciones con el efecto del X, donde, al menos en las especies *D. simulans* y *D. mauritiana* se ha demostrado que pequeños tamaños de introgresión (8 unidades de mapa) son suficientes para provocar esterilidad de todos los machos híbridos de estas especies (Coyne & Charlesworth, 1989).

1.4.2 Modelos generales de aislamiento reproductivo postzigótico.

En la búsqueda de una descripción adecuada de las arquitecturas genéticas que subyacen al aislamiento postzigótico han de responderse dos preguntas (Wu & Palopoli, 1994):

1. ¿Cuántos genes contribuyen al establecimiento de barreras postzigóticas para

el flujo génico?

2. ¿Cómo interaccionan estos genes a la hora de provocar inviabilidad o esterilidad?

El modelo inicialmente planteado para tratar de responder a estas cuestiones y sobre el que se basan la mayoría de trabajos posteriores es conocido como el modelo estándar (Dobzhansky, 1937; Muller, 1940, aunque es interesante ver Orr, 1996, respecto al origen del modelo estándar).

Este modelo (fig. 1.4.2) es denominado por Wu & Palopoli (1994) como modelo de un único gen, aunque es en realidad un modelo de una única interacción entre un solo par de genes. En él se consideran dos genes interaccionantes A y B en una población original, a partir de la cual se generan dos linajes diferentes ocurriendo en un caso una sustitución en A para dar A1 y en otro caso en B para dar B2. Debido a que A1 y B2 son incompatibles los linajes quedarán aislados.

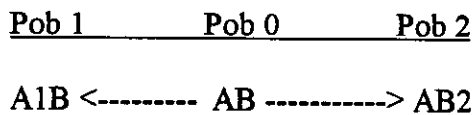


Figura 1.4.2: Representación esquemática del modelo estándar. Pob 0 es la población original, Pob 1 y 2 son las poblaciones correspondientes a los distintos linajes que derivan de la población original.

Sin embargo en el caso de la esterilidad de machos híbridos se han propuesto un gran número de factores de pequeño efecto que se acumularían hasta causar la esterilidad (Naveira 1992; Naveira & Fontdevila, 1986, 1991a y b). No obstante, la distinción entre la existencia de unos pocos genes con gran efecto o muchos con pequeño efecto acumulativo, a menudo no resulta fácil (Maside & Naveira, 1996a).

De cualquier modo, el único supuesto que el modelo estándar conlleva, es la necesidad de interacción entre, como mínimo, dos genes para explicar el aislamiento postzigótico. El hecho de que las interacciones involucren a 2 o múltiples loci afectará principalmente a la velocidad o tasa de evolución del aislamiento pero no al supuesto básico de la interacción (aunque vease Orr, 1991 respecto a la posibilidad de especiación vía un sólo gen).

Entre los modelos que aparecieron posteriormente para tratar de explicar las dos reglas de especiación cabe destacar el desarrollado por Charlesworth *et al.* (1987), que predice que el cromosoma X evolucionará más rápido que los autosomas debido a la mayor oportunidad para la selección natural de actuar sobre los caracteres ligados al X dada la hemizigosis del sexo heterogamético. Si bien el modelo es capaz de explicar las dos reglas empíricas en *Drosophila*, necesita echar mano de los supuestos *ad hoc* de que los alelos inicialmente causantes del aislamiento postzigótico deben ser originalmente ventajosos y parcialmente recesivos (Coyne & Orr, 1989b).

Otros modelos sobre el aislamiento postzigótico resaltaban el papel de las interacciones X-Y (Z-W) (Haldane, 1932; Matsuda *et al.*, 1991), respondiendo a la evidencia de que el sexo heterogamético es el que se muestra más sensible a la incompatibilidad interespecífica. Sin embargo trabajos posteriores mostraron que la incompatibilidad entre cromosomas sexuales heteroespecíficos no era la responsable de la esterilidad, al menos en los híbridos en que se puso a prueba la hipótesis (Johnson *et al.*, 1992).

Recientemente, y siguiendo la línea trazada por el modelo estándar, donde se concibe el aislamiento reproductivo postzigótico como un problema de incompatibilidades (ya sean entre factores en cromosomas X-X, X-Y ó X-A), aparecieron una serie de trabajos (Orr, 1993b; Orr, 1995) que desembocaron finalmente en el modelo de la dominancia (Turelli & Orr, 1995; Orr & Turelli, 1996). Este modelo es una versión formalizada de la explicación original de Muller para la regla de Haldane, centrándose en las relaciones de dominancia entre diferentes alelos incompatibles y el efecto de estas relaciones en la expresión de genes ligados al X o a los autosomas en híbridos F_1 heterogaméticos u homogaméticos. Esta teoría muestra que la regla de Haldane resulta si los alelos que afectan a la eficacia biológica del híbrido son, en su mayoría, parcialmente recesivos (ver apartado 4.2.2.3 de la Discusión para una explicación más exhaustiva del modelo). El modelo da cuenta de la regla de Haldane para el caso de la inviabilidad, sin embargo en el caso de la esterilidad debe considerarse, además, la mayor acumulación de efectos en los machos, lo cual favorece la manifestación de la regla de Haldane en especies donde el sexo heterogamético corresponde al masculino y viceversa. También es posible que otros mecanismos, como

la selección sexual (Hollocher & Wu, 1996; True *et al.*, 1996), estén afectando a la regla de Haldane respecto a la esterilidad, pero, de cualquier modo, todos ellos no serían sino fuerzas adicionales que se añaden sobre el efecto provocado por las relaciones de dominancia (Orr & Turelli, 1996).

Este modelo de la dominancia parece ser el que, actualmente, mejor explica el conjunto de evidencias recogidas en torno a la regla de Haldane a lo largo de un amplio rango de especies (Orr & Turelli, 1996). Sin embargo, el modelo nada nos dice sobre el posible número de genes involucrados en el proceso de aislamiento, así como tampoco informa sobre el modo en que las incompatibilidades evolucionaron, a saber, si mediante una mera acumulación de efectos independientes o con la intervención de pleiotropía y epistasis acelerando la aparición de las incompatibilidades.

1.4.3 La inviabilidad híbrida.

Los análisis genéticos del aislamiento reproductivo postzigótico se pueden dividir en dos categorías principales (Wu & Palopoli, 1994):

1. Análisis de híbridos interespecíficos.
2. Estudio de mutaciones intraespecíficas que recuperan la viabilidad o fertilidad híbridas.

Dentro de la primera categoría podemos distinguir:

- 1-a) Análisis de híbridos F₂ (retrocruces).
- 1-b) Análisis convencional de introgresiones.
- 1-c) Mapeo de alta resolución de introgresiones.
- 1-d) Estudio de zonas híbridas.

La mayoría de los avances en la localización de factores de inviabilidad híbrida en *Drosophila* vienen de estudios en el subgrupo *melanogaster*. En el cruce de hembras de *D. melanogaster* con machos de las especies gemelas (*D. simulans*, *D. mauritiana*), los machos de la descendencia F₁ son inviables, muriendo en la etapa larval. En el cruce

recíproco son inviables las hembras pero la inviabilidad ocurre en la etapa embrionaria. Ambos tipos de letalidad pueden ser rescatados por genes que se han mapeado citológicamente con bastante precisión y que se hallan presentes sólo en algunas poblaciones. Dos de estos genes o grupos de genes se asocian al autosoma 2 (*Lhr*, 2-95; *mhr*, sin localizar con mayor precisión) de *D. simulans* (Watanabe, 1979; Sawamura *et al.*, 1993a y b) y otros dos al cromosoma X (*Hmr*, 1-31,84; *Zhr*, 1B2-1B3) de *D. melanogaster* (Hutter & Asburner, 1987; Sawamura *et al.*, 1993b). Aunque estos resultados pudieran sugerir una base genética relativamente sencilla para la inviabilidad, Pontecorvo (1943) concluyó que había al menos nueve factores recesivos complementarios que afectaban a la viabilidad de los híbridos entre estas mismas especies.

Respecto a este grupo de genes relacionados con la inviabilidad híbrida en el subgrupo *melanogaster*, debe indicarse que posteriormente se clonó un gen que se correspondía con la posición de *Hmr* (Hutter & Karch, 1994), si bien al día de hoy no se ha profundizado más sobre si este gen candidato (codifica para una ATP translocasa) es realmente *Hmr*, es decir, el factor genético que rescata la viabilidad de los machos híbridos, o no.

Estudios en otras especies de *Drosophila* revelan la existencia de factores asociados al X afectando a la viabilidad, tanto de hembras (Patterson & Griffen, 1944; Schäfer, 1979), como de machos (Lumme & Heikkinen, 1990), aunque también se han descrito factores autosómicos afectando a la viabilidad de las hembras (Mitrofanov & Sidorova, 1981) o de ambos sexos (Henning, 1977; Zouros, 1981). Sin embargo en todos estos estudios (exceptuando los casos del subgrupo *melanogaster*) la localización de los factores corresponde a intervalos cromosómicos bastante amplios, consistiendo de hecho, en la mayoría de los casos, simplemente en una asignación cromosómica del efecto.

En otros taxa como Lepidoptera se ha mostrado la incidencia de factores poligénicos sobre la inviabilidad híbrida así como su elevadísima tasa de evolución (Oliver, 1979). En Orthoptera se han hecho estudios sobre clinas y zonas de contacto, obteniéndose estimas del número de loci que afectan a la pérdida de eficacia biológica en el híbrido, que rondan los 300 (Barton & Hewit, 1981).

Llama la atención la existencia de polimorfismos referidos a los efectos de los sistemas de letales híbridos: clinas en Orthoptera, la variabilidad interpoblacional de los genes del subgrupo *melanogaster* y la variabilidad interpoblacional asociada a los autosomas de *T. castaneum* (Wade *et al.*, 1994). También el polimorfismo asociado al oncogen *Xmrk* en *Xiphophorus* que en ausencia del factor R u otro similar, provoca el desarrollo de tumores malignos (Wittbrodt *et al.*, 1989; Weis & Schartl, 1998). Todo ello parece sugerir una rápida capacidad de evolución de los factores relacionados con la inviabilidad híbrida.

1.4.4 Los genes reguladores.

En general se piensa en los genes reguladores (es decir, en los genes que están inmersos en el control espacial y/o temporal de los distintos programas de diferenciación y desarrollo en las líneas somática y germinal; aunque se da una definición más formal en el apartado 4.2.1 de la Discusión) como elementos fundamentales en la evolución de eucariotas (Hedrick & McDonald, 1980; Cavener, 1992), especialmente en los organismos de reproducción sexual (Dover, 1992).

Desde esta perspectiva, el aislamiento reproductivo sería consecuencia de alteraciones en las pautas de los programas de regulación génica. Estos programas consisten en bucles y cascadas con diferentes niveles jerárquicos y por lo tanto, la epistasis y pleiotropía, son afines a los genes que se hallan en las zonas altas de estas vías regulatorias.

Se ha postulado que genes de alguna de estas vías, como la vía de determinación del sexo o la de compensación de dosis (se refiere a la necesidad de compensación de la dosis de expresión génica en machos de *Drosophila*, debido a la presencia de una sola copia del cromosoma X respecto a los dos presentes en hembras, mediante la hipertranscripción del X en los machos), podrían ser responsables del aislamiento reproductivo postzigótico (Orr, 1989a).

Puesto que ambos procesos, determinación del sexo y compensación de dosis, son controlados por una señal cromosómica, la razón X/A (la razón entre el número de

cromosomas X y el de dotaciones autosómicas haploides, Bridges, 1921) parece lógico pensar que en los híbridos heterogaméticos, en que se da un mal balance X/A, pudieran ocurrir errores en el conteo que provocarían precisamente la manifestación de la regla de Haldane. El conteo de la razón X/A se lleva a cabo mediante los llamados elementos numeradores y denominadores. Los numeradores son de efecto feminizador y están ligados al X y los denominadores son autosómicos (Parkhurst *et al.*, 1990).

Otra vía de regulación en *Drosophila* corresponde a las hormonas morfogenéticas que regulan el proceso de metamorfosis en insectos holometábolos. Este proceso resulta del interjuego de dos hormonas antagonistas: la hormona juvenil (HJ) y la ecdisona. Durante el desarrollo se conocen seis pulsos de ecdisona que se corresponden con las fases de embrión (1), larva (2-4), prepupa (5) y pupa (6). Es importante mencionar que a partir del tercer estadio larval, cuando los cromosomas politénicos alcanzan su máximo tamaño, hay un modo de seguir la relación ecdisona-expresión génica: los llamados "puffs" (Ashburner, 1990; Andres & Thummel, 1992). Respecto a los genes controlados por la ecdisona, se definen dos categorías básicas: los genes de respuesta temprana y los de respuesta tardía, los primeros serían directamente activados por la ecdisona y a su vez activarían a los de respuesta tardía.

Dado que la inviabilidad híbrida en *Drosophila* se manifiesta habitualmente durante el proceso de metamorfosis y que no parece deberse a problemas en el desarrollo de los discos imaginales híbridos (Sánchez & Dübendorfer, 1983), no es descabellado suponer que los genes regulados por la ecdisona puedan estar involucrados directamente como causantes de las incompatibilidades que provocan aquella (Hutter *et al.*, 1990), aunque, que sepamos, no esté descrito ningún caso en la literatura.

Para terminar estos brevísimos apuntes sobre la regulación génica y la base genética del aislamiento reproductivo, debemos mencionar un reciente modelo (Rice, 1998), que muestra cómo poblaciones muy similares pueden divergir en sus patrones de desarrollo, aun cuando los fenotipos que esos procesos de desarrollo construyen no cambien. Este resultado es muy interesante a la hora de considerar las especies gemelas, que tienen fenotipos adultos muy similares y sin embargo están aisladas reproductivamente.

Antes de pasar al siguiente apartado y después del sucinto repaso hecho al estado

actual de la investigación en torno a la base genética del aislamiento reproductivo postzigótico y concretamente la inviabilidad, vale la pena destacar tres importantes cuestiones que actualmente permanecen pendientes:

1. El efecto mayor o menor de los genes involucrados en el aislamiento reproductivo postzigótico. Debe considerarse que la hipótesis del efecto mayor, es decir, de la existencia de genes de especiación, es más útil como hipótesis nula porque es más fácilmente "falsable" (sensu Popper, 1958; edición de la traducción al español en 1971). La prueba definitiva del aislamiento de uno de los susodichos genes de especiación será la clonación y posterior demostración de su capacidad de rescatar la viabilidad o esterilidad del híbrido mediante un experimento de transformación.

2. El modo en que estos mecanismos de aislamiento evolucionan, ya sea una evolución lenta y gradual (mediante acumulación de sustituciones en uno o pocos alelos o mediante el efecto acumulado de muchos factores), o bien una evolución más rápida donde la epistasis y los complejos génicos coadaptados serían fundamentales.

3. La aparente mayor tasa de evolución de factores de esterilidad en machos respecto al resto de los casos (esterilidad en hembras e inviabilidad en machos y hembras).

1.5 UN BREVE APUNTE FINAL SOBRE LA TEORÍA DE SISTEMAS DINÁMICOS (O SISTÉMICA) Y LA EVOLUCIÓN.

1.5.1 El concepto de evolución como proceso irreversible en el tiempo.

La Real Academia Española define la evolución en una de sus acepciones como cada una de las etapas sucesivas de un cambio. Al referirnos a la evolución, hablamos de un proceso donde las cosas (o los organismos) pasan, más o menos gradualmente, de un estado a otro. Si bien en esta definición no aparece en ningún momento el término de irreversibilidad, ésta se halla implícita en el proceso de cambio si consideramos a éste, como cambio por mutación-selección y/o deriva. Esta irreversibilidad en ningún momento es determinista porque cada paso abre la posibilidad de nuevas historias, de nuevos pasos. En las leyes que describan estos procesos, el sentido del tiempo debe ser tenido en cuenta. No existe aquí simetría temporal. En cierto modo estas ideas se hallaban ya presentes en los trabajos del geólogo Charles Lyell (1835) sobre la formación de la tierra tal y como hoy la conocemos.

Este concepto de evolución como proceso estocástico e irreversible es hoy en día crucial en biología. Estocástico porque no hay ley que prevea con certeza el paso siguiente; irreversible porque dado un paso no hay vuelta atrás.

La perspectiva evolutiva transformó no sólo la biología, sino también el pensamiento y la filosofía, en cuanto a la posición y el papel de los seres humanos en el universo y en el mundo. El hombre pasó de ser un observador aislado y aparte del resto del universo como preconizaba la visión mecanicista de la física a ser una parte absolutamente integrada del mismo.

Se mantuvo sin embargo la dicotomía entre las ciencias biológicas, donde lo contingente e irreversible era inherente a los procesos característicos del estudio de esta disciplina, y las ciencias "duras" como la física y la química donde un potente aparataje matemático tendía siempre a eliminar la componente estocástica de los procesos que

estas ciencias estudian, en los que el tiempo era una magnitud siempre reversible. Era como si lo complejo pudiera ser desterrado o reducido en campos como la física y la química, pero esta reducción o simplificación no pudiera llevarse a cabo en biología.

En la misma época (2ª mitad del siglo XIX) del surgimiento de la teoría de la evolución biológica de Darwin (1859), emerge también la Termodinámica de la mano de R. Cassius (1822-1888) y L. Boltzmann (1844-1906). Se incorporan entonces el segundo principio de la termodinámica, según el cual todo sistema cerrado evoluciona hacia un estado de equilibrio simple y homogéneo (es el aumento de la entropía de los sistemas cerrados) y las leyes probabilísticas para los diferentes estados de la materia. He aquí dos aspectos de importancia: por un lado la aparición de irreversibilidad y por otro la necesidad de echar mano de la probabilidad para describir un proceso en el nivel microscópico.

En filosofía, el concepto de evolución aparece como una doctrina que presupone la explicación de la realidad como transformaciones sucesivas de una realidad primera, sometida a perpetuo movimiento intrínseco, y que pasa de lo simple y lo homogéneo a lo compuesto y heterogéneo.

Esta visión tiene clara relación con el concepto de evolución biológica, pero es difícilmente reconciliable con el segundo principio de la termodinámica. El universo considerado en su conjunto constituye en sí mismo un sistema cerrado, ¿cómo conciliar la existencia de la evolución biológica y el proceso de evolución de los sistemas cerrados predicho por el segundo principio? J. Monod responde (Monod, 1981) “nuestro número ha salido en el juego de MonteCarlo”. El universo entero aparece así como un desafío al segundo principio, como una improbabilidad cuasi absoluta que, como es obvio, tuvo lugar. La vida, el mundo, quedan así fuera de las leyes inmutables y deterministas de la naturaleza que, tradicionalmente (y paradójicamente), establecía y buscaba la física para explicar ese mismo mundo.

1.5.2 La evolución y el nuevo enfoque de la física.

El panorama ha cambiado hoy: la vida, la autoorganización, la aparición espontánea del orden, ya no son sucesos antinaturales, cuasi imposibles.

La mecánica cuántica abrió esta nueva era de la ciencia en los comienzos del siglo XX. Como dice el propio Schrödinger, “nos vemos obligados a negar a la partícula la dignidad de un individuo absolutamente identificable...”. Se refería, claro, a la sustitución del concepto de partícula individual por el de “nube de probabilidad”. Esto, junto a la actualización del cálculo matricial sobre bases estrictamente probabilísticas y el principio de incertidumbre de Heisenberg pusieron finalmente fuera de juego el esquema determinista que aún Einstein y Plank trataban de rescatar.

En los últimos años un nuevo enfoque emerge asociado a la termodinámica de los procesos irreversibles y de la mano de conceptos como autoorganización, autopoiesis, atractores caóticos y estructuras disipativas (Capra, 1998). De pronto, es posible que, al alejarse del equilibrio, ciertos sistemas evolucionen de manera espontánea hacia estructuras ordenadas y estables en el tiempo, estructuras autoorganizadas. La entropía aumenta, sí, pero ello no genera necesariamente sistemas homogéneos e inertes como ocurre inevitablemente en la termodinámica del siglo XIX. Esta evolución, este surgimiento espontáneo de “orden” se asocia a fluctuaciones de un sistema que no puede ser tratado como manipulable y controlable por los físicos, sino que se refiere a “singularidades” conocidas como puntos de bifurcación (puntos críticos de inestabilidad). En estos puntos, el comportamiento del sistema se hace inestable y puede evolucionar hacia varios regímenes de funcionamiento estables. Esta evolución es predecible sólo en términos probabilísticos. Este nuevo paisaje de la termodinámica ya no remite a la cuasi imposibilidad de la existencia del mundo, ya no nos excluye del devenir natural del universo y por ende, la evolución biológica no parece ya tan incompatible con el segundo principio. Casi diríamos que la física y la química se han acercado a lo biológico, a lo irreductible (por complejo) en su contingencia.

En este sentido, prevalece la visión que Darwin y otros incorporaron en su día

para la explicación de la vida en sus diferentes manifestaciones, y lo complejo trasciende el ámbito característico de la biología, al de la física y la química.

1.5.3 La perspectiva sistémica de la vida y la evolución.

Unos pocos pero sobresalientes nombres, se asocian actualmente al estudio de la vida y la evolución bajo esta nueva perspectiva. Destaca especialmente Stuart Kauffman y sus trabajos con redes binarias (Kauffman, 1970, 1993) que permiten ya repensar el genoma como una red autoorganizadora, capaz de producir espontáneamente nuevas formas de orden, "...La evolución no es sólo un remiendo... Es orden emergente, saludado y aguzado por la selección". Pero también hay que mencionar al neurocientífico chileno Humberto Maturana que introdujo el concepto de autopoiesis (autocreación) como definición básica de vida (Maturana & Varela, 1980) y, como no, al físico, químico y premio nobel Ilya Prigogine que aportó la primera y más influyente descripción detallada de los sistemas autoorganizadores con su teoría de las estructuras disipativas (Prigogine, 1988, pags: 240-261).

Se ha dicho que el progreso del conocimiento se mide mejor por la historia de las preguntas que de las respuestas (Wagensberg, 1985); de este modo resalta el trabajo que estos destacados científicos y otros, han venido realizando, el cual parece dirigirnos de manera quizás catártica, pero sin duda ineludible, a, entre otras consecuencias, y con palabras de Kauffman "repensar la biología evolutiva".

Es fascinante notar que nos hallamos, quizás, ante lo que, tiempo ha, Lewontin llamó, "la necesidad de transformación del problema desde una micro a una macrodescripción" (Lewontin, 1974, pag 318) para referirse a la incapacidad del análisis evolutivo tradicional de considerar al genoma como unidad de selección. Viéndose abocado, debido a esta incapacidad, a abordar a cada gen por separado. Esta necesidad enunciada por Lewontin, sería análoga a la que surge a la hora de estudiar el comportamiento de un gas, donde no es posible, ni informativo, hacer un seguimiento particular de cada molécula.

1.6 OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

En el presente trabajo se abordará el problema de la inviabilidad híbrida en el par *D. koepferae-D. buzzatii*, mediante los análisis de segregación en retrocruces híbridos, con una resolución de introgresiones relativamente elevada basada en la asinapsis (apareamiento incompleto) de los cromosomas politénicos en híbridos interespecíficos (Naveira *et al.*, 1986). Se tratará también de clonar un factor causante de la inviabilidad híbrida.

1.6.1 Objetivos.

1. Comprobación de la existencia de un sistema de genes complementarios causante de la inviabilidad en híbridos del par *D. koepferae-D. buzzatii* tal y como supone el modelo estándar.
2. Localización citogenética precisa de los componentes del sistema de genes complementarios o en su defecto del factor causante de la inviabilidad.
3. Estudio de las relaciones de dominancia dentro del sistema de genes complementarios.
4. Búsqueda de polimorfismos intraespecíficos en relación al efecto del letal.
5. Descripción fenotípica del(os) estadio(s) de desarrollo afectado(s) por la inviabilidad híbrida.
6. Microclonación de la región que contiene al letal.
7. Búsqueda de genes candidatos a ser el letal en función de su localización citogenética.
8. Clonación del gen causante de la inviabilidad híbrida.
9. Estudio comparativo de las tasas de evolución de esterilidad e inviabilidad en híbridos de *Drosophila*.

1.6.2 Hipótesis y estrategia experimental.

Para la consecución de estos objetivos se plantearon las siguientes hipótesis y estrategia experimental:

Hipótesis 1.- Puesto que los machos F_1 son viables, de existir algún sistema de genes complementarios relacionado con la inviabilidad híbrida, ésta se manifestará por una reducción de los valores de razón sexual al pasar de la F_1 a la R_1 .

Hipótesis 2.- Existe un factor de la inviabilidad híbrida en el cromosoma X de la especie *D. koepferae*: Para contrastar esta hipótesis, la estrategia consistirá en utilizar, como marcadores de regiones cromosómicas introgresadas, un marcador morfológico (un mutante *white*) situado en el cromosoma X y la asinapsis politénica asociada a los híbridos del par *buzzatii-koepferae*, de modo que, al realizar retrocruces vía hembra hacia *D. buzzatii* y seleccionar para la presencia de diferentes regiones híbridas del cromosoma X, deberá asociarse la inviabilidad de machos híbridos de la descendencia a determinadas regiones introgresadas del cromosoma X de *D. koepferae*.

Hipótesis 3.- Es igualmente posible, una vez localizado el letal, aplicar un protocolo similar para localizar factores complementarios, seleccionando a la vez para la presencia del letal y elevadas frecuencias de machos híbridos en la descendencia.

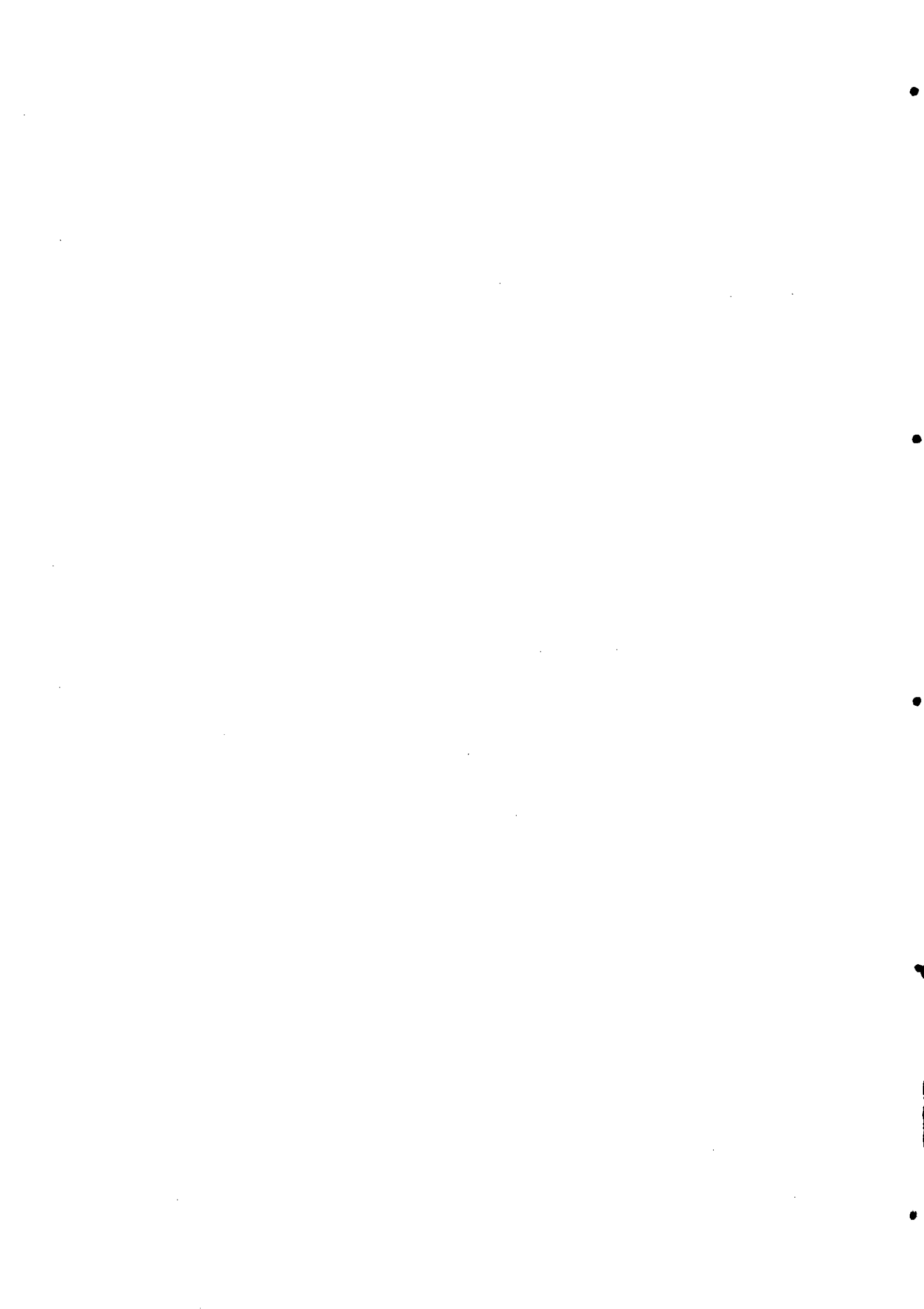
Hipótesis 4.- Hay polimorfismo para factores de rescate de la inviabilidad híbrida en el par *buzzatii/koepferae*. Existirá alguna cepa o población donde el efecto del letal no se manifieste a pesar de estar ausente el factor complementario conespecífico del letal. Esto se contrastará utilizando una cepa híbrida portadora exclusivamente de la región que contiene el letal y cruzándola con diferentes cepas de la otra especie a fin de hallar alguna o algunas donde el letal no se manifieste.

Hipótesis 5.- El letal forma parte de la cadena regulatoria que controla la determinación del sexo (somático) y la compensación de dosis en *Drosophila*.

Hipótesis 6.- El letal forma parte de la cadena regulatoria que controla la metamorfosis en *Drosophila*.

Para contrastar las hipótesis 5 y 6 se hibridarán *in situ* una serie de genes candidato de *D. melanogaster* para conocer sus localizaciones cromosómicas en el par *D. buzzatii-D. koepferae* con respecto a la posición citogenética del letal. Por otro lado, se hará una comparación de los fenotipos de inviabilidad con los de mutantes conocidos.

Hipótesis 7. - Tras microclonar la región cromosómica que contiene al letal, sería posible aislarlo de esa microgenoteca utilizando como sonda, genes candidatos que ocupen esa misma región cromosómica (localizados por hibridación *in situ*) o bien ADNc que corresponda a ARN's mensajeros presentes en los estadios pupales en que la inviabilidad ocurre. Para ello se hibridarán sobre la microgenoteca sondas de genes candidatos de modo que, si alguno de ellos es el responsable de la inviabilidad, deberá hallarse contenido en la región microclonada (contiene el factor de inviabilidad citológicamente localizado). También se hibridarán sondas de ADNc obtenido a partir de ARN mensajero extraído de pupas en los estadios correspondientes a la ocurrencia de la inviabilidad, de modo que, si el gen causante de la inviabilidad se expresa en esos estadios, estará representado en la muestra de ARN mensajero y podrá ser localizado en la microgenoteca.



2. MATERIAL Y MÉTODOS



2.1 MATERIAL BIOLÓGICO: *D. BUZZATII* Y *D. KOEPFERAE*.

2.1.1 Localización geográfica y nicho trófico.

Drosophila buzzatii y *D. koepferae* son dos especies sinmórficas (gemelas) del grupo *repleta*, originario del continente americano, que coexisten en muchas de las zonas áridas y semiáridas del noroeste de Argentina y de la Bolivia andina (Morello, 1958; Cabrera, 1958). *D. koepferae* sólo se ha encontrado en Sudamérica; *D. buzzatii*, además de las zonas mencionadas de Argentina y Bolivia, ha mostrado una notable habilidad colonizadora, encontrándose hoy en día en numerosas localidades del Viejo Mundo (Fontdevila *et al.*, 1982) incluyendo Australia (Mather, 1957).

Las dos especies se hallan en simpatria en diversas localidades, con un cierto solapamiento de sus nichos tróficos. Ambas especies son cactófilas, es decir, utilizan como alimento y sustrato de puesta los tejidos de cactus en descomposición ("rots"). Es ésta una característica compartida por otras muchas especies del grupo *repleta*, adaptación que le permitió la invasión de las zonas áridas del Nuevo Mundo. *D. buzzatii* es la especie predominante en los "rots" de diversas especies de *Opuntia* (*O. quimilo*, *O. ficus-indica*, *O. sulphurea*, etc.), en tanto que *D. koepferae* en los de cactus columnares, tales como *Trichocereus terscheckii* y *Cereus validus* (Hasson *et al.*, 1992).

2.1.2 Relación citológica y filogenia.

D. buzzatii tiene el cariotipo metafásico estándar de *repleta*, que consiste en cinco pares de largos cromosomas acrocéntricos y un par de cromosomas puntiformes, siendo el cromosoma Y más corto que el X en los machos (Wharton, 1943). El número 1 corresponde al cromosoma X, los números del 2 al 5 a los cuatro largos autosomas, y el número 6 al puntiforme. El cariotipo de *D. koepferae* es esencialmente idéntico, excepto por lo que se

refiere al cromosoma Y y al 6, que presentan diferenciación geográfica y pueden ser metacéntricos en algunas regiones (Baimai *et al.*, 1983).

En cuanto a la relación filogenética, ambas especies se incorporan como un "cluster", el cluster *buzzatii*, en el complejo *martensis* (anteriormente *mulleri*) de Sudamérica (Ruiz *et al.*, 1982). Las dos especies evolucionaron a partir del denominado ancestro IIFb (Wasserman, 1982) mediante la fijación de una inversión paracéntrica en cada una de ellas (la 5g, en *D. buzzatii*, y la 2f^o, en *D. koepferae*) y desarrollaron después un polimorfismo concentrado principalmente sobre el cromosoma 2 que, no obstante, retuvo en *D. buzzatii* la ordenación estándar del ancestro IIFb.

2.1.3 Relación reproductiva.

No se han encontrado en la naturaleza híbridos entre las dos especies, pero en el laboratorio es posible romper las barreras de aislamiento precigótico y obtener alguna descendencia, sólo si los cruces se hacen entre las hembras de *D. koepferae* y machos de *D. buzzatii*. El cruzamiento recíproco nunca deja descendencia.

Los machos híbridos de la F₁ son invariablemente estériles, pero sus hermanas son frecuentemente fértiles y pueden retrocruzarse con cualquiera de los parentales, si bien los retrocruzamientos con *D. koepferae* rara vez llegan a tener éxito. Es interesante notar que hay cepas de las dos especies entre las que es prácticamente imposible obtener descendencia (Wasserman *et al.*, 1983).

2.1.4 Descripción de las cepas de laboratorio utilizadas.

Inicialmente se utilizaron hembras de *D. koepferae* de las poblaciones de Argentina, Vipos y San Luis, así como machos de *D. buzzatii* San Luis (buzSL-), descendientes de isolíneas fundadas a partir de sendas hembras capturadas en la naturaleza (Ruiz *et al.*, 1982).

Posteriormente, la cepa de *D. koepferae* utilizada para todos los retrocruzamientos fue San Luis 8, que se nota como koeSL-8; se fundó a partir de una hembra de una muestra

numerosa de moscas capturadas en la localidad argentina de San Luis en 1979 por A. Ruiz y A. Fontdevila.

En la nomenclatura utilizada, el número que identifica a una determinada cepa al realizar los cruces (por ej. KoeSL-8 × ...) indica que en un momento dado se pasó por un cuello de botella de manera que la cepa actual proviene de una sola hembra fecundada. Si al nombre de la cepa no acompaña un número (por ej. KoeSL), ello quiere decir que no hay constancia de que la cepa pasara un cuello de botella tal que provenga de una sola hembra.

Las cepas de *D. buzzatii* utilizadas son las siguientes:

- 1.- Cepa buzSL-5, recogida en esa misma localidad por A. Ruiz y A. Fontdevila en 1979.
- 2.- Cepa buzSL-101, que tiene fijada una mutación "white" recesiva, obtenida a partir de una línea derivada de buzSL-10 por H. Naveira en 1986, los individuos w son de ojos blancos (los individuos w^+ son de ojos rojos).
- 3.- Cepa buzSL-6, recogida en esa misma localidad por A. Ruiz y A. Fontdevila en 1979.
- 4.- Cepa buzSL-inv4s, proviene de la cepa San Luis, en la cual se fijó la inversión s del cromosoma 4.
- 5.- Cepa buzSL-inv5I, proviene de la cepa San Luis, en la cual se fijó la inversión I del cromosoma 5.
- 6.- Cepa buzSL Fum¹⁰⁴, fijada para el alelo 104 de la fumarasa.
- 6.- Cepa buzDF (buz-5 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona), proveniente de Dean Funes (Argentina), año 1979.
- 7.- Cepa buzC (buz-11 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona), procedente de la localidad de Carboneras (Almería), año 1981.
- 8.- Cepa buzP (buz-31 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona), de Plasencia (Cáceres), año 1984.
- 9.- Cepa buzPR (buz-32 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona), de Puebla del Río (Sevilla), año 1984.

10.- Cepa buzM (buz-34 del cepario de la Universidad Autónoma de Barcelona), de Mazarrón (Murcia), año 1984.

Las cepas se mantuvieron siempre mediante cruces masales.

2.2 CULTIVO DE *DROSOPHILA*.

Se utilizaron dos tipos de medio de cultivo:

1.- El medio tradicional (cocinado) para *Drosophila* y su composición es:

Harina de maíz	170 grs.
Levadura	100 grs.
Agar-Agar	12 grs.
Agua	hasta 1 litro.

2.- Medio sintético para *Drosophila* "Drosophila Instant Medium", fórmula 4-24 (Carolina Biological Supplies). A este medio se le añade levadura, sal, agua y fungicidas.

Como fungicidas se emplearon el ácido propiónico (0,6%) y nipagin (10% en alcohol) para una concentración final de 0,2% de nipagin, en el medio cocinado y 0,6% de propiónico y 0,7% de nipagin (concentración final) en el medio sintético.

Para la manipulación de los adultos se empleó el eter como anestésico. Tanto las cepas como los cruces individuales se mantuvieron en tubos de vidrio de 30 c.c. con unos 5 c.c. de medio de cultivo. Cada semana se transferían los adultos a medio fresco. Todos los cultivos se mantuvieron en cámaras climatizadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

La obtención de vírgenes para los cruzamientos individuales se llevó a cabo vaciando los tubos y recogiendo los adultos que emergieran dentro de las 24 h siguientes. Este periodo de tiempo nos asegura que las hembras recogidas no han sido aún inseminadas, puesto que los machos de *D.buzzatii* no alcanzan la madurez sexual hasta las 36-48 h. y los de *D.koepferae* hasta las 60-72 h.

2.3 ANÁLISIS GENÉTICO.

2.3.1 Localización de regiones de interés en los cromosomas politénicos.

En los cruces entre hembras de *D. Koepferae* y machos de *D. Buzzatii*, los machos de la descendencia (F_1) son viables pero estériles. Al retrocruzar las hermanas de estos machos durante una o varias generaciones aparece inviabilidad asociada a los machos de la descendencia. Se pretende localizar a nivel citológico y con la mayor precisión posible, la región cromosómica que contiene al gen o genes causantes de esta inviabilidad. Dado que en la F_1 no se manifiesta el efecto letal debe existir algún gen o genes complementarios al causante (es) de la inviabilidad, de modo que cuando se hallan presentes (en la propia especie y en la F_1) no se manifiesta la inviabilidad. Sin embargo a lo largo de las generaciones de retrocruzamientos este gen o genes se irán perdiendo debido a la segregación cromosómica y a la recombinación, ocurriendo entonces la aparición de la inviabilidad específica de machos híbridos. Pretendemos localizar también alguna región cromosómica que contenga un factor o factores complementarios al letal. Para todo ello se realiza un protocolo de retrocruzamientos que permita la introgresión en heterozigosis de distintas regiones cromosómicas de *D. koepferae* en *D. buzzatii* (Figura 2.3.1). En este protocolo se utiliza la cepa buzSL-101 (fijada para un mutante white) de *D. buzzatii*.

Como marcador de las regiones cromosómicas introgresadas se utiliza la asinapsis de los cromosomas politénicos de los híbridos interespecíficos. Los híbridos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* muestran un apareamiento muy malo en los cromosomas politénicos homólogos. Esto permite seguir la pista a lo largo de las generaciones a diferentes regiones cromosómicas de *D. koepferae* introgresadas en heterozigosis sobre el fondo genético de *D. buzzatii* (Naveira *et al.*, 1988). Nótese que este método no nos permite obtener regiones híbridas introgresadas en homozigosis puesto que en este caso el apareamiento sería perfecto, no siendo posible distinguir una región interespecífica en homozigosis de una conoespecífica, dado que los cromosomas X, 3, 4 y 6 de ambas especies son homosecuenciales mientras que en los cromosomas 2 y 5 aparecen inversiones especie-específicas que en las hembras híbridas

suprimen los entrecruzamientos en un 70% en el cromosoma 2 y un 50% en el 5. Cuando fue necesario, se utilizaron cepas de *D. buzzatii* con alguna inversión cromosómica fijada que funcionó como marcador cromosómico de *D. buzzatii* frente a *D. koepferae* (ver más adelante figura 2.3.3).

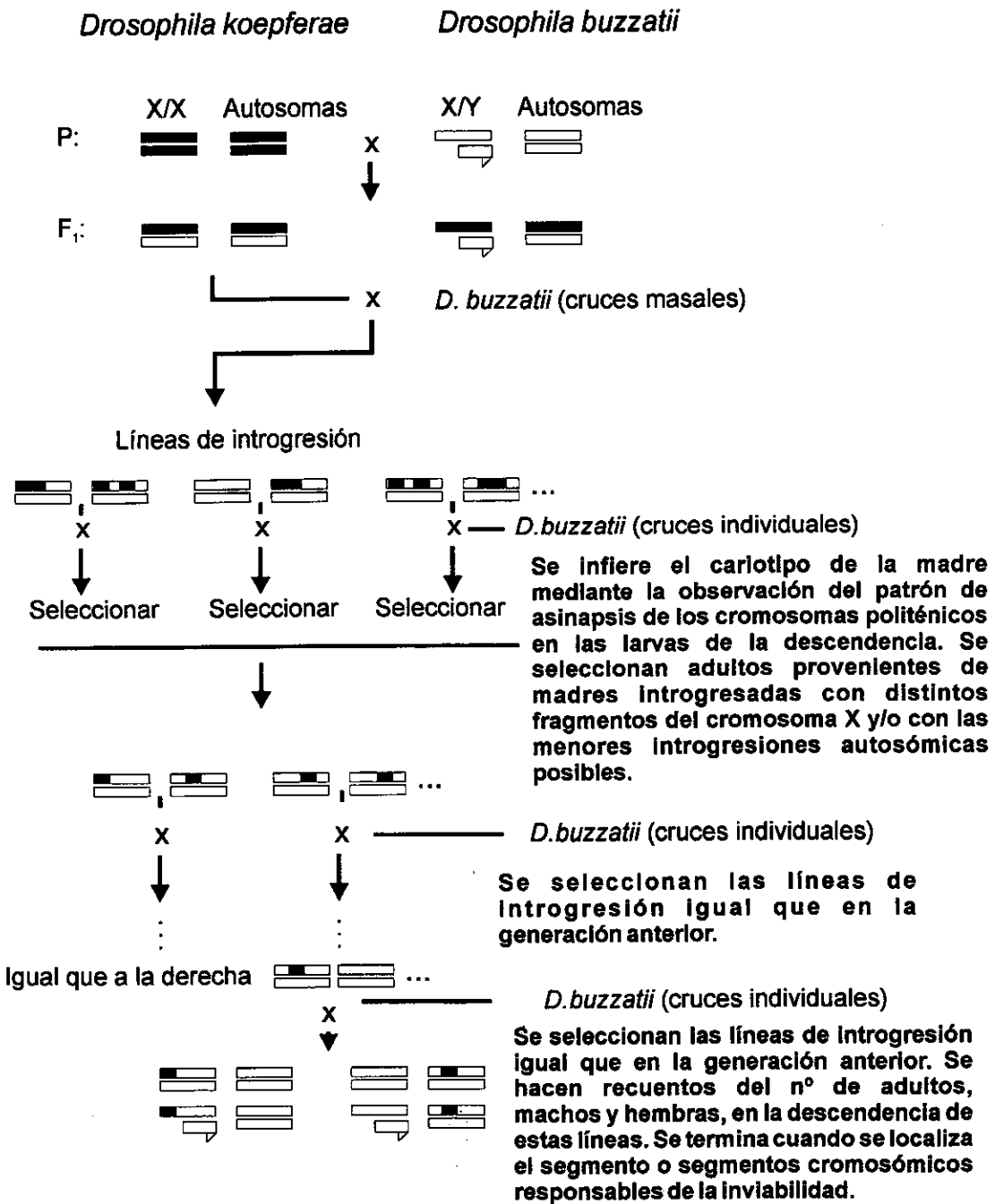


Figura 2.3.1 Esquema de retrocruces para localizar segmentos cromosómicos de *D. koepferae* introgresados en *D. buzzatii*.

2.3.2 Estudio de los cromosomas politénicos.

Glándulas salivares.- El método para estudiar los cromosomas politénicos consiste en diseccionar larvas de tercer estadio en alcohol-acético (3:1) o bien en acético (45%), extraer las glándulas salivares con ayuda de unas agujas enmangadas y colocarlas sobre un portaobjetos en una pequeña gota deorceína acético-láctica (3 orceína acética Gür: 2 ácido láctico 85%) durante 20 min; luego se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se aplasta suavemente entre un lecho de papel de filtro, para extraer el exceso de colorante y extender los cromosomas.

Todas las preparaciones se guardaron a 4°C. Las lecturas se realizaron con un microscopio óptico Olympus CH2, con objetivos 20x y 40x. Las fotografías se tomaron empleando un aparato microfotográfico Olympus.

Los mapas de los cromosomas politénicos de las dos especies (figura 2.3.2) son los utilizados por H. Naveira construidos según Ruiz *et al.*, 1982, a partir de las secuencias estándar de *D. repleta*, cuyos mapas pueden encontrarse en Wharton, 1942. Cada cromosoma, excepto el puntiforme, está dividido en ocho regiones, desde A hasta H (la A corresponde al telómero y la H al centrómero), y cada región en un cierto número de secciones, las cuales se identifican mediante números. La posición de cada banda en una sección cualquiera se especifica mediante una letra minúscula, siguiendo de nuevo el orden alfabético en el sentido del telómero hacia el centrómero.

Los cromosomas politénicos sólo se pueden observar con claridad en las glándulas salivares de larvas de tercer estadio, por lo que, a efectos prácticos, el cariotipo de los adultos es críptico. Para inferir dicho cariotipo, el procedimiento habitual consiste en analizar un cierto número de larvas de la descendencia (Barbadilla y Naveira, 1988). En el caso que nos ocupa, se analizaron por regla general seis-ocho larvas para inferir el cariotipo de cada hembra o macho híbrido empleado en los cruzamientos.

A la hora de mostrar el cariotipo politénico existen, sin embargo, las siguientes peculiaridades en la nomenclatura de las tablas 3.2.1.1.1 y siguientes (ver Resultados):

1. Si el cromosoma está introgresado íntegramente (no recombinó), aparece sólo el número; por ejemplo 5 en vez de 5A1a-H.

2. Si no se dispone de información suficientemente precisa sobre la región introgresada, aparecerá sólo la mayúscula y el número (sin la letra minúscula) o incluso sólo la letra mayúscula (por ej. 4D1-D3 ó 5F-H).

3. Si se conoce dónde empieza la introgresión pero no dónde termina, aparece la letra de inicio seguida de un guión y viceversa (por ej. 4D1- , y -4D3, respectivamente).

4. Si algún segmento o cromosoma aparece entre interrogantes, ello quiere decir que aunque no fue detectado, cabe la posibilidad de que estuviera presente (por ejemplo porque aparece en un hermano del progenitor de esa línea, es decir estaba en el padre y no fue detectado y es posible que ahora esté o no esté en el hijo en cuestión).

5. Los segmentos introgresados de distintos cromosomas van seguidos por comas (4D1-D5, 5F-H), si el mismo cromosoma tiene distintas regiones introgresadas, éstas aparecen unidas por el signo + así 4D1-D5+E4a-G2,... indica que hay dos regiones separadas introgresadas del cromosoma 4).

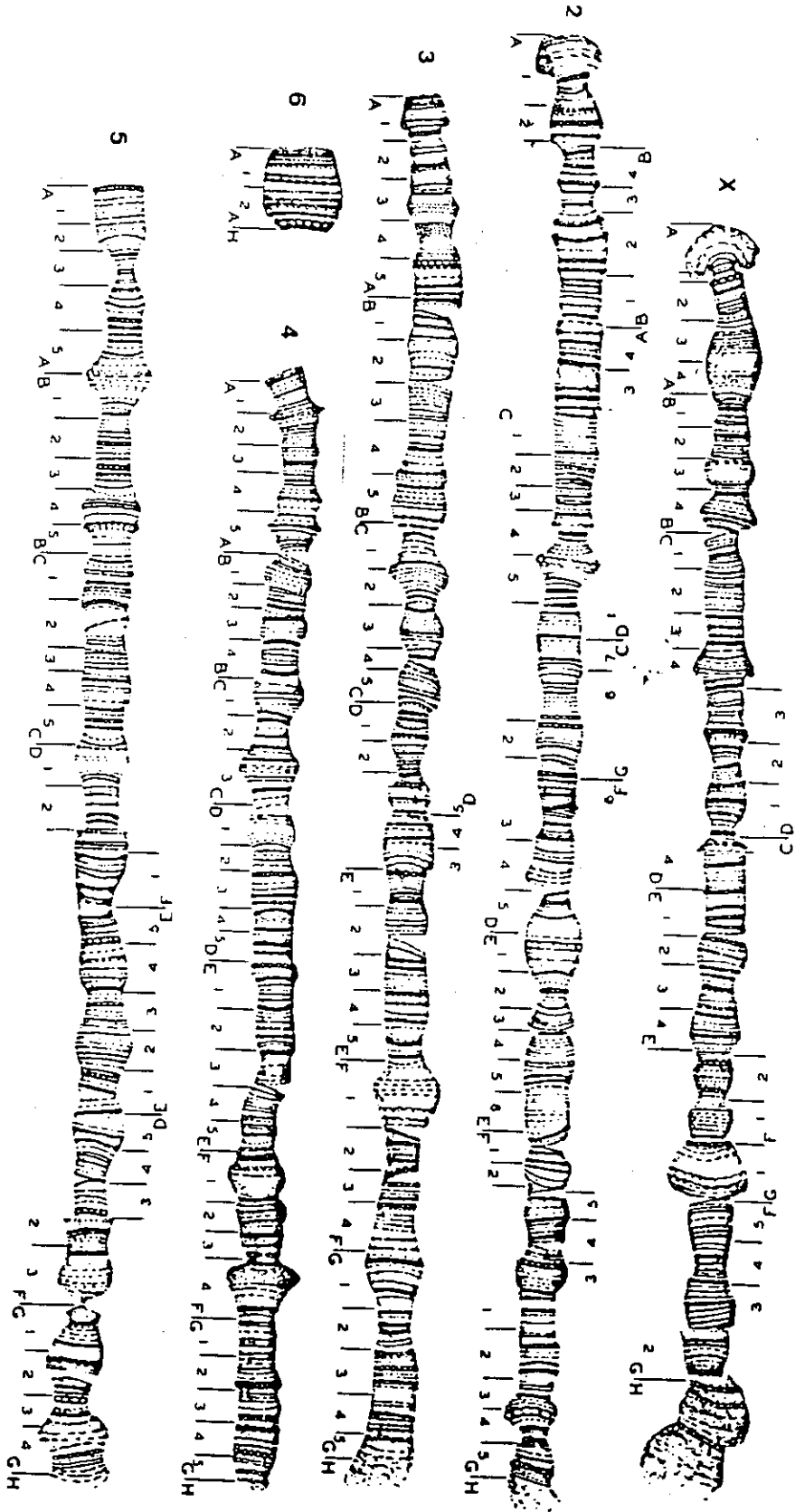


Figura 2.3.2 Mapa citológico de las ordenaciones estándar de los cromosomas politénicos de *D. buzzatii*.

2.3.3 Puesta en homocigosis de una región cromosómica híbrida.

Para poner en homocigosis una región cromosómica híbrida no es posible utilizar la asinapsis de los cromosomas politénicos homólogos puesto que ambas regiones homólogas serán ahora conespecíficas. El problema es que al ser homocigosis las ordenaciones estándar de los cromosomas politénicos de ambas especies, *D. koepferae* y *D. buzzatii*, no es posible distinguir una región híbrida introgressada en homocigosis de otra que no sea híbrida. Se utilizan entonces las inversiones cromosómicas presentes en *D. buzzatii* como marcadores cromosómicos frente a las ordenaciones estándar de *D. koepferae*.

Se utilizó la inversión 4s (4D1-F1) presente en homocigosis en la cepa buz-inv4s como marcador frente a una región del cromosoma 4 de *D. koepferae* (figura 2.3.3).

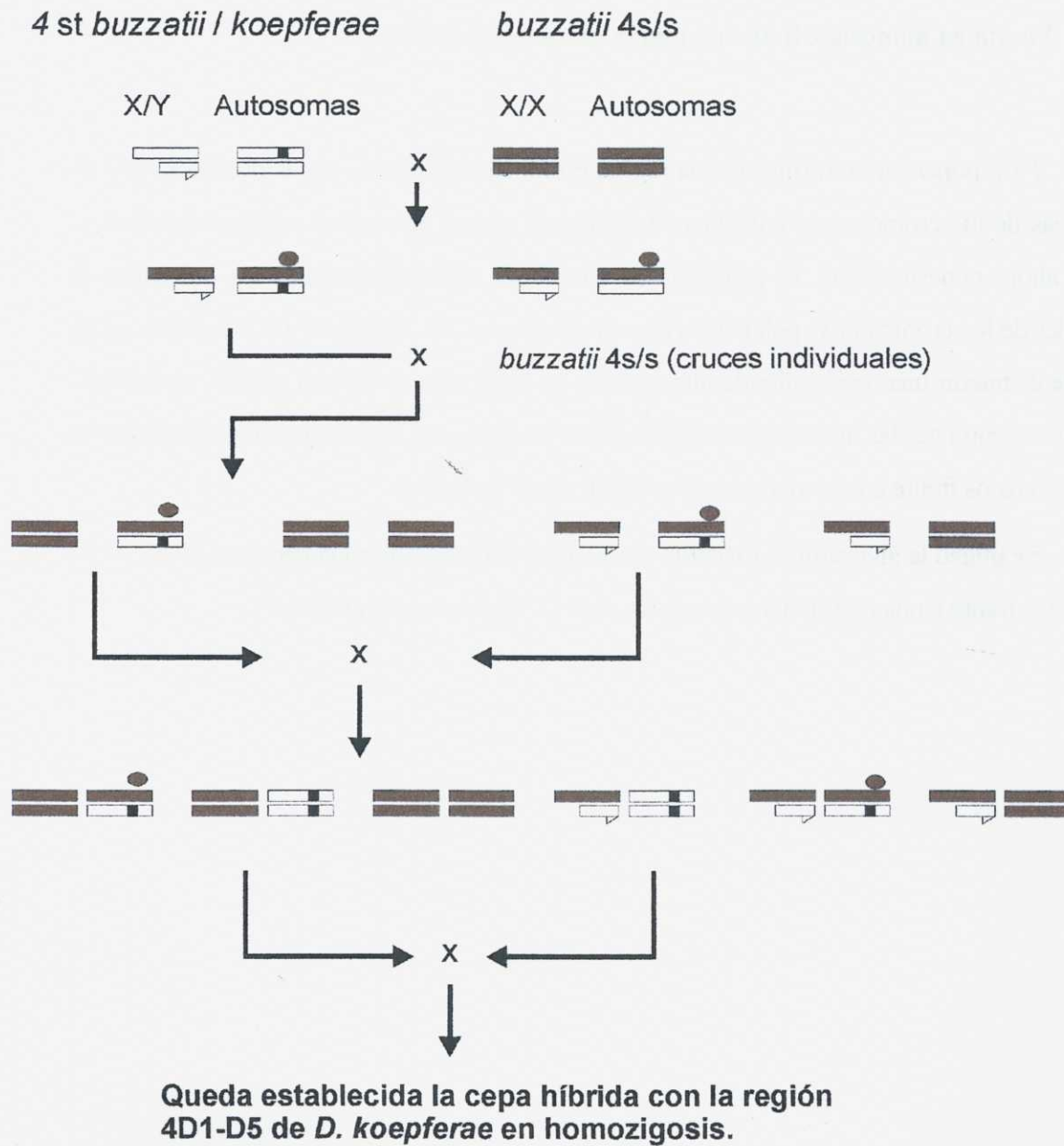


Figura 2.3.3: Protocolo de cruzamientos para poner en homocigosis una región del cromosoma 4 de *D. koepferae* (representada como un cuadrado negro en la figura). 4 st.: ordenación estándar del cromosoma 4; 4s: inversión s del cromosoma 4. La aparición del pequeño bucle sobre los cromosomas representa la presencia de la inversión en heterocigosis.

2.3.4 Análisis de los machos híbridos inviables.

Se utilizaron placas con un lecho de papel de filtro empapado en solución salina (CINa 0,9%). Se siembran dos placas con aproximadamente 50 larvas de tercer estadio de machos w^+ y otras dos placas control con 50 larvas de tercer estadio de machos w . Es posible distinguir el sexo en larvas de tercer estadio mediante la observación directa de los tamaños gonadales, también podemos distinguir el fenotipo asociado al locus white mediante la observación de los tubos de Malpighi de estas mismas larvas. Posteriormente se procede a rajar con unas agujas el puparium de los individuos que no han eclosionado para analizar el estado de los mismos.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.4.1 Datos sin transformar.

2.4.1.1 Análisis de frecuencias.

Se aplicará la prueba χ^2 sobre los datos en bruto bajo el supuesto de dos tipos de hipótesis nulas:

A) El primer tipo de hipótesis se refiere a la homogeneidad de los datos de cada grupo de líneas (réplicas) dentro de un tipo de cruce. La hipótesis nula supondrá que esos datos pertenecen a la misma población de datos y por tanto pueden ser agrupados y posteriormente contrastados frente al segundo tipo de hipótesis nula.

B) El segundo tipo de hipótesis se refiere a los valores esperados de una de dos clases de datos (por ejemplo frecuencia de machos w^+ en relación al total de individuos w^+). El valor esperado vendrá dado por la hipótesis nula en cuestión; por ejemplo 4% de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ en presencia de la región X distal de *D. koepferae* introgrado en heterozigosis en *D. buzzatii*.

A) Prueba de homogeneidad para varias muestras. El estadístico utilizado es:

$$\lambda_H = \sum_i^r \sum_j^k \frac{\left(x_{ij} - \frac{n_i \cdot n_j}{n} \right)^2}{\frac{n_i \cdot n_j}{n}}$$

que sigue aproximadamente una distribución χ^2 con $(k-1) \times (r-1)$ grados de libertad si no existe una diferencia significativa entre las frecuencias observadas y las esperadas.

Siendo:

x_{ij} = valor de la clase j en la línea i .

n_i = sumatorio de los valores de las k clases en la línea i .

n_j = sumatorio del valor de la clase j a lo largo de todas r las líneas.

$$n = \sum_{i=1}^r n_i = \sum_j^k n_j$$

k = número de clases.

r = número de líneas.

Sabiendo que matemáticamente el contraste de homogeneidad de varias muestras y el de independencia de caracteres (prueba de contingencia) resultan técnicamente idénticos (García, 1992).

H_0 : Todas las muestras proceden de la misma población y pueden por tanto agruparse.

Regla de decisión:

Si $\lambda_H < \chi^2_{(r-1)(k-1), \epsilon}$ aceptamos H_0 a un nivel ϵ .

Si $\lambda_H \geq \chi^2_{(r-1)(k-1), \epsilon}$ rechazamos H_0 a un nivel ϵ .

B) Prueba de bondad de ajuste χ^2 : La hipótesis a contrastar es si la variable observada sigue una determinada distribución modelo. En realidad trabajamos en todos los casos con una variable aleatoria binomial y lo que contrastamos es la bondad de los ajustes a determinados valores de la media de esa distribución binomial. El estadístico utilizado es:

$$\lambda = \sum_i^k \frac{(n_i - n \cdot p_i)^2}{n \cdot p_i}$$

que sigue aproximadamente una distribución χ^2 con $k-1$ grados de

libertad.

Siendo:

n_i = número observado de casos de la clase i

p_i = la proporción esperada de la clase i según la distribución modelo.

n = el número total de casos observados.

Contrastaremos una serie de hipótesis diferentes:

1.- H_0 : frec machos w^+ / individuos w^+ totales $\in (0,04 - 1)$ tomando unos valores u otros según las hipótesis que pongamos a prueba (por ejemplo, $p_0 =$

0,04: inviabilidad de machos portadores de la región X distal de *D. koepferae*; $p_0 = 0,5$: viabilidad total; $0,5 > p_0 > 0,04$: viabilidad parcial de los mismos).

2.- H_0 : frec machos w^+ / machos totales $\in (0,04 - 1)$ tomando unos valores u otros según los casos (inviabilidad de machos portadores de la región X distal de *D. koepferae* o viabilidad total o parcial de los mismos).

3.- H_0 : Porcentaje de líneas de primera o segunda generación de retrocruzamientos que presentan viabilidad de machos (se hará necesario dar una definición de línea con viabilidad de machos en su descendencia).

Regla de decisión:

Si $\lambda < \chi^2_{k-1, \epsilon}$ aceptamos H_0 a un nivel ϵ .

Si $\lambda \geq \chi^2_{k-1, \epsilon}$ rechazamos H_0 a un nivel ϵ .

Corrección de Yates para muestras pequeñas:

1) Se aplica sistemáticamente cuando hay 1 grado de libertad.

2) En muestras pequeñas con frecuencias esperadas entre 5 y 10.

En general esta corrección no afecta a la significación de los valores de χ^2 excepto cuando estos se hallan cerca de los valores críticos, siendo conservadora en el efecto que provoca (tiende a aceptar la hipótesis nula).

La corrección es:
$$\lambda = \sum_i^k \frac{(|n_i - n \cdot p_i| - 0,5)^2}{n \cdot p_i}$$

Limitaciones de la χ^2 :

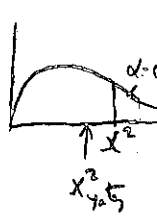
1) Trabaja con valores absolutos.

2) La frecuencia esperada dentro de cualquier clase debe ser mayor o igual que 5, ($np_i \geq 5$).

Debido a esta última limitación y en los conjuntos no agrupables de datos se aplica la fórmula:

nº individuos = (5 / % de frecuencia de machos esperados) x 100.

Handwritten notes:
 V. Torres 82
 D. Aguirre el aldo
 el χ^2 de Yates es demasiado conservador e inapropiado



Con la cual obtenemos unos valores de 125 individuos ($n \geq 125$) como mínimo para contrastar la hipótesis de inviabilidad en que la frecuencia esperada de machos es 0,04, por ello al realizar los análisis línea por línea (en los conjuntos de datos no agrupables) y puesto que en realidad la bondad del ajuste la estamos refiriendo sólo a la media de la distribución que ya sabemos que es binomial, se sustituye (en las líneas donde $n < 125$) la prueba χ^2 de bondad de ajuste por un contraste de hipótesis relativas a la media de una población binomial para muestras grandes ($n > 30$) (ver más adelante).

En los contrastes de porcentajes de líneas inviables en los retrocruces, cuando procede, se aplica la fórmula:

n° líneas contrastable = 5 x (fracción esperada de líneas inviables en la descendencia)⁻¹, (la fracción esperada se obtiene según un modelo de cadenas de Markov; ver más adelante), que nos proporciona un valor de 10 líneas como mínimo para poder contrastar mediante la prueba χ^2 de bondad de ajuste la hipótesis de la presencia de un solo supresor en la F₁.

2.4.1.2 *Contraste de hipótesis relativas a la media de una población binomial. Muestras grandes.*

Se define la variable aleatoria binomial “aparición de macho w^+ ”: El número de machos w^+ , que denotamos como x , respecto al total n de individuos w^+ (machos y hembras), nos dá la proporción que llamamos p . El estimador de máxima verosimilitud de la frecuencia de machos w^+ por línea, es $p = x/n$ y el valor esperado de la varianza muestral es $p(1-p)/n$. El intervalo I de confianza al $(1-\varepsilon)\%$ viene dado por $I = [p - Z_{\varepsilon/2} (pq/n)^{1/2}, p + Z_{\varepsilon/2} (pq/n)^{1/2}]$, siendo $q = 1 - p$ (Sokal & Rohlf, 1984).

Sea una muestra de $X_1 \dots X_n$ (aparición de machos) de variables $B(1, p)$, es decir variables que toman sólo los valores 1 (macho w^+) ó 0 (hembra w^+), siendo la probabilidad del valor 1 el parámetro p .

$$H_0: p = p_0$$

$$H_1: p \neq p_0$$

El contraste óptimo:

$$\text{Se acepta } H_0 \text{ si } \frac{|p - p_0|}{\left(\frac{p_0 \cdot q_0}{n}\right)^{1/2}} \leq Z_{\alpha/2}$$

$$\text{Se rechaza } H_0 \text{ si } \frac{|p - p_0|}{\left(\frac{p_0 \cdot q_0}{n}\right)^{1/2}} > Z_{\alpha/2}$$

Siendo p = frecuencia relativa de machos w^+ .

$$q = 1 - p$$

$$n = \text{número total de individuos } w^+.$$

2.4.1.3 Contraste secuencial de Bonferroni.

Considérese el caso en que se aplican dos o más contrastes (por ejemplo binomiales) que se refieren a una misma hipótesis nula sobre una tabla de datos no agrupables, de modo que el rechazo de la hipótesis nula sólo es posible cuando alguno o algunos de los contrastes son significativos individualmente. En este caso si no se realiza un ajuste en función del número de contrastes realizados, la probabilidad de error tipo I (ϵ : probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo cierta) se incrementa monótonamente en función del número de contrastes del grupo (Rice, 1989).

Sea una hipótesis nula compuesta $H_{0,c}$ como, por ejemplo, $H_{0,c}$: inviabilidad de machos híbridos en todas las k líneas (réplicas) de un determinado tipo de cruce. Si no podemos agrupar los datos, para mantener un nivel de significación ϵ en todos los contrastes realizados se aplica la técnica secuencial de Bonferroni (Holm, 1979; Rice, 1989). También se aplica esta técnica en el caso de datos agrupables en que se rechaza la hipótesis nula compuesta. Se incrementa, de este modo, la potencia a la hora de poder detectar más de una línea falsa para $H_{0,c}$.

Para aplicar esta técnica se fijó un nivel ϵ de significación. A continuación se reemplazó el valor de cada contraste binomial (o χ^2) por su valor P (mínimo nivel de significación que permite rechazar la hipótesis nula) y se ordenaron éstos de menor (P_1) a

mayor (P_k). Llegados a este punto, el contraste secuencial de Bonferroni se realizó del siguiente modo:

I) Si $P_k \leq \epsilon/k$, ello es condición suficiente (aunque no necesaria) para que todas las k líneas se rechacen a un nivel ϵ para la hipótesis nula.

II) Si no se cumple I), entonces:

II-1) Si $P_1 \leq \epsilon/k$ esta línea es significativa a un nivel ϵ . En caso contrario se acepta la hipótesis nula para todas las líneas.

II-2) Si, y sólo si, se cumplió la condición anterior, entonces si $P_2 \leq \epsilon/(k-1)$ esta línea es significativa a un nivel ϵ y pasa a compararse la siguiente en orden ascendente en cuanto a su valor P (P_3). Si $P_2 > \epsilon/(k-1)$ este contraste y los correspondientes a los restantes con valores de P mayores se aceptan para la hipótesis nula.

En general el contraste es: $P_i \leq \epsilon/(1+k-i)$ y se aplica de modo secuencial y en orden ascendente según los valores de P (de menor a mayor) de manera que en cuanto una desigualdad no se cumple, esa línea y todas las que tienen valores P mayores, se aceptan para la hipótesis nula.

2.4.1.4 Cálculo de la potencia en un contraste para una variable aleatoria binomial $B(n,p)$.

Se definió la función de verosimilitud $L(\theta)$ para un caso particular de la variable binomial (Larson, 1990; Cuadras, 1991), se aplicó el lema de Neyman-Pearson obteniéndose finalmente la función de potencia:

$$W \subset S / X > np_0 + Z_{(1-\epsilon)} (np_0q_0)^{1/2} \quad 2.4.1.4.1$$

donde W es la región crítica óptima, S es el espacio muestral, X es $B(n, p_0)$ y $Z_{(1-\epsilon)}$ es el valor tabulado de la normal estándar para la probabilidad $1-\epsilon$.

Se obtuvo finalmente la fórmula:

$$(n)^{1/2} = [Z_{(1-\beta)} (p_1q_1)^{1/2} + Z_{(1-\epsilon)} (p_0q_0)^{1/2}] / (p_1-p_0) \quad 2.4.1.4.2$$

que permite calcular los tamaños de muestra necesarios (n) para discernir entre la hipótesis nula (p_0) y la alternativa (p_1) con una potencia ($1-\beta$) y nivel de significación (ϵ) dados.

2.4.2 Datos transformados. Transformación por la raíz cuadrada del arcoseno.

Como dijimos, cuando los tamaños de muestra eran pequeños no utilizamos los contrastes χ^2 sino un contraste para una variable binomial. En estos casos la media es p y la varianza es $\frac{p \cdot q}{n}$. Esta varianza depende del parámetro p que se está estimando. Es posible que queramos comparar la varianza de poblaciones de datos que se hallen bajo valores distintos en el rango de $p \in (0-1)$; luego sería deseable que la varianza no dependiera de p . Para ello aplicamos a los datos una transformación por la raíz cuadrada del arcoseno (Ahearn & Templeton, 1989). La transformación es $a_i = (1/2) \times [\arcsen\left(\frac{x_i}{n_i + 1}\right)^{1/2} +$

$$\arcsen\left(\frac{x_i + 1}{n_i + 1}\right)^{1/2}]$$

Este estadístico a_i es asintóticamente normal con media $\arcsen p^{1/2}$ y varianza $\frac{1}{4 \cdot n_i}$.

La varianza ahora es independiente del estimador y está determinada totalmente por el tamaño de la muestra. Debido a estas deseables propiedades estadísticas, aplicaremos la transformación por el arcoseno a todos los datos y no sólo a los conjuntos de datos heterogéneos y de tamaño muestral pequeño.

Para estudiar si dos proporciones p_1 y p_2 son distintas, se aplica el estadístico

$$z = \frac{(a_1 - a_2)}{\left(\frac{1}{4 \cdot n_1} + \frac{1}{4 \cdot n_2}\right)^{1/2}}, \text{ que sigue una } N(0,1) \text{ bajo } H_0: p_1 = p_2.$$

El estadístico $H = 4 \cdot \sum_i^I n_i \cdot (a_i - a_m)^2$, donde $a_m = \sum_i^I \frac{n_i \cdot a_i}{N}$ y $N = \sum_i^I n_i$, sigue una χ^2_{I-1} bajo H_0 de homogeneidad. Si los datos son homogéneos, la media arcsen $p^{1/2}$ viene estimada por a_m y la varianza de a debería ser $\frac{1}{4 \cdot N}$.

Una estima insesgada de esta varianza es $s_{am}^2 = \frac{H}{4 \cdot N \cdot (I - 1)}$ (I es el número total de muestras). Pero si se rechaza la hipótesis de homogeneidad, esto significa que s_{am}^2 contiene otra componente de la varianza además de la debida al muestreo. Se calcula $V_g = s_{am}^2 - \frac{1}{4 \cdot N}$.

El estadístico $t = \frac{(a_i - a_m)}{\left(\frac{1}{4 \cdot n_i} + s_{am}^2\right)^{1/2}}$, donde a_i es el valor de la línea i o el promedio

de un grupo homogéneo de datos, y a_m y s_{am}^2 son la media y varianza muestral de un grupo heterogéneo de datos. Permite comparar, por ejemplo, si una línea o grupo de líneas tienen las mismas frecuencias de machos que en el grupo heterogéneo de datos. De modo que se acepta la hipótesis si $t \leq t_{gt, \epsilon}$.

Para estudiar si dos varianzas genéticas halladas eran o no distintas se utilizó:

1) $H_0: \sigma_1^2 \leq \sigma_2^2$, se acepta H_0 si $V_{g1}/V_{g2} \leq F_{n1-1, n2-1; \epsilon}$.

2) $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$, se acepta H_0 si $V_{g1}/V_{g2} \in [1/F_{n2-1, n1-1; \epsilon}, F_{n1-1, n2-1; \epsilon}]$.

La comparación se establece siempre de modo que V_{g1} sea siempre la varianza de mayor valor (García, 1992).

2.4.3 Cadenas de Markov.

Se aplicará un modelo de cadenas de Markov para discutir la existencia o no de más de un supresor interactuando con un gen letal.

2.4.3.1 Modelo de las cadenas de Markov (tomado a partir de Cuadras, 1990).

Sea un espacio de probabilidades finito (Ω, A, P_0) . Sean E_0, E_1, E_m los átomos de álgebra A , de modo que:

$$\Omega = E_0 + \dots + E_1 + E_m$$

$$\text{siendo } P_0(E_0) = \gamma_0^{(0)}, \text{ y } P_0(E_m) = \gamma_m^{(0)}$$

El vector $\gamma^{(0)} = (\gamma_0^{(0)}, \dots, \gamma_m^{(0)})$ es la distribución inicial del sistema, mientras que los E_0, \dots, E_m son los estados del sistema. $\gamma^{(0)}$ describe la probabilidad P_0 definida sobre el álgebra.

Sea ahora una sucesión de experiencias e_0, e_1, \dots, e_n , cada una de ellas asociada a los espacios de tiempo $0, 1, \dots, n$. Se define análogamente el vector fila $\gamma^{(n)} = (\gamma_0^{(n)}, \dots, \gamma_m^{(n)})$, que describe la distribución del sistema en la experiencia n (prueba o paso n). Si w es el resultado de e_n y w pertenece a E_i se dice entonces que estamos en el estado E_i en el paso n .

Se llama probabilidad de transición en el paso n a:

$\gamma_{ij}^{(n)} = P(E_j^{(n)} / E_{i_0}^{(0)}, E_{i_1}^{(1)}, \dots, E_{i_{n-1}}^{(n-1)})$ es decir a la probabilidad de pasar del estado E_i en el paso $n-1$ al estado E_j en el paso n , habiendo pasado por los estados E_{i_0}, E_{i_1}, \dots en los pasos anteriores. En general esta probabilidad depende de estos estados anteriores.

Se dice que la sucesión de experiencias e_0, e_1, \dots, e_n , constituye una **cadena de Markov** si las probabilidades de transición verifican:

$\gamma_{ij}^{(n)} = P(E_j^{(n)} / E_{i}^{(n-1)})$, es decir sólo dependen del estado del sistema en el paso anterior. Así, la probabilidad de encontrarnos en el estado E_j en el paso n , depende del resultado de la experiencia e_{n-1} y no de las e_0, e_1, \dots, e_{n-2} .

Digamos ahora que la ecuación de Chapman-Kolmogorov nos permite conocer la probabilidad de pasar del estado E_i al E_j en cualquier número de pasos (n pasos). Esta ecuación es $\gamma_{ij}^{(n)} = \sum_{k=1}^{n-1} \gamma_{ik}^{(h)} \gamma_{kj}^{(r)}$; siendo $r = n-h$; $1 \leq h < n$ para $n \geq 2$.

Condición de homogeneidad:

Una cadena de Markov es homogénea en el tiempo si $\gamma_{ij}^{(n)} = \gamma_{ij}$; o sea las probabilidades de transición de un estado a otro son independientes del paso o prueba en el que estemos (probabilidades de transición estacionarias). Si ello es así se define P como la matriz de transición de la cadena homogénea. Cada γ_{ij} representa la probabilidad (que no depende de n) de pasar del estado E_i al estado E_j al cambiar del instante $(n-1)$ al instante n .

Se verifica: a) P es matriz estocástica. b) Si $P(n)$ es la matriz de transición en n pasos, $P(n) = P^n$. c) $\gamma^{(n)} = \gamma^{(0)} P^n$

Entonces podemos expresar la ecuación de Chapman-Kolmogorov matricialmente, $P^{(n)} = P^{(h)} * P^{(r)} = P^h * P^r$, ($n = r+h$).

Estados absorbentes: Un estado E_j de una cadena de Markov homogénea es absorbente si $\gamma_{jj} = 1$, es decir una vez que se llega a él ya no se puede salir.

Probabilidades de primera pasada:

Se definen las probabilidades de primera pasada como $f_{ij}^{(n)}$ es decir la probabilidad de que partiendo de i la cadena pase por primera vez por el estado j en la etapa n . La probabilidad total de, partiendo de i , pasar alguna vez por j , $f_{ij} = \sum_{n=1}^{\infty} f_{ij}^{(n)}$.

Definamos también la variable aleatoria N_{ij} = número de la primera etapa en la cual la cadena pasa por j cuando la posición inicial es i .

Entonces $f_{ij}^{(n)} = P(N_{ij} = n)$ y $f_{ij} = P(N_{ij} < \text{infinito})$.

Caso de los estados absorbentes:

Se demuestra que la probabilidad de absorción en un estado absorbente i es:

$f_{ji} = \gamma_{ji} + \sum_{k \in T} \gamma_{jk} f_{ki}$ para todo j perteneciente a T (T es el subconjunto de estados de transición, es decir, aquéllos que no son ni recurrentes ni absorbentes). Tenemos pues un sistema de tantas ecuaciones como incógnitas. Esta probabilidad tenderá a 1 en el caso de que sólo tengamos estados de transición y un único estado absorbente (o recurrente) (por

ejemplo, si pudiéramos considerar el aislamiento reproductivo como único estado absorbente en una hipotética cadena de Markov de la divergencia entre dos poblaciones, se tendería al estado de aislamiento reproductivo).

También se demuestra que los tiempos medios de primera pasada $E(N_{ij})$ (y última en el caso absorbente) vendrán dados por $E(N_{ij}) = \sum_{k \neq j} \gamma_{ik} E(N_{kj}) + 1$ y tenemos pues, para j fijo, un sistema de tantas ecuaciones como incógnitas $E(N_{ij})$.

Método matricial de cálculo de probabilidades de primera pasada y tiempos medios:

Si una cadena de Markov tiene r estados absorbentes, la matriz de transición se puede expresar (reordenando filas y columnas) como una matriz llamada forma canónica de la matriz de transición:

$$P = \begin{pmatrix} I & 0 \\ A & P_1 \end{pmatrix}$$

Dónde:

I es una matriz identidad de orden r ,

0 es una matriz nula de orden $r \times (m-r)$

P_1 es matriz cuadrada de orden $(m-r)$ y está formada por los estados de transición.

El número medio de veces n_{ik} que el sistema pasa por el estado E_k partiendo de E_i antes de ser absorbido es cada uno de los elementos de la matriz $N = (n_{ik})$, siendo $N = (I - P_1)^{-1}$.

El número medio de pasos hasta alcanzar un estado de absorción partiendo de E_i es n_i

$$= \sum_{k=r+1}^m n_{ik}$$

2.4.3.2 Aplicación del modelo de cadenas de Markov a sistemas de letal-supresores dentro de las especies de Drosophila.

Se pretende demostrar mediante un ejemplo la adecuación del modelo matemático al caso de los híbridos interespecíficos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Para ello partiremos del caso más sencillo que será fácilmente generalizable una vez establecido.

Ejemplo: Supongamos un sistema formado por dos genes conespecíficos, uno de los cuales está ligado al cromosoma X y actúa como letal recesivo (o específico de sexo) si no estuviera presente el otro gen, que actúa como supresor dominante (basta su presencia en heterozigosis para contrarrestar el efecto letal). Este podría ser el caso de los híbridos introgresivos entre dos especies, que tras sucesivas generaciones de retrocruzamientos han perdido por recombinación el gen supresor mientras que, por selección mediante un marcador morfológico (por ejemplo), se ha mantenido presente el letal en heterozigosis. Podemos pues definir a priori dos estados distintos E_i , a saber $E_1 = L+Su$, $E_0 = L$. (L es el letal; Su es el supresor en heterozigosis). Podemos también definir la probabilidad $P_n(E_i)$ de hallarse en el estado E_i en una generación n cualquiera, y un vector fila $\gamma^{(n)} = (\gamma_1^{(n)}, \gamma_0^{(n)})$ que describe la distribución del sistema en la generación n ésima, este $\gamma^{(n)}$ describe la probabilidad P_n . Como ya sabemos $\Omega = E_1 + E_0$; siendo E_1, E_0 átomos del algebra A ; entonces (Ω, A, P_0) es un espacio de probabilidades finito. E_i son los estados del sistema y $\gamma^{(0)}$ representa la distribución inicial del sistema que en nuestro caso corresponderá a los descendientes de la primera generación o F_1 (las madres de cruces R1 en nuestro diseño de retrocruces) donde siempre está presente el supresor en heterozigosis porque está fijado en una de las especies progenitoras, luego $\gamma^{(0)} = (\gamma_1^{(0)}, \gamma_0^{(0)}) = (1, 0)$, es decir la probabilidad del estado uno es 1 al comenzar el proceso. Consideramos ahora la sucesión de experiencias (R1, R2, ..., Rn) que llamamos retrocruzamientos y que definimos como el cruce de una hembra híbrida que pertenecerá al E_1 o al E_0 con un macho que no pertenece a ninguno de los dos estados y que por lo tanto no aporta nada a nuestro sistema. Si seleccionamos siempre las hijas de estos cruces que sean portadoras del letal (bien sea porque tenemos un marcador morfológico o porque podemos hacer un seguimiento citológico, o ambos), tendremos entonces dos posibles tipos de hijas según pertenezcan al E_1 (portadoras del supresor en heterozigosis) o al

E_0 (no portan el supresor). Siendo esto así, la probabilidad de que una hembra en cualquier generación sea portadora del supresor (pertenezca a E_1) o por el contrario no lo sea, dependerá exclusivamente de que su madre fuera también portadora o no del supresor. Es decir, la probabilidad de transición entre dos estados en el paso que va de la generación $n-1$ a la n será:

$$\gamma_{ij}^{(n)} = P(E_j^{(n)} / E_i^{(n-1)}),$$

(para todo $i, j \in \{1,0\}$), que es la condición necesaria y suficiente para que la sucesión de experiencias R_1, R_2, \dots, R_n constituya una cadena de Markov. Además debido al propio diseño de los retrocruzamientos y a la Teoría Cromosómica de la Herencia podremos decir también que $\gamma_{ij}^{(n)} = \gamma_{ij}$; es decir las probabilidades de transición entre estados son estables en el tiempo (no dependen del número de la generación), lo que constituye el cumplimiento de la *condición de homogeneidad* que nos permite definir la matriz de transición P , que en nuestro caso es:

$$P = \begin{pmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{10} \\ \gamma_{01} & \gamma_{00} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/2 & 1/2 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Como sabemos $\gamma^{(1)} = \gamma^{(0)} \times P$, como $\gamma^{(0)} = (1,0)$ tendremos $\gamma^{(1)} = (1/2, 1/2)$, que corresponde a la distribución general del sistema tras una generación de retrocruzamiento; esto es, en el caso de un supresor en el paso de la R1 a la R2 sólo la mitad de las líneas (en promedio) seguirán manteniendo el supresor. Es decir, si bien las hembras progenitoras de la R1 son todas portadoras de un supresor en heterocigosis ($\gamma^{(0)} = (1,0)$), de las hembras progenitoras de la R2 sólo la mitad (en promedio) serán portadoras de un supresor en heterocigosis ($\gamma^{(1)} = (1/2, 1/2)$). Con lo cual será de esperar que todas las líneas R1 presenten viabilidad de machos portadores del letal (viabilidad definida -ver Resultados- como número de machos significativamente mayor del esperado si el letal se manifiesta de modo completo), mientras que sólo la mitad de las líneas debieran presentar este efecto en la R2 si es cierta la hipótesis de un supresor. A su vez la frecuencia de machos portadores del letal que sobreviven por cada línea se corresponderá con el valor γ_{11} , es decir, la probabilidad de mantenerse en el estado que presenta supresor (probabilidad de heredar el supresor si la madre lo tiene), que en este caso es $1/2$.

El caso general, para cualquier número n de supresores, será:

$$\gamma_{ij} = \binom{i}{j} (1/2)^i \text{ si } i \geq j \quad (1)$$

$$\gamma_{ij} = 0 \text{ si } i < j$$

donde $i, j \in (n, 0)$.

Y la distribución de estados $\gamma^{(t)} = (\gamma_n^{(t)}, \dots, \gamma_0^{(t)})$ en cualquier generación t será:

$$\gamma^{(t)} = \gamma^{(0)} P^t \quad (2)$$

2.4.4 La función generatriz de momentos. Cálculo de la varianza de $R_c = P_e / P_i$.

En el estudio comparativo de las tasas de esterilidad e inviabilidad (capítulo 3.6 de Resultados) fue necesario el cálculo del error asociado a la estima del cociente $R_c = P_e / P_i$ en que ambas partes de dicho cociente corresponden a dos variables aleatorias binomiales, a saber, número de cruces híbridos en *Drosophila* con esterilidad o con inviabilidad, respectivamente.

Sea $P_e = y/n$, $P_i = x/n$. Donde y es el número de cruces híbridos con descendencia viable-estéril y x el número de cruces híbridos con inviabilidad. n es el número total de casos considerado. El cociente $P_e / P_i = y/x$.

Se definen las variables aleatorias (v.a), $X(x)$: número de casos de inviabilidad que ocurren en la muestra de cruces interespecíficos, $Y(y)$: número de casos con viabilidad y esterilidad en esa misma muestra y $Z(z) = g[X(x)] = 1/X(x)$ para todo $x > 0$.

Consideremos las funciones de probabilidad $PX(x) = \binom{n}{x} P_i^x Q_i^{n-x}$ donde $Q_i = 1 - P_i$.

$PY(y) = \binom{n}{y} P_e^y Q_e^{n-y}$ donde $Q_e = 1 - P_e$. Además, dado que X es v.a discreta y g es

estrictamente monótona, tenemos que $PZ(z) = PX(g^{-1}(z)) = PX(x)$ para todo $x > 0$ (Larson, 1990, pag. 137).

La varianza del cociente X/Y es la del producto ZY y para obtenerla utilizaremos la función generatriz de momentos para (Z,Y) (Larson, 1990). Se llama función generatriz de momentos para (Z,Y) a la función

$$m_{Z,Y}(t_1, t_2) = E[e^{t_1 Z + t_2 Y}] \quad (2.4.4.1)$$

(siempre y cuando exista la esperanza).

El que esta función genere momentos se puede resolver tomando las derivadas parciales de $m_{Z,Y}$ con respecto a t_1 y t_2 y después calculando los valores de estas derivadas en el origen.

De forma general,

$$\frac{\partial^{i+j}}{\partial t_1^i \partial t_2^j} m_{Z,Y}(t_1, t_2) = E[Z^i Y^j e^{t_1 Z + t_2 Y}] \quad (2.4.4.2)$$

Podemos obtener los momentos de Z derivando exclusivamente respecto a t_1 y los de Y derivando respecto a t_2 . Además, si Z e Y son independientes, es posible expresar los momentos mezclados m_{ij} como producto de los correspondientes m_{i0} , m_{0j} .

La varianza de $R_c =$ varianza de ZY ,

$$\sigma_{R_c}^2 = m_{22} - \mu_{R_c}^2 = m_{20} m_{02} - (m_{10} m_{01})^2 \quad (2.4.4.3)$$

que finalmente queda,

$$\sigma_{R_c}^2 = \sigma_Z^2 (\sigma_Y^2 + \mu_Y^2) + \sigma_Y^2 \mu_Z^2 \quad (2.4.4.4)$$

donde (en términos de frecuencias):

$$\sigma_x^2 = \sigma_{P_i}^2 = P_i Q_i / n;$$

$$\sigma_Y^2 = \sigma_{P_c}^2 = P_c Q_c / n;$$

$$\sigma_Z^2 = \sigma_x^2 / \mu_x^4 n^2;$$

$$\mu_Y = P_c;$$

$$\mu_Z = 1/(\mu_x).$$

2.5 ANÁLISIS MOLECULAR

2.5.1 Obtención de ADN para sonda.

Los ADNs de *Sxl* y *T4* fueron amablemente cedidos por José Barral en forma de clones de ADN genómico. Para la obtención del ADN de *BR-C (Broad-Complex)* se siguió el proceso que se detalla a continuación.

2.5.1.1 Extracción de ADN a partir de una mosca.

Material y soluciones:

Tampón de homogenización

Tampón de lisis

Acetato potásico (KAc) 8M

Fenol-cloroformo-isoamílico 1:1

Cloroformo-isoamílico

Etanol 100% y 70%

Mortero estéril

Tubo de 1,5 ml

DEPC.

TE

Procedimiento

1. Homogenizar 1 mosca de la especie *D. melanogaster* dentro de un tubo "epENDORP" con 50 µl de tampón de homogenización utilizando un mortero estéril.
2. Añadir 50 µl de tampón de lisis al que se le añadió 1% de DEPC justo antes.

3. Incubar a 70°C 15 min.
4. Enfriar a TA y añadir 15 µl de KAc 8M.
5. Incubar en hielo 30 min.
6. Centrifugar 5 min a máxima revolución.
7. Trasladar el sobrenadante a un nuevo tubo teniendo cuidado de no arrastrar el "pellet".
8. Realizar dos extracciones del sobrenadante con fenol-cloroformo.
9. Precipitar el ADN añadiendo 2 volúmenes de etanol 100% e incubar a TA 5 min.
10. Centrifugar a TA 5 min.
11. Descartar el sobrenadante. Lavar el "pellet" con etanol 70% y secar al vacío.
12. Disolver el "pellet" en 20 µl de TE y añadir 1 µl de RNasa.

2.5.1.2 *Electroforesis de ADN en gel de agarosa.*

Cuando fue necesario se estimó el tamaño de fragmentos de ADN o simplemente se comprobó la existencia de ADN mediante movilidad electroforética en minigeles de agarosa y tinción específica de ácidos nucleicos con Bromuro de Etidio. Como control de tamaños de ADN se utilizó el patrón de restricción del fago λ cortado con Hind III.

Los minigeles se confeccionaron en un molde de 10 x 8 cm con 25-50 ml de tampón TBE 1x y agarosa (1-2 %). Como tampón de carga para la incorporación del ADN a los pocillos se utilizó Azul de Bromofenol 0,042%; Sacarosa 6,67%. Las condiciones de corrido fueron: 80-120 V y 100-180 mA.

El Bromuro de Etidio se añadió al gel antes de su solidificación a una concentración de 0,5 µg/ml. La visualización se realizó con lámparas UV de emisión a 302 nm.

2.5.1.3 Amplificación por RCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Se utiliza un programa de 40 ciclos y 55°C de temperatura de anillamiento. Los iniciadores o “primers” corresponden a los extremos 5' y 3' de una porción de 200 pb de la región “core” de *Broad-Complex*.

Material y soluciones:

Taq ADN Polimerasa (Pharmacia)

Tampón 10x (Pharmacia)

Mezcla dNTPs (Pharmacia o Boehringer)

H₂O mq estéril

iniciador 5'

iniciador 3'

ADN.

Procedimiento:

1. A un tubo de 0,5 ml añadir:

72,5 µl de H₂O mq estéril

10 µl tampón 10x

2 µl dNTPs

5 µl iniciador 5'

5 µl iniciador 3'

0,5 µl taq

5 µl de ADN de extracción de una mosca

2. Añadir 100 µl de aceite.
3. Utilizar un programa de 40 ciclos y 55 °C de temperatura de anillamiento (95°C, 5 min seguido de 40 ciclos de: 95°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C 1 min 30 seg y finalmente: 72°C 10 min).

2.5.1.4 Ligación del ADN amplificado al vector pGEM-T (protocolo pGEM-T easy vector system. Promega™).

Previamente se estima la concentración óptima de inserto para una relación molar vector:inserto de 1:1 mediante la fórmula:

$$[\text{inserto}] = [\text{vector}] \times \text{Kb de inserto} \times \text{razón molar} / \text{Kb vector}$$

1. A un tubo "eppendorf" de 0,5 ml añadir:

tampón 10x de T4 ADN-ligasa	1 µl
vector pGEM-T	1 µl
ADN producto de amplificación por PCR	1 µl
T4 ADN-ligasa	<u>1 µl</u>
H ₂ O mq estéril hasta	10µl

Debiendo pipetarse lo menos posible.

2. Se deja la reacción toda la noche a 4°C.

2.5.1.5 Transformación bacteriana.

Se utilizó el método de choque térmico para las células JM109 de alta eficiencia de pGEM-T (protocolo de pGEM).

Material y soluciones:

ADN producto de la ligación

Células competentes de alta eficiencia (pGEM-T)

SOC.

Procedimiento:

1. Añadir 5 μ l de ADN ligado a un tubo de 1,5 ml en hielo.
2. Añadir a ese mismo tubo 50 μ l de células competentes de alta eficiencia y mezclar cuidadosamente dando ligeros toquillos al tubo (no pipetear).
3. Dejar 20 min en hielo.
4. Dar un choque térmico a 42°C, 50 seg.
5. Dejar 2 min en hielo.
6. Añadir 950 μ l de SOC a TA.
7. Cultivar en agitación 110 min a 37°C (150 rpm).

2.5.1.6 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes (complementación- α).

El gen *lac-Z*, incluido en el vector de clonación, codifica la subunidad amino-terminal de la β -galactodidasa. Intercalado en su secuencia se encuentra el lugar de multiclonación del plásmido, sin que ello suponga una interrupción del patrón de lectura. El genotipo de la cepa bacteriana JM109 de alta eficiencia utilizada como receptora en la transformación es *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F', *traD36*, *proAB*, *lac^Z* Δ M15] (Messing *et al.*, 1981) y codifica para la subunidad carboxi-terminal del mismo enzima. Ninguna de las dos subunidades proteicas es activa por separado, pero se pueden asociar para formar una proteína enzimáticamente funcional. Este fenómeno es conocido como complementación- α (Ullman *et al.*, 1967).

Las bacterias Lac⁺ resultado de la complementación- α son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia de un substrato cromogénico, el azúcar 5-bromo-4-cloro-indolil- β -galactosidasa (X-gal) y un inductor necesario para la síntesis de proteína, el isopropil - tio- β -D-galactósido (IPTG). La inserción de un fragmento de ADN en el lugar de policlonación del vector resulta en la producción de fragmentos N-terminales no funcionales en la complementación, de modo que las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes no tendrán la capacidad de degradar el X-gal y serán blancas.

Material y soluciones:

Placas de LB / agar / ampicilina

X-gal

IPTG (200 mg/ml)

Procedimiento:

1. Preparar placas de LB / agar / ampicilina (100 μ g/ml) y extender con una pipeta pasteur estéril doblada en forma de triángulo, 30 μ l de X-gal (20 mg/ml). Una vez absorbido, extender de igual modo 4 μ l de IPTG (200 mM) y esperar de nuevo a que sequen protegiéndolas de la luz.
2. Extensión de 300 μ l de células transformadas sobre placas de LB / agar / ampicilina /X-gal / IPTG.
3. Incubar a 37°C hasta el crecimiento de las colonias.

Para la selección de plásmidos recombinantes contenidos en las colonias blancas, se inocularon 5 ml de medio líquido con antibiótico (TB/ampicilina) con cada colonia y se cultivaron en agitación a 37°C hasta la saturación. A continuación se procedió a la extracción en serie de ADN plasmídico de cada cultivo, mediante la técnica de minipreparación de plásmido (ver siguiente apartado) y tratamiento con RNasa libre de DNasas. Seguidamente se sometieron los plásmidos a la digestión con la enzima de restricción adecuada (EcoRI en el

caso de pGEM-T easy), de modo que provocase la separación del inserto y del vector, permitiendo la confirmación final, mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.5.1.2), de que el inserto había sido clonado.

Finalmente el último paso en la obtención del ADN de *BR-C* para sonda fue la maxipreparación de plásmido (apartado 2.5.1.9) que permite obtener una cantidad suficientemente grande de ADN para un gran número de hibridaciones.

2.5.1.7 Minipreparación de plasmido. Adap. de Sambrook et al (1989).

Material y soluciones:

- Tubos de cultivo de 50 ml estériles. (4°C).
- Tubos “eppendorf” de 1,5 ml estériles.
- TB / Ampicilina.
- B1: Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-ClH 25 mM pH 8,0 (4°C).
- B2: NaOH 0,2 N; SDS 1% (m/v), (4°C) recién preparado.
- B3: Acetato 5M; K 3 M
- RNasa (5 µg/µl).
- Fenol-cloroformo-isoamílico.
- Etanol 70 y 100% (-20°C)
- TE

Procedimiento:

1. Inocular 7 ml de TB / Ampicilina y cultivar en agitación a 37°C hasta saturación.
 2. Llenar 4 “eppendorfs” y centrifugar a 12000g a TA, 1 min.
- En cada tubo:
3. Descartar el sobrenadante y secar bien el “pellet”.
 4. Resuspender el contenido en 100 µl B1 agitando vigorosamente (vortex).
 5. Añadir 200 µl de B2. Hielo 5 min.

6. Añadir 150 μ l de B3, mezclar suavemente por inversión del tubo. Hielo 5 min.
7. Centrifugar a 12000g, 10 min a TA.
8. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
9. Añadir 450 μ l de fenol-cloroformo 1:1.
- 10 Centrifugar 5 min TA.
11. Transferir el sobrenadante y precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol 100%, 5 min TA.
12. Centrifugar a 12000g, 10 min a TA.
13. Lavar el precipitado con etanol 70%.
14. Secar y resuspender el ADN de los 4 tubos en 25 μ l de TE. Añadir 1 μ l de RNasa.
15. Guardar a -20°C o a 4°C (a largo o corto plazo respectivamente).

2.5.1.8 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de cantidades de hasta 5 μ g de ADN se realizaron en volúmenes de entre 10 y 20 μ l, con 1-5 unidades de enzima y se incubaron a 37°C un mínimo de 120 min.

2.5.1.9 Maxipreparación de plásmido. Adap. de Sambrook et al (1989).

Material y soluciones:

- | | |
|---|--------------------------------|
| - Tubos Erlenmeyer de 100 ml estériles. | - B2: NaOH 0,2N; SDS 1% |
| - Tubos Corex de 50 ml. | (m/v), (4°C) recién preparado. |
| - TB / Ampicilina (100 μ g/ μ l). | - B3: Acetato 5M; K 3 M (4°C). |
| - B1: Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; | - RNasa (5 μ g/ μ l). |

- Tris-ClH 25 mM pH 8,0 (4°C).
- Lisozima (10 mg/ml en 10 mM Tris-ClH, pH 8,0)
- Gasa y embudo
- Fenol-cloroformo-isoamílico.
- Etanol 70 y 100% (-20°C)
- TE

Procedimiento:

1. Inocular 100 ml de TB / Ampicilina con 100 µl del cultivo utilizado para la minipreparación de plásmido en el cual se halló inserto. Crecer en agitación a 37°C hasta saturación.
2. Centrifugar 50 ml a 4000g, 10 min a 4°C. Repetir.
3. Descartar sobrenadante y dejar el tubo invertido para que seque.
3. Resuspender el "pellet" en 10 ml de B1, mezclar vigorosamente con el vortex.
4. Añadir 1 ml de solución de lisozima recién preparada (10 mg/ml en 10 mM Tris-ClH, pH 8,0).
5. Añadir 20 ml de B2 recién preparada.
6. Mezclar invirtiendo los tubos e incubar 10 min TA.
7. Añadir 15 ml de B3 fría (4°C). Agitar varias veces. Guardar 10 min en hielo. Se formará un precipitado blanco y floculento que consiste en ADN bacteriano, ARN de elevado peso molecular y complejos de membranas / proteínas / potasio / SDS
8. Centrifugar sin freno a 4000g, 10 min a 4°C.
9. Transferir filtrando con embudo y gasa, el sobrenadante a un nuevo tubo.
10. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar bien y dejar a TA 10 min.
11. Centrifugar (ya con freno) a 4000g, 10 min a TA.
12. Descartar el sobrenadante y resuspender con 1,5 ml de H₂O cada tubo que seguidamente se dividirá en 3 "eppendorfs" con 500 µl cada uno.
13. Añadir 500 µl de fenol-cloroformo 1:1.
14. Centrifugar 5 min TA.

15. Transferir el sobrenadante y precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol 100%, 5 min TA.
16. Centrifugar a 12000g, 10 min a TA.
17. Lavar el precipitado con etanol 70%.
18. Secar y resuspender el ADN de los 3 tubos en 500 µl de TE. Añadir 1 µl de RNasa.
19. Guardar a -20°C o a 4°C (a largo o corto plazo respectivamente).

2.5.2 Hibridación in situ sobre cromosomas politénicos.

Se utilizaron dos protocolos diferentes de hibridación in situ: el primero para sonda marcada con digoxigenina y detección mediante fosfatasa alcalina y el segundo, debido a los problemas encontrados en nuestro laboratorio para hibridar sondas heterólogas de *D. melanogaster* sobre *D. buzzatii* o *D. koepferae*, utilizando el equipo Elite ABC Vectastain para sonda marcada con biotina y detección mediante peroxidasa. La diferencia entre ambos protocolos radica fundamentalmente en el proceso de posthibridación y detección. Por otro lado, con digoxigenina se utilizó la técnica de marcaje de "iniciación al azar" ("random priming") y con biotina la de "traslado de la mella" ("nick translation").

2.5.2.1 Preparaciones de cromosomas politénicos.

La obtención de las preparaciones para la hibridación *in situ* sobre cromosomas politénicos de *Drosophila*, se llevó a cabo siguiendo un compendio de los protocolos tradicionales (Bhadra y Chatterjee, 1986), con algunas ligeras variaciones.

Material y soluciones:

Acético 50%

Solución de fijación (1:2:3 = láctico 86%: H₂O: acético)

Cubreobjetos (“cubres”) siliconizados

Cuchilla de afeitar

Portaobjetos (marcados)

Nitrógeno líquido o hielo seco

Procedimiento:

1. Disección de larvas de tercer estadio en acético 50%.
2. Fijación: Transferir las glándulas a una gota de solución de fijación sobre un cubre objetos siliconizado. Es fundamental la limpieza del cubreobjetos, deben estar sumergidos en alcohol 96% y secarse antes de su uso. Fijar durante 2-5 min.
3. Colocar con suavidad un portaobjetos limpio sobre el cubre. Dar la vuelta a la preparación y colocar los portas con ligera inclinación y con una tira de papel en los bordes del cubre de modo que se genere una corriente del líquido de fijación, dejar 10 min, mirar las preparaciones al microscopio.
4. Cuando los cromosomas estén bien estirados y la preparación limpia, colocar la preparación sobre un lecho de papel de filtro y presionar, primero suavemente y luego muy fuertemente teniendo cuidado de que el cubre no se mueva lo más mínimo hacia los lados. Se deben observar las preparaciones en contraste de fase, los cromosomas han de ser grises, si no, volveremos a presionar fuertemente hasta que las bandas más negras adquieran una tonalidad grisácea.
5. Dejar las preparaciones toda la noche a 4°C (antes marcar la posición de los cromosomas con un lápiz de diamante).
6. Sumergir la preparación en nitrógeno líquido (o congelar en hielo seco durante 2-5 min colocando la preparación sobre un lecho de hielo con el cubre hacia arriba).

Arrancar el cubre con una cuchilla de afeitar (no dejar que las preparaciones se descongelen durante el proceso) y sumergir en etanol absoluto a -20 °C durante 2 h.

7. Secar al aire en atmósfera libre de polvo. Guardar a 4°C en atmósfera seca y libre de polvo, hasta la hibridación.

Nota: Antes de la hibridación las preparaciones deben ser examinadas con contraste de fase, secas. Los cromosomas deben ser planos, grises, sin refringencia y con el patrón de bandas reconocible.

Sonda: Se utilizaron como sonda sendos clones de ADN genómico de los genes *Sxl* y *T4* de *D. melanogaster* marcados con digoxigenina (equipo de marcaje de Boehringer) según el protocolo de Boehringer Mannheim (método de marcaje "iniciación al azar"). También se utilizó sonda de ADNc de la región "core" de *Broad-Complex* de *D. melanogaster* marcada con biotina según el protocolo de Gibco BRL (método de marcaje "traslado de la mella").

2.5.2.2 Marcaje de ADN con digoxigenina mediante la técnica de iniciación al azar.

Material y soluciones:

Equipo de marcaje (Boehringer Mannheim).

ADN molde linearizado y purificado (entre 10 y 3000 ng).

EtOH 100 y 70%.

CiLi 4M.

EDTA 0,2M pH 8,0.

H₂O mq.

TE.

Procedimiento:

1. Añadir a un eppendorf en hielo:

10 ng-3mg ADN lineal purificado, hervir 10 min (95°C) y pasar rápidamente a hielo.

2 ml de mezcla de hexanucleótidos (equipo de marcaje).

2 ml de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato marcados (equipo de marcaje).

1 ml de enzima Klenow (2 unidades) (equipo de marcaje).

Rellenar hasta 19 ml con H₂O mq.

2. Centrifugar brevemente e incubar al menos 1 h (hasta 20 h para maximizar el rendimiento) a 37°C.

3. Añadir: 2 ml EDTA 0,2 M pH 8,0; para parar la reacción. Precipitar con 2,5 ml LiCl 4M y 75 ml de etanol precongelado. Mezclar bien.

4. Dejar el tubo, al menos 30 min a -70°C o toda la noche a -20°C.

5. Centrifugar a 12000 g's durante 10 min. Lavar el pellet con 40 ml de etanol congelado (70% v/v), centrifugar de nuevo.

6. Secar al vacío y disolver durante 30 min a 37°C en 50 ml de TE. Guardar a -20°C.

2.5.2.3 *Marcaje de ADN con biotina mediante la técnica de traslado de la mella.*

Material y soluciones:

Equipo de marcaje (Gibco BRL)

ADN molde (entre 1-5 µg).

EtOH 100%.

AcNa 3M.

H₂O mq.

Tampón de hibridación.

Procedimiento:

1. Añadir a un eppendorf en hielo:
 - 10 µl mezcla de dNTPs (equipo de marcaje)
 - 10 µl ADN maxipreparación de plásmido
 - 70 µl H₂O mq estéril
 - 10 µl mezcla de enzima (equipo de marcaje).
2. Mezclar bien y pulso de centrifuga (máx. rpm 5 sec).
3. Incubar a 16°C durante 3 h.
4. Añadir 10 µl de tampón de paro (equipo de marcaje).
5. Calentar a 65°C 5 min.
6. Poner en hielo.
7. Añadir 11 µl de AcNa 3M.
8. Añadir 240 µl de etanol enfriado a - 20°C
9. Dejar a - 20°C toda la noche.
10. Centrifugar a 15000 g 15 min.
11. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado de ADN.
12. Resuspender en 100 µl de tampón de hibridación.
13. Guardar a - 20°C.

La hibridación con digoxigenina se realizó utilizando como base el método descrito por Rosa de Frutos (Rosa de Frutos *et al.*, 1990) al que se le añadió alguna pequeña modificación para adecuarlo a las condiciones de nuestro laboratorio. Para la detección con fosfatasa alcalina se utilizó el equipo de detección de Boehringer Mannheim. La hibridación con biotina se realizó según el protocolo de Segarra y Aguadé (1993). Para la detección con peroxidasa se utilizó el equipo de detección de Elite ABC Vectastain. En ambos casos los pasos de prehibridación e hibridación son iguales pudiendo variar las condiciones de

astringencia: 40% formamida y 4x SSC (*sxl* y *T4* con digoxigenina) y 50% formamida y 6x SSC (*Broad-Complex* con biotina) el proceso de posthibridación sin embargo es distinto.

Prehibridación.

Solución de prehibridación: para 6 portas; (40% formamida y SSC 4x, que son condiciones de baja astringencia).

72 µl. de formamida.

36 µl. de SSC 20x.

9 µl. de esperma de arenque (10mg/ml).

36 µl. de Dextrano Sulfato 50%.

2 µl de H₂O mq.

2.5.2.4 Desnaturalización de los cromosomas politénicos antes de la hibridación:

Material y soluciones:

Portaobjetos con los cromosomas perfectamente extendidos y aplastados.

SSC 2x.

EtOH 30%, 50%, 70%, 95%.

NaOH 0,07N.

Procedimiento:

1. Incubar preparaciones en SSC 2x (precalentado a 70°C) 30 min a 70-80 grados centígrados.
2. Deshidratar en etanol 70% a TA durante 10 min y en etanol 95% durante 5 min. Secar al aire (15 min - 1 h).
3. Desnaturalizar incubando los portas 2-5 min en 0,07 N NaOH recién preparado.

4. Lavar tres veces 5 min en SSC 2x a TA.
5. Repetir paso 2.
6. Secar las preparaciones al aire 15 min - 1h.

Desnaturalización de la sonda antes de la hibridación.

Añadida la sonda a la solución de prehibridación se centrifuga brevemente. Calentamos a 90°C durante 5 min o 75°C 15 min (no se puede hervir debido a la formamida). Pasamos a hielo durante 5 min. Centrifugamos brevemente.

2.5.2.5 Hibridación.

Material y soluciones:

Portaobjetos con los cromosomas desnaturalizados.

Cubreobjetos no siliconizados.

Cámara de incubación (placa de Petri de vidrio, 15 cm de diámetro).

Solución de hibridación (con sonda).

Formamida 40%.

SSC 4x.

Procedimiento:

1. Añadir 20 - 30 μ l. de la solución de hibridación sobre el porta, y colocar un cubreobjetos no siliconizado.
2. Incubar en cámara húmeda (con solución de formamida 40% en SSC 4x) a 37°C toda la noche.

2.5.2.6 Posthibridación (fosfatasa alcalina).

Material y soluciones:

PBS

SSC 4x

NaCl 3M

Na-Citrato 0,3M; pH 7,0 (20 °C)

Tampón I: 100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7.5 (20°C)

Tampón II: 0.5% (w/v) agente bloqueante en tampón I

Tampón III: 100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9.5

Tampón IV: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0 (20°C)

Solución de color: 4.5 µl. de NBT (equipo de detección) y 3.5 µl. de X-fosfato (equipo de detección) se añaden a 1 ml de tampón III.

" La solución de color debe prepararse en el momento, a oscuras y mantenerse protegida de la luz".

Procedimiento:

Lavados y detección:

1. Retirar los cubreobjetos bañando las preparaciones en SSC 4x a TA durante 5 min.
2. Lavar en PBS durante 2 min, limpiar exceso de tampón.
3. Lavar los portas en tampón I dos veces 3 min.
4. Incubar los portas 30 min en el tampón II.
5. Lavar los portas en el tampón I dos veces por 5 min.

6. Diluir el conjugado de anticuerpo (vial 8) a 1:500 en tampón I. Colocar 30 µl. de la dilución en cada portaobjetos y poner un cubre no siliconizado.
7. Incubar 1 h a TA en cámara húmeda (con tampón I).
8. Lavar los portas en el siguiente orden, con ligera agitación : Tampón I dos veces 15 min; tampón III dos veces 15 min.

Reacción de color:

Se colocan 30 µl. de la solución de color por porta y se pone un cubre no siliconizado. Se incuba en la oscuridad a TA. A las cuatro horas se observa en contraste de fase, si la reacción de color no se ha desarrollado todavía ponemos una nueva gota de solución de color y continuamos la incubación. La preparación debe exponerse a la luz lo menos posible. No se debe agitar o mezclar mientras la reacción se desarrolla.

Paro de la reacción:

Una vez la reacción se ha completado, paramos la reacción lavando los portas en el tampón IV. Las preparaciones las secamos al aire.

Las preparaciones se analizaron entre 24-48 h después de la hibridación en un microscopio de contraste de fase y se tiñeron posteriormente con una dilución 1:10 de orceina-acético láctica en agua, facilitándose así su estudio al microscopio.

2.5.2.7 Posthibridación (peroxidasa).

Material y soluciones:

PBS

SSC 6x

Tris 50 mM pH 7,6

BSA (bovin seroalbúmina)

Solución A (equipo Vectastain)

Solución B (equipo Vectastain)

DAB (SIGMA D - 5637)

H₂O₂ al 30%

Tampón P (fosfato): 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, pH 7,0

Giemsa

Xileno.

Procedimiento:

1. Lavar dos veces en 6x SSC a la temperatura de hibridación durante 10 min cada.
2. Lavar dos veces en 6x SSC a TA durante 10 min cada.
3. Lavar una vez en PBS a TA durante 5 min. No dejar que las preparaciones se sequen a partir de este paso.
4. Preparar la siguiente mezcla (A + B) para 10 preparaciones:
 - 210 µl de tampón Tris-BSA (4% BSA en 50 mM Tris pH 7,6)
 - 3,5 µl solución A (equipo de Vectastain)
 - 3,5 µl solución B (equipo de Vectastain)
5. Dejar reposar la mezcla durante 10-15 min.

Detección:

6. Poner 20 µl de mezcla A + B sobre cada preparación y cubrir con un cubre o parafilm.
7. Incubar a 37°C en cámara húmeda 1 h 30 min.
8. Lavar tres veces con PBS a TA durante 10 min cada.

9. Preparar y mantener en hielo la siguiente mezcla (Tris-DAB):
 - 12 ml Tris 50 mM pH 7,6
 - 6 mg DAB (SIGMA D-5637; concentración final en Tris: 0,5 mg/ml)
10. Justo antes de usar esta mezcla, añadirle 24 μ l de H₂O₂ al 30%.
11. Drenar exceso de PBS y poner 500 μ l de mezcla Tris-DAB- H₂O₂ sobre cada preparación y cubrir con parafilm.
12. Incubar a 37°C 5-16 h.
13. Lavar una vez con PBS a TA durante 5-60 min.
14. Teñir con 5% Giemsa en tampón P a TA durante 1 min.
15. Lavar bajo el grifo.
16. Secar al vacío.
17. Aclarar sumergiendo las preparaciones en xileno 1-10 seg.
18. Lavar en H₂O destilada.

Las preparaciones se pueden observar al microscopio óptico tanto en contraste de fase como en campo claro.

2.5.3 Obtención de una microgenoteca de la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

(Esta parte del trabajo fue realizada junto al profesor Dr. J. A. Erik Edstrom en su laboratorio del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Lund (Suecia)).

2.5.3.1 Preparación de cromosomas politénicos para microdissección (Ashburner, 1989).

Material y soluciones:

Cubreobjetos (32 × 24 mm y 18 × 18 mm) siliconizados y sin siliconizar.

Portaobjetos.

Solución de siliconización.

CINa 0,9% en agua.

Ácido acético 45%

Nitrógeno líquido.

Cuchilla de afeitar.

EtOH 100%, 95% y 70%.

Procedimiento:

1. Disección de glándulas salivares en 0,9% CINa en agua.
2. Transferir las glándulas a una gota de acético 50% situada sobre un cubreobjetos grande (32×24 mm), limpio y sin tratar. Este cubreobjetos se puede depositar previamente sobre un portaobjetos, dejándose filtrar entre ambos una gota de agua destilada. Es útil realizar una pequeña muesca en una esquina del cubreobjetos antes de todo el proceso.
3. Aplastar la preparación con un cubreobjetos pequeño (18×18 mm) que esté bien siliconizado. La exposición de las glándulas al acético debe ser mínima, para evitar la depurinización del ADN (no más de 2 min).
4. Sumergir el "sandwich" de cubres en nitrógeno líquido para liberar posteriormente el cubre pequeño con una cuchilla de afeitar.
5. Lavar inmediatamente el cubreobjetos grande en etanol 70% durante 5 min y repetir.
6. Secar al aire. Las preparaciones se pueden almacenar a TA, en una caja limpia, entre papel de filtro.

2.5.3.2 Microdissección y microclonación de la región XA2a-A2c del cromosoma X politénico de D. koepferae.

El método seguido es similar, pero con algunas modificaciones, al que se encuentra en Ashburner 1989.

Materiales y soluciones:

Es necesario un *microscopio no invertido* con condensador de contraste de fase de larga distancia (suficiente para la cámara de aceite).

Micromanipulador Fonbrune montado frente al microscopio de modo que esté perfectamente fijado.

Cámara de aceite (figura 2.5.2.2.1) que consiste en un cristal de unos 6 mm con una cavidad central que se llena con aceite de parafina. Lo ideal es obtener las cámaras a partir de un bloque de cristal grueso. Si las cámaras se montan pegando bloques de cristal, deben lavarse dejándolas en EDTA 2mM y 2-mercaptoetanol 10mM durante toda la noche, a fin de eliminar los residuos oxidantes del pegamento.

Cubreobjetos siliconizados, es importante que los cubreobjetos sean menos repelentes al agua que la micropipeta, puesto que de no ser así las soluciones tenderán a pegarse a la micropipeta en vez de depositarse sobre el cubreobjetos.

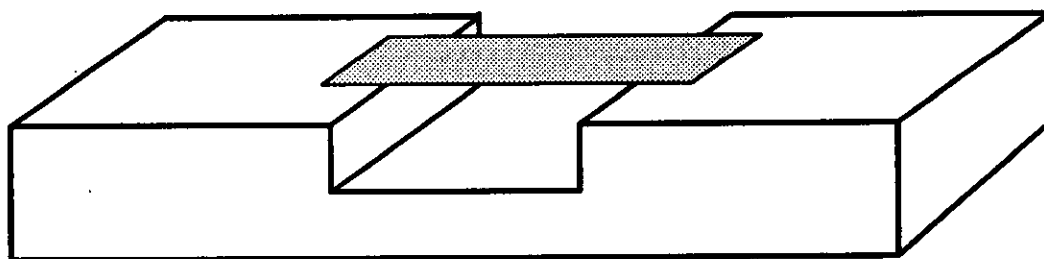


Figura 2.5.2.2.1: Esquema de la cámara de aceite con el cubreobjetos.

Aceite de parafina: Se satura aceite de parafina (Merck n°. 7161) con tampón R y se guarda en una botella sobre tampón R.

Agujas: A partir de barras de 2mm estirando bajo una llama hasta alcanzar 0,5 mm de diámetro y finalmente con un "electrode puller". Debe doblarse el final de la parte estrecha hasta un ángulo de 40-50° en una microforja.

Micropipetas: A partir de vidrio de alto punto de fusión (Pyrex o Duran). Se recomiendan tubos de 10 mm de diámetro (paredes de 1 mm) para un mejor resultado. Se pondrán estas bajo una llama de gas de acetileno para obtener capilares de 1 mm de diámetro. Estos (o los capilares comerciales de 1 mm) se calientan sobre una llama de alcohol y se estiran 2 cm, para obtener un grosor de 0,2-0,3 mm de diámetro. Entonces se moldea un gancho calentando el capilar próximo al extremo distal (figura 2.5.2.2.2). Se introduce el brazo largo de este gancho en un tubo de vidrio de 3 mm de diámetro y se sella el capilar dentro del tubo con cera fundida. Se monta todo verticalmente en la microforja con el gancho y el brazo corto del tubo de vidrio orientados hacia la derecha. A continuación, se hace primero una curva de 30° para que la pipeta pueda alcanzar el techo de la cámara, y se une luego un peso al gancho, de modo que, éste se estire según se calienta. Debe utilizarse el menor calor posible, con el alambre de platino lo más próximo posible a la pipeta. Aunque no fue nuestro caso, se pueden obtener pipetas volumétricas haciendo dos constricciones con el filamento de la microforja (figura 2.5.2.2.2 b-f, tomada de Ashburner, 1989).

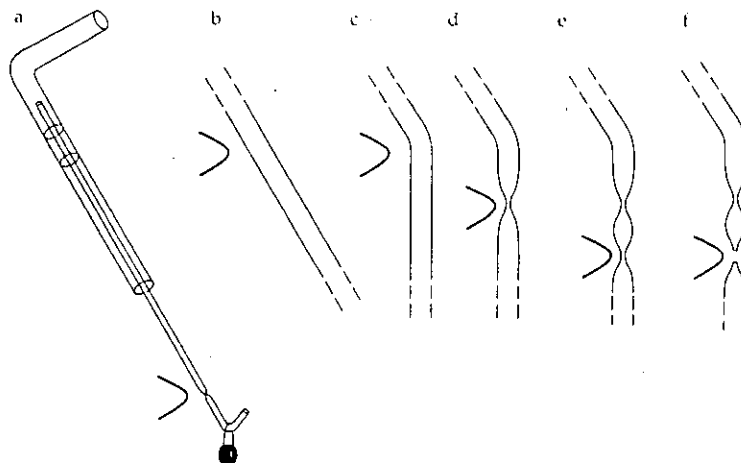


Figura 2.5.2.2.2: Construcción de micropipetas para microclonación. En a, la micropipeta se inserta en el tubo de sujeción, se fija con cera. A su vez éste se acopla en la microforja, y se le coloca un peso (1-2 g) al gancho. En b-f, se utiliza el filamento caliente de la microforja para modelar, mediante constricciones, una cámara (tomado de Ashburner, 1989).

Las micropipetas se sujetan con pegamento a las jeringas montadas de tal forma que la jeringa puede estar conectada a la pipeta o al aire. Se siliconizan las pipetas con 2% dimetildiclorosilane en cloroformo y se dejan en agua hasta su uso.

Cámara húmeda.

Fenol.

Tampón R.

Tampón de extracción (proteínasa).

Eco RI, solución stock de 200 unidades/ μ l.

Fago λ , λ NM1149 EcoRI, digerido y resuspendido a 200 μ g/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 5mM y ATP 2mM.

Ligasa de ADN, 1 unidad/ml.

Equipo de Stratagene para empaquetamiento del fago.

E. coli, cepas Q358 y POP13b.

Procedimiento:

Trabajando en la cámara de aceite.

Un cubreobjetos a modo de puente retiene el aceite dentro de la cámara (figura 2.5.2.2.1). Por la parte frontal se introducen los instrumentos y por la parte posterior se colocan los cubreobjetos con las gotas de las distintas soluciones. Deben siliconizarse los cubreobjetos portadores de las soluciones.

Microdissección.

1. Se coloca un cubreobjetos conteniendo dos pequeñas gotas de glicerol, en la cámara con la gota orientada hacia el aceite.
2. Se introduce en una micropipeta aceite de parafina hasta cierta distancia a partir de la base para que las soluciones acuosas siempre estén en contacto con aceite y nunca con el aire.

3. Se coloca el cubreobjetos con las preparaciones cromosómicas en la cámara de aceite. Se disecciona la región de interés raspando con la punta de la microaguja. El eje del cromosoma debe permanecer perpendicular a la microaguja.
4. El material diseccionado, que se adhiere a la microaguja, se coloca en la gota de glicerol previamente preparada. Se pueden situar entre 1-5 pequeños fragmentos en la misma gota. La otra gota se utiliza como blanco para comparar. Se toman las coordenadas correspondientes a ambas gotas.
5. Se guardó la cámara de aceite en una cámara húmeda a 4°C hasta obtener el número deseado de fragmentos cromosómicos.
6. Se traspasa el ADN de la gota de glicerol a la gota de extracción y se coloca la cámara de aceite en la cámara húmeda a 37°C durante 60 min. Conviene utilizar una gota blanco donde se comprueba si todos los fragmentos han sido liberados. Se utiliza un punto como marca para orientarse y se toman las coordenadas de un eje (si hay varias gotas, que se ponen en línea).

Extracción de ADN.

1. Se coloca una gota de fenol, saturado con tampón R, en un cubre suplementario que se sitúa en la cámara de aceite.
2. Se transfiere 2 nl de fenol a la gota con el tampón de extracción y el ADN. El fenol rodea a la gota de extracción. Después de 2-3 min se retira el fenol con la micropipeta y se añade fenol fresco a la gota de extracción. Esto se repite 3 veces. Se realiza el proceso igual con la gota blanco la cual estará más limpia (no tiene proteína). Finalmente se retira el fenol, se eliminan todos los cubres menos el que contiene las gotas de ADN y se hace un cambio de cámara para dejar atrás un posible resto de fenol en el aceite. Se deja toda la noche en cámara húmeda a -20°C. No es necesario utilizar cloroformo puesto que el aceite realiza sobradamente esta función de eliminación del fenol. Por la mañana se realiza un nuevo cambio de cámara con nuevo aceite. Se elimina así todo posible resto de fenol que pudiera inactivar las enzimas de restricción.

Digestión.

1. Se utiliza una elevada concentración de enzima EcoRI. Se diluye a partir de la concentración stock (200 u/ μ l) en tampón H 10x. La gota se coloca en un cubre suplementario sobre la cámara y de ahí se añaden 0,5-1 nl a la solución de ADN. Se utiliza de nuevo una gota blanco sobre la que también se añade enzima.
2. Se añade tampón H en el fondo de la cámara de aceite mediante un papel empapado, porque se ha comprobado empíricamente que la digestión funciona así mejor (J. E. Edstrom, comunicación personal). Se deja incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 h.
3. La inactivación del enzima no se hace a 70°C porque así la inactivación no siempre es completa, lo cual genera múltiples problemas. Se realiza una doble extracción con fenol, lo cual obliga a un nuevo cambio de cámara, donde se deja durante 3-4 h.

Ligación.

1. Se coloca un cubre con una gota conteniendo ADN de λ NM1149 digerido con EcoRI próxima a otra gota conteniendo ligasa (1 u/ μ). Se añaden 0,5-1 nl de solución con el vector y 0,2-0,4 nl de ligasa a la gota conteniendo el ADN, para obtener un volumen final de 1,5-2 nl.
2. Se deja la reacción a 15°C toda la noche.

Empaquetamiento.

1. Se sumerge la cámara en una placa de Petri llena de aceite de parafina y se coloca 1 μ l de TE sobre la gota con ADN. Se pasa la gota con TE a un tubo eppendorf donde se realizará la reacción de empaquetamiento.
2. Se añaden 10 μ l "freeze-thaw lysate" (equipo Stratagene).
3. Se añaden 15 μ l "sonicate extract mix" (equipo Stratagene).
4. Se centrifuga brevemente la mezcla y se deja 2 h a TA

2.5.3.3 Recuperación de fagos con inserto.

Este protocolo se divide en 3 partes: 1. Obtención de células susceptibles de ser infectadas por fagos (células “plating”); 2. Extensión en placa de cultivos celulares para la multiplicación de los fagos; 3. Recuperación y conservación de los clones.

Material y soluciones:

Tubos de cultivo (50 y 250 ml).

Tubos de centrifuga (50 ml).

Tubos eppendorf de 1,5 ml estériles.

LB.

Maltosa 20% (w/v).

SO₄Mg 1 M. Estéril.

Placas de LB / agarosa de 14 cm diámetro.

LB top-agarosa.

Tampón SM (650 ml H₂O mg; 5,8 g NaCl; 2 g MgSO₄ 7 H₂O; 50 ml TrisHCl 1 M (pH 7,5); 5 ml gelatina 2 %, H₂O hasta 1 l. Esterilizar por autoclave.)

Cloroformo.

Dimetilsulfóxido.

Obtención de células competentes para infección por fago:

1. Preparar 100 ml de LB enriquecido con SO₄Mg y Maltosa a unas concentraciones de 10 mM y 0,2% respectivamente.
2. Inocular con una colonia de las células e incubar en agitación a 37° C hasta que el cultivo llegue a la fase estacionaria (DO_{600nm} = 1,0-1,2).

3. Centrifugar a 2500 g / TA / 10 min.
4. Resuspender en 10 ml SO₄Mg 10 mM y medir la densidad óptica del cultivo.
5. Centrifugar a 2500 g / TA / 10 min.
6. Resuspender en un volumen de SO₄Mg 10 mM de forma que la DO_{600nm} = 2,0 lo que supone una concentración de unas 10⁹ células/ml.
7. Incubar a 37°C durante 1 h.
8. Guardar a 4°C por un período máximo de 3 semanas.

Extensión en placa de cultivos celulares para la multiplicación de los fagos:

1. Inocular 100 µl de células competentes con una cantidad de fagos suficiente (8 µl).
2. Incubar en hielo 15-20 min.
3. Añadir 3,5 ml de LB / top-agarosa a 48° C, agitar y extender sobre la superficie de una placa de LB/agarosa precalentada a 37° C.
4. Enfriar 30 min a TA
5. Invertir la placa e incubar a 37° C hasta la aparición de las calvas de lisis.

Recuperación y almacenamiento de los clones:

Una vez extendidos sobre placa todos los fagos recombinantes (calvas de lisis), se absorben con una micropipeta (P1000) dos porciones de cada calva (o tocando con un palillo estéril) y se resuspenden por duplicado en tubos eppendorf marcados (un número por calva), conteniendo una de dos soluciones:

1. Solución de 4,7% cloroformo en SM, tras lo cual se almacenan a 4° C.
2. Solución de 7% dimetilsulfóxido en la de cloroformo anterior, tras lo cual se pueden almacenar a -70° C.

2.5.4 Hibridación de sondas de ADNc de *Broad-Complex* de *D. melanogaster* y ADNc obtenido a partir de ARNm de larvas de 3^{er} estadio de *D. buzzatii*, sobre la microgenoteca del XA2a-A2c de *D. koepferae*.

2.5.4.1 *Transferencia del ADN de las colonias a membrana.*

Las membranas utilizadas fueron membranas de nylon HybondTM-N de Amersham. El proceso de transferencia de las colonias a las membranas fue una adaptación del descrito en los manuales del proveedor, Amersham.

Material y soluciones:

Solución desnaturalizante: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M.

Solución neutralizante: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M (pH 7,2); EDTA 1mM.

SSC 2x

Procedimiento:

1. Colocar la membrana sobre las placas y marcar su posición perforando con una aguja en tres puntos simétricos. Esperar 1 min a que las células de las colonias se adhieran a la membrana.
2. Retirar cuidadosamente las membranas y depositarlas, con la cara con las colonias hacia arriba, sobre un papel de filtro empapado en solución desnaturalizante. Esperar 5 min.
3. Transferir en la misma posición a papel de filtro empapado en solución neutralizante. Esperar 3 min. Repetir con nuevo papel de filtro empapado en la misma solución.
4. Lavar las membranas en SSC 2x. Transferir a papel de filtro seco y dejar secar.

5. Se fija el ADN a la membrana en un "Ultraviolet Crosslinker CL-1000" de la casa UVP según instrucciones del manual.

2.5.4.2 *Marcaje de la sonda de ADNc de Broad-Complex con P³².*

Se utiliza como sonda el ADN de la porción core de *Broad-Complex* de *D. melanogaster*, que es motivo común en todos los transcritos del complejo. Como control se utiliza un ADN de *Sxl* también de *D. melanogaster* obtenido mediante amplificación por PCR (amablemente cedido por José Barral).

Se sigue el protocolo del equipo de marcaje de sondas de ADN, "Oligolabelling", de Pharmacia.

Material y soluciones

ADN (*BR-C* y *Sxl*).

H₂O mq.

Tampón de reacción (equipo "Oligolabelling" de Pharmacia).

[α -³²P] dCTP (Amersham AA005).

Fragmento Klenow (equipo "Oligolabelling" de Pharmacia).

Algodón.

Jeringa (1 cc.)

TE.

Sephadex G-50.

Procedimiento

Síntesis de la sonda:

1. Preparar el ADN en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

a. *BR-C* (2 tubos):

- 10 μl ADN *BR-C* (10 ng/ μl en H_2O mq).
- 24 μl H_2O mq.

b. *SxI* (1 tubo):

- 10 μl *SxI* PCR (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
- 24 μl H_2O mq.

2. Incubar a 100 °C durante 5 min y pasar a hielo (5 min.).

3. Añadir en el siguiente orden:

10 μl tampón de reacción.

5 μl [α - ^{32}P] dCTP (3000 mCi/nmol, Amersham AA005).

4. Añadir 1 μl del fragmento Klenow.

5. Incubar a 37 °C durante 1 h, y mientras preparar las columnas de purificación.

Preparación de las columnas de Sephadex G-50:

1. Colocar una bolita de algodón en el fondo de una jeringa de 1cc y aplastar contra el fondo.

2. Llenar 1/3 de la jeringa con TE con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas.

3. Lentamente añadir G-50 saturado en TE hasta llenar la columna. En la parte superior se debería apreciar la superficie ligeramente seca.

4. Centrifugar la jeringa en el interior de un tubo cónico de 15 ml durante 2 min a 1500 g's.

5. Eliminar el líquido del tubo cónico y colocar de nuevo la jeringa en su interior.

Purificación de la sonda:

1. Retirar la reacción del baño de 37 °C y añadir 150 μl de TE.

2. Añadir toda la reacción a la jeringa previamente preparada y centrifugar 2 min a 1500 g's.

3. Descartar la columna en el interior del contenedor de material radioactivo y comprobar la calidad de la sonda con el Geiger (debería dar señal máxima).
4. Transferir la sonda a un tubo eppendorf de 1,5 ml.
5. Incubar a 100 °C durante 10 min. Transferir a hielo unos instantes.

2.5.4.3 Síntesis de la sonda de ADNc marcada con P^{32} a partir de ARNm de larvas de 3er estadio de *D. buzzatii*.

Se siguen las indicaciones de Gibco BRL para la síntesis de ADNc marcado radiactivamente y el protocolo de Promega de síntesis de ADNc.

Material y soluciones

ARN de larvas de 3er estadio de *D. buzzatii* (obtenido por Manuel Gandarela)

H₂O DEPC tratada

dNTPs

[α -³²P] dCTP (Amersham AA005)

oligo dT (0,5 µg/µl)

5x Reaction Buffer (Promega)

inhibidor RNasa

AMV RT

RNasa H

Procedimiento

1. Preparar la mezcla de dNTPs (3,3 mM dATP, dGTP, dTTP, 0,13 mM dCTP).
2. En un tubo de 1,5 ml dejar secar 10 µl de [α -³²P] dCTP (10 uCi/µl, 3000 Ci/mmol, Amersham) y reservar hasta preparar la reacción.

3. En un tubo añadir:

H ₂ O DEPC tratada	5 µl
ARN total	3 µl (~2-5 µg)
Oligo dT (0,5 µg/µl)	<u>2 µl</u> (0,5 µg de primer/µg ARNm)
H ₂ O libre de nucleasas hasta	10 µl

4. Calentar a 70°C durante 10 min.

5. Pasar a hielo durante 5 min.

6. Añadir en este orden en el tubo que contiene el isótopo:

ARN	9,5 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
mezcla dNTPs	3 µl
inhibidor RNasa	2 µl (20 u)
AMV RT	<u>1,5 µl</u> (15 u)
H ₂ O libre de nucleasas hasta	20 µl

7. Mezclar pipeteando suavemente el tubo.

8. Incubar 1 h. 30 min. a 42 °C.

9. Añadir 4 µl de RNasa H e incubar a 37°C durante 30 min.

10. Purificar la sonda.

Los pasos de preparación de las columnas de Sephadex G-50 y de purificación de la sonda son idénticos a los de la síntesis de sonda radiactiva de *BR-C* y *Sxl*.

2.5.4.4 Hibridación y detección.

2.5.4.4.1 Sonda radiactiva.

Material y soluciones:

Membranas con al ADN de las colonias fijado.

Sonda de ADN marcado y desnaturalizado.

Solución de prehibridación: Para un volumen de 25 ml.

6,25 ml. SSPE 20x.

1,25 ml .Denhardt's solution 100x.

1,25 ml. SDS 10% (w/v).

Agua estéril hasta 25 ml.

Solución de ADN no homólogo fragmentado (1 mg/ml).

SSPE 2x.

SDS 0,1% (w/v).

Bolsas de plástico transparente para autoradiografía.

Película y "cassette" Amersham para autoradiografía.

Procedimiento:

1. Desnaturalizar el ADN no homólogo calentando a 100 °C, 5 min. Enfriar en hielo y añadir a la solución de prehibridación.
2. Prehibridar la membrana en una baño en agitación a 65 °C durante 1 h.
3. Desnaturalizar la sonda marcada calentando a 100 °C durante 5 min. Añadir la sonda a la solución de prehibridación.
4. Incubar a 65 °C durante al menos 12 h.

5. Lavar las membranas incubándolas en SSPE 2x y SDS 0,1% (w/v) a TA durante 10 min. Repetir.
6. Cambiar la solución por SSPE 1x y SDS 0,1% (w/v). Incubar a 65 °C durante 15 min.
7. Cambiar la solución por SSPE 0,1x y SDS 0,1% (w/v). Incubar a 65 °C durante 10 min, (este es un lavado de alta astringencia y debe omitirse si la homología de la sonda no es total).
8. Eliminar el exceso de solución en un pliego de papel Whatmann 3MM. Hay que evitar que los filtros se sequen.
9. Retirar las membranas, enfundarlas en los plásticos y colocar en un "cassette" con película de rayos X
10. Guardar a -80 °C hasta el revelado (24 h en un primer intento y si no hay señal dejar 5 días).

2.5.4.4.2 Sonda no radiactiva (biotina) (adaptación del protocolo de Vectastain, Kit Elite).

Material y soluciones:

Membranas con al ADN de las colonias fijado.

Sonda de ADN marcado y desnaturalizado.

Solución de prehibridación: Para un volumen de 50 ml.

40 ml Tris-CINa (Tris 0,1M 0,9%CINa).

3 g BSA.

50 µl SDS 10% (w/v).

Agua estéril hasta 50 ml.

Tris-CINa + 0,02% SDS

SDS 10% (w/v).

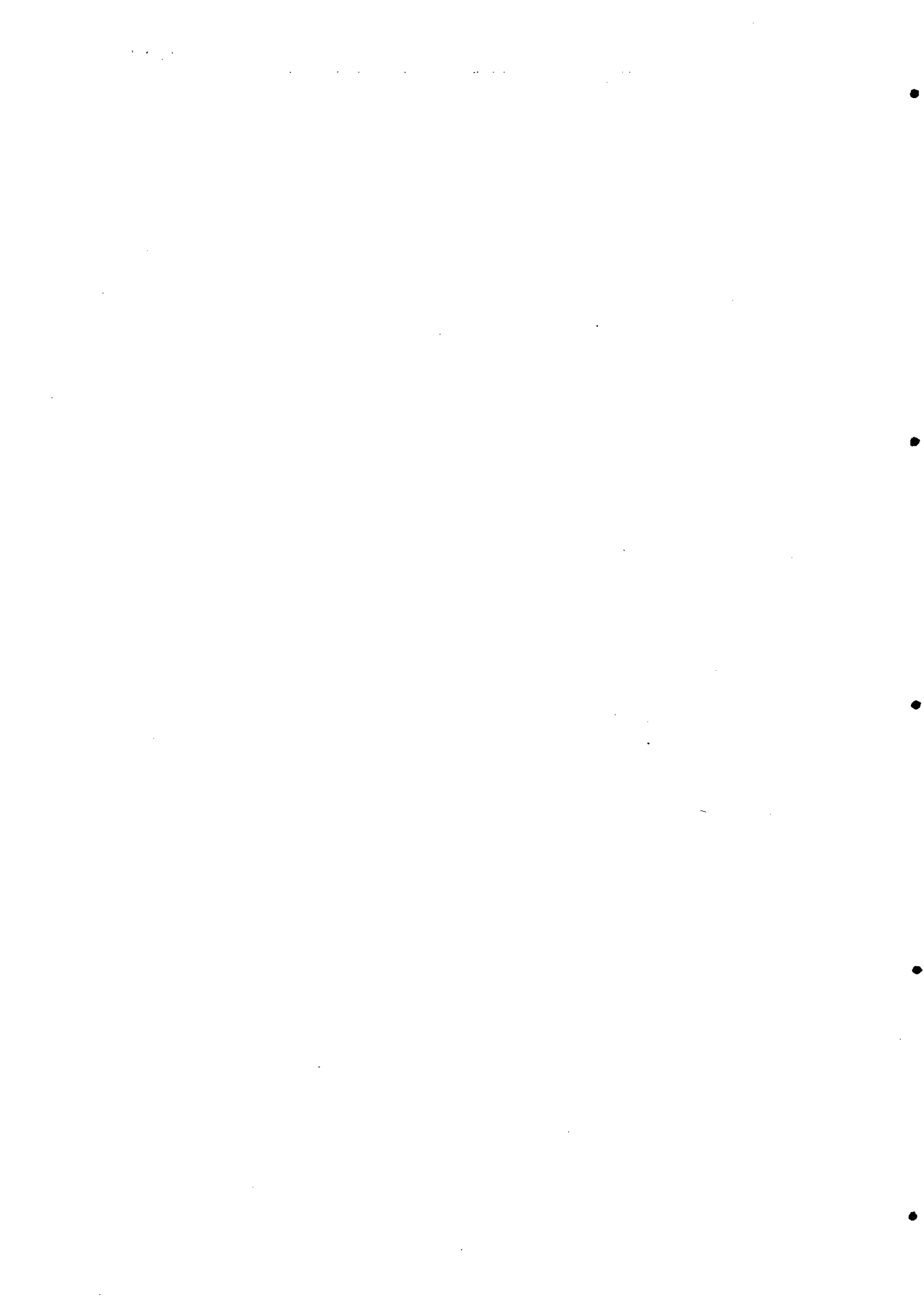
Bolsas de plástico transparente.

Sellador para bolsas de plástico.

Procedimiento:

1. Incubar las membranas 30 min en solución de prehibridación con ligera agitación a 65°C.
2. Desnaturalizar sonda 10 min a 100°C, después pasar a hielo.
3. Cambiar solución de prehibridación y añadir sonda desnaturalizada, incubar 5-6 h a 65°C con ligera agitación.
4. Lavar 3 × 15 min con ligera agitación en Tris-CINa + 0,02% SDS.
(Al comienzo del tercer lavado preparar la solución AB (100 µl A, 100 µl B en 10 ml Tris-CINa).
5. Incubar 30 min con ligera agitación en solución AB.
6. Lavar 3 × 15 min con ligera agitación en Tris-CINa.
7. Transferir la membrana a la solución sustrato (12 ml Tris 50 mM pH 7,6 + 6 mg DAB) añadir 24 µl de H₂O₂ 30% justo antes de usar la solución.
8. Incubar 15-30 min en la oscuridad a TA.
9. Lavar en H₂O destilada 2 × 10 min.
10. Secar la membrana al aire.

3. RESULTADOS



3.1 LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE UN FACTOR DE INVIABILIDAD HÍBRIDA.

3.1.1 Estudio de las generaciones F₁ y R1 híbridas.

La razón sexual (machos/hembras) en los híbridos entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* se estimó tanto en la descendencia F₁ (Tabla 3.1.1.1) como en la del primer retrocruzamiento (R1) hacia *D. buzzatii* (Tabla 3.1.1.2). Los cruces implicaban diferentes isolíneas de la población de San Luis de *D. buzzatii* y de las de San Luis y Vipos de *D. koepferae*. Mientras que en controles de cruzamientos dentro de estas cepas (tabla 3.1.1.0) la razón sexual era bastante próxima a 1 ($1,09 \pm 0,0074$), ya en la F₁ híbrida se registró un menor número de machos que de hembras ($0,85 \pm 0,0097$), que se acentuó en los híbridos R1 ($0,63 \pm 0,0068$). Tal como se ilustra en la figura 3.1.1.1, mientras que los híbridos F₁ contienen una dotación cromosómica completa de cada especie, en los de la R1 es de esperar que exista una gran heterogeneidad producida por la recombinación. Así como aproximadamente un 46% de los individuos de las F₁ analizadas fueron machos, este porcentaje fue sólo del 39% en las R1.

■ : *Drosophila koepferae*

□ : *Drosophila buzzatii*

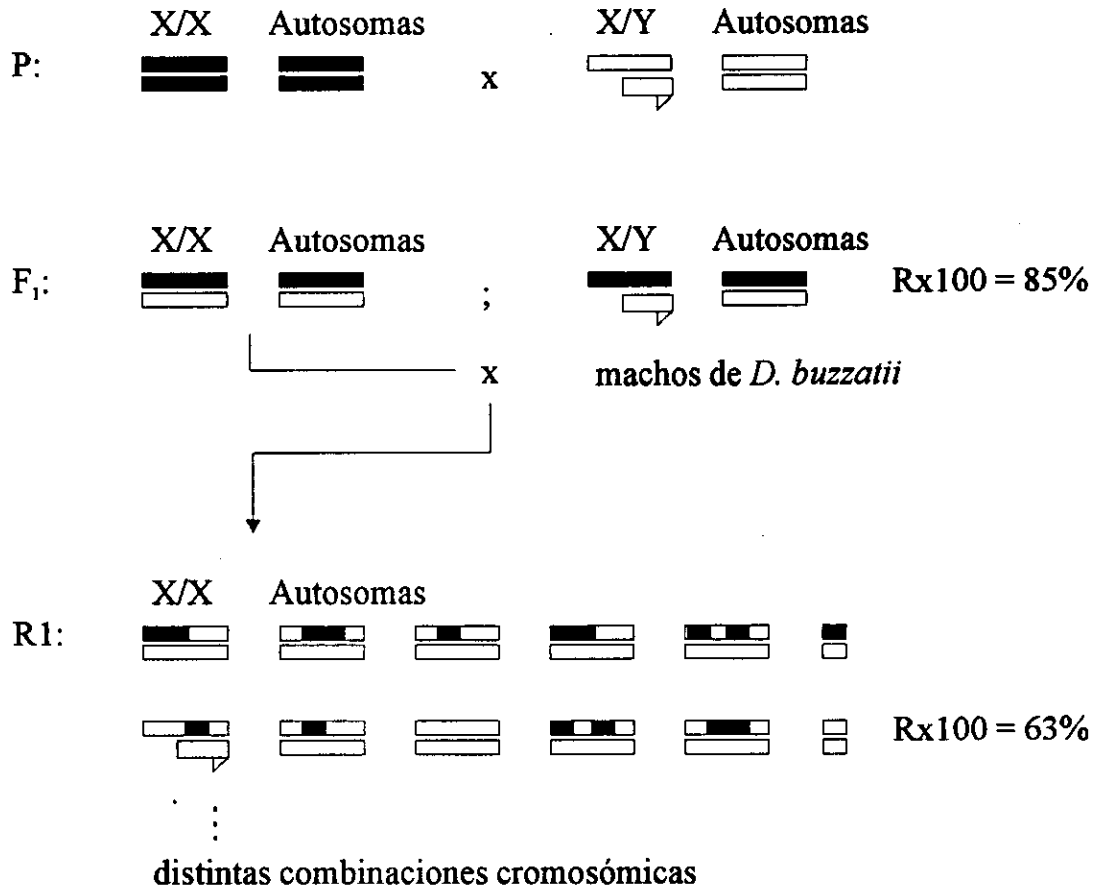


Figura 3.1.1. Obtención de la F₁: Hembras de *D. koepferae* x machos de *D. buzzatii*. R1: Hembras híbridas F₁ x machos de *D. buzzatii*. Los porcentajes se refieren a la frecuencia de machos viables respecto a hembras viables. El cromosoma Y aparece representado como una barra terminada en gancho siempre debajo del cromosoma X. Los puntos suspensivos debajo de los cromosomas en la R1 indican que se pueden dar otras combinaciones cromosómicas además de las mostradas.

Tabla 3.1.1.0: Razón sexual (machos/hembras) en las cepas parentales *D. koepferae* y *D. buzzatii*.

Cepa parental	Razón sexual
koeSL-8	201/194
buzSL-8	783/801
buzSL-101	1415/1199
Total	2399/2194

Códigos de la tabla: koe es *D. koepferae*; buz es *D. buzzatii*; SL es cepa San Luis.

Tabla 3.1.1.1: Razón sexual (machos/hembras) en distintas F₁ entre *D. koepferae* y *D. buzzatii*.

Líneas F ₁	Razón sexual	λ 0,5
koeSL x buzSL	87/104	1,34 ns
koeSL x buzSL-0	78/104	3,43 ns
koeSL x buzSL-1	371/410	1,85 ns
koeSL x buzSL-3	29/35	0,39 ns
koeSL x buzSL-101	44/46	0,01 ns
koeSL-1 x buzSL-1	30/18	2,52 ns
koeSL-2 x buzSL-2	10/21	3,23 ns
koeSL-3 x buzSL-3	47/69	3,80 ns
koeSL-8 x buzSL-101	84/86	0,006 ns
koeV x buzSL-0	31/40	0,90 ns
koeV x buzSL-1	25/37	1,95 ns
koeV x buzSL-101	40/40	0 ns

Tabla 3.1.1.1. Continuación: Razón sexual (machos/hembras) en distintas F₁ entre *D. koepferae* y *D. buzzatii*.

Líneas F ₁	Razón sex.	λ 0,5
koeV-1 x buzSL-1	107/147	5,99*
koeV-1 x buzSL-inv5I	27/35	0,79 ns
koeV-3 x buzSL-3	57/66	0,52 ns
koeV-4 x buzSL-4	114/132	1,17 ns
koeV-4 x buzSL Fum ¹⁰⁴	35/36	0 ns
Total	1216/1426	

Códigos de la tabla: koe es *D. koepferae*; buz es *D. buzzatii*; S.L es cepa de San Luis; V es cepa de Vïpos; Fum es fumarasa. ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$.

Tabla 3.1.1.2. Razón sexual (machos/hembras) en las R1 hacia *D. buzzatii* de las F₁ de la tabla 3.1.1.1. En la tercera columna aparece el valor del contraste λ de bondad de ajuste respecto al valor de frecuencia relativa de machos de la F₁.

Líneas R1	Razón sex.	λ 0,46
F ₁ koeSL/buzSL-0 x buzSL-0	10/23	2,67 ns
F ₁ koeSL/buzSL-1 x buzSL-0	63/84	0,47 ns
F ₁ koeSL/buzSL-1 x buzSL-1	275/482•	28,12***
F ₁ koeSL/buzSL-101 x buzSL-101	11/27	3,79 ns
F ₁ koeSL-1/buzSL-1 x buzSL	36/34	0,63 ns
F ₁ koeSL-2/buzSL-2 x buzSL	25/62•	9,76**
F ₁ koeSL-3/buzSL-3 x buzSL	155/309•	29,13***
F ₁ koeSL-3/buzSL-3 x buzSL-1	33/68	6,69**
F ₁ koeSL-8/buzSL-101 x buzSL-101	30/67	8,27**

Tabla 3.1.1.2. Continuación: Razón sexual (machos/hembras) en las R1 hacia *D. buzzatii* de las F₁ de la tabla 3.1.1.1. En la tercera columna aparece el valor del contraste λ de bondad de ajuste respecto al valor de frecuencia relativa de machos de la F₁.

Líneas R1	Razón sex.	λ 0,46
F ₁ koeSL/buzSL-1 x koeSL	10/24	3,13 ns
F ₁ koeV/buzSL-0 x buzSL-0	5/9	0,26 ns
F ₁ koeV/buzSL-1 x buzSL-1	41/82	7,44**
F ₁ koeV/buzSL-101 x buzSL-101	86/113	0,51 ns
F ₁ koeV-1/buzSL-1 x buzSL-1	339/619*	43,02***
F ₁ koeV-1/buzSL-inv5I x buzSL-inv4s	84/52*	12,98***
F ₁ koeV-3/buzSL-3 x buzSL-3	499/692	7,91**
F ₁ koeV-4/buzSL-4 x buzSL-4	122/158	0,57 ns
F ₁ koeV-4/buzSL Fum ¹⁰⁴ x buzSL Fum ¹⁰⁴	86/139	5,17*
F ₁ koeV-5/buzSL-5 x buzSL-5	62/70	0,02 ns
Total	1972/3114	

Códigos de la tabla: koe es *D. koepferae*; buz es *D. buzzatii*; S.L es cepa de San Luis; V es cepa de Vipos; Fum es fumarasa; F₁ significa hembra descendiente de un cruce P. ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$. *: desviación significativa, según el contraste secuencial de Bonferroni, de la razón sexual respecto a la F₁.

3.1.1.1 Análisis de los datos sin transformar:

Si realizamos un primer tipo de análisis con los datos en bruto (ver Material y Métodos), nos encontramos con que los de la F₁ (tabla 3.1.1.1) son agrupables ($\lambda_H = 15,07$; 16 g.l; $P = 0,52$), mientras que los de la R1 (tabla 3.1.1.2) por el contrario no lo son ($\lambda_H = 74,42$; 18 g.l; $P < 0,001$).

Nos fijamos primero en los datos de la F₁. Analizamos la razón sexual (R) a la luz de

tres hipótesis distintas, que se enuncian teniendo en cuenta la regla de Haldane (es decir, considerando que el sexo afectado por posibles problemas de viabilidad será el heterogamético), lo cual parece acorde con el valor $R = 0,85$ observado en la F_1 . Las hipótesis son:

1.- Machos y hembras híbridas son igualmente viables. Si esto es así, y no hay distorsión en la segregación de los cromosomas sexuales, $R = 1$. Luego la frecuencia relativa esperada de machos viables respecto al total de individuos será $p_0 = 0,5$.

2.- Los machos híbridos son viables, pero menos que las hembras. Sea α el coeficiente de selección en contra de los machos ("fitness" = $1-\alpha$). Definamos la "fitness" o eficacia biológica como la razón entre las frecuencias genotípicas después de selección y las frecuencias antes de selección (Prout, 1969). Asumiendo eficacia 1 para las hembras, e iguales frecuencias de machos y hembras en los cigotos, una estima de α vendría dada por $1-R$. Luego, $p_0 = (1-\alpha)/(2-\alpha)$

3.- Los machos híbridos son completamente inviables ($\alpha=1$). Por tanto, $R = 0$ ($p_0 = 0$). Sería un caso extremo de manifestación de la regla de Haldane.

Para la hipótesis 1, tras calcular los λ de bondad de ajuste con corrección de Yates, obtenemos los siguientes valores considerando como observadas las frecuencias acumuladas de machos y hembras de la tabla 3.1.1.1 ($n = 2642$):

$$H_0: p_0 = 0,50; \lambda = 16,5; 1 \text{ g.l.}; P < 0,001$$

Luego, a priori, rechazaríamos esta hipótesis, puesto que la diferencia con el valor esperado es altamente significativa. Sin embargo si aplicamos los contrastes λ de bondad de ajuste ($p_0 = 0,5$) línea por línea, observamos (tercera columna en tabla 3.1.1.1) que sólo una línea es significativa (línea 13). Y si, a su vez, aplicamos el contraste secuencial de Bonferroni (Material y Métodos) vemos que la desigualdad $P_1 \leq 0,05/k$ ($k = 17$) no se cumple, lo cual quiere decir que la desviación del valor esperado observada en esta línea no es significativa dentro del conjunto del total de líneas analizadas. Nada tienen de extraño estos resultados, habida cuenta que con los tamaños de muestra analizados en las distintas líneas (155 individuos como promedio) se puede demostrar (fórmula 2.4.1.4.2 de Material y Métodos) que no es posible contrastar la hipótesis nula de igual viabilidad de machos y hembras ($p_0 = 0,5$) frente a ninguna alternativa con $p_1 > 0,37$ ($R > 0,58$) manteniendo una potencia de al

menos el 95%, y un nivel de significación del 0,05. El tamaño de muestra necesario para mantener una potencia del 95% en el contraste entre el valor de p observado (0,459) y el esperado $p_0 = 0,5$ al nivel de significación mencionado sería 1631, tamaño que se supera si agrupamos los datos. Vista la homogeneidad de las F_1 , parece correcto acumular los datos de todas ellas, lo que, como se ha visto, nos lleva a concluir que los machos híbridos son menos viables que las hembras.

La hipótesis 3 asume que la inviabilidad se manifiesta en todos los machos portadores del letal ($\alpha = 1$). Pero si el letal se hallase segregando en la población parental, no estaría presente en todas las líneas F_1 . Los valores de R que podríamos esperar si este fuera el caso serían: $R = 1$, si el letal no estaba presente en la madre, $R = 0,5$ si el letal estaba en heterocigosis y $R = 0$ si el letal estuviera en homocigosis en la madre. Las distintas combinaciones de estos valores explicarían el valor observado de R . Podemos descartar esta hipótesis si tenemos en cuenta la homogeneidad observada en las líneas F_1 , que no sería posible si las R 's de cada línea correspondieran a alguno de los tres valores antes mencionados.

Queda por considerar la hipótesis 2, según la cual los machos son menos viables que las hembras, siendo $R = 1 - \alpha$. La estima de α que podemos hacer es $\alpha = 1 - R = 0,15$ ($\pm 0,0097$). Es decir, sobre la viabilidad de los machos F_1 operaría un coeficiente de selección en contra de aproximadamente 0,15.

Analicemos ahora los datos de la R_1 : Como dijimos, los datos de la tabla 3.1.1.2 no se pueden agrupar, porque probablemente estén representados distintos valores de p (frecuencia relativa observada de machos viables respecto al total de individuos). Luego debemos analizar las frecuencias línea por línea. La hipótesis nula a contrastar será la de si la frecuencia de machos de la R_1 es la misma que la de la F_1 , es decir *¿ha habido cambios significativos en las frecuencias de machos al pasar de la generación F_1 a la R_1 ?*

Los valores esperados de machos y hembras serán los hallados en las descendencias F_1 acumuladas (tabla 3.1.1.1): $p_0 = 1216/2642 = 0,46$; $q_0 = 1 - p_0 = 1426/2642 = 0,54$.

Si aplicamos el contraste secuencial de Bonferroni (Material y Métodos) para mantener, a priori, un nivel de significación ϵ a lo largo de los diecinueve contrastes λ de bondad de ajuste correspondientes, observamos que cinco líneas son significativas al 5%.

Estas líneas son: 3, 6, 7, 14 y 15 y aparecen marcadas con un punto (•) en la tabla 3.1.1.2. Parece que algún efecto letal se ha puesto de manifiesto al pasar de la F₁ a la R1. De esas cinco líneas, cuatro presentan desviaciones en el sentido de un menor número de machos que el esperado. En la línea 15, sin embargo, la desviación ocurre a favor de los machos. Parece existir una letalidad híbrida no manifestada en la F₁, o no tan manifiesta en la F₁ como en la R1. Esta es la letalidad que se espera cuando en las especies hibridadas existen sistemas o complejos de genes coadaptados (Carson & Templeton, 1984), de modo que el efecto letal resulta de romperse el sistema por recombinación en el híbrido tras una o varias generaciones de retrocruzamientos. Excepto en la línea 10 (que se retrocruzó hacia *D. koepferae* y no presenta diferencias significativas respecto a la F₁), en el resto de líneas ha ocurrido una reorganización de las regiones del genoma de *D. koepferae*, de modo que en los individuos de la descendencia de cada línea ya no se halla presente una dotación cromosómica íntegra de *D. koepferae*, debido a la recombinación en las madres.

3.1.1.2 Análisis de los datos transformados.

Para obtener más información sobre la variabilidad presente en los distintos tipos de cruces aplicamos una transformación por el arcoseno a los datos, que produce una aproximación asintótica a una normal de media $\mu = \arcseno(p_i)^{1/2}$ y varianza $s^2 = 1/(4n_i)$ (ver Material y Métodos). Siendo p_i la frecuencia relativa de machos de la línea i y n_i el total de individuos de la muestra i . Una de las ventajas de utilizar esta transformación es que desvinculamos la varianza del estimador del valor del parámetro p_i (Ahearn & Templeton, 1989). En la tabla 3.1.1.2.1 se presentan las medias a_m de los valores transformados, el valor del estadístico H , la desviación de a_m , s_{am} y la desviación genética $(V_g)^{1/2}$.

Tabla 3.1.1.2.1. Valores de los estadísticos para los datos transformados de las descendencias F₁ y R1.

Cruce	a_m	H	gl	P	S_{am}	$V_g^{1/2}$	Inferencia
F ₁	0,75	14,77	16	> 0,50 ns	0,0094	—	homogéneo
R1	0,67	72,67	18	< 0,001 ***	0,0140	0,0120	heterogéneo

En la F_1 toda la varianza se explica mediante la varianza muestral, es decir por el error debido al muestreo (el valor de la varianza genética para el carácter viabilidad de machos híbridos sería no significativo). En la R1 el componente genético es significativo $(V_g)^{1/2} = 0,012$ y explica la mayor parte de la heterogeneidad observada. Si descartamos las líneas R1 que presentan mayor frecuencia de machos que de hembras (líneas 5 y 15) y la línea 10, que es un retrocruce hacia *D. koepferae*, la desviación genética de la R1 disminuye de 0,012 hasta 0,0086, y los datos son heterogéneos para un nivel de significación del 1%, como se puede colegir en la tabla 3.1.1.2.2.

Tabla 3.1.1.2.2. Valores de los estadísticos para los datos transformados de las descendencias R1 tras eliminar tres líneas "anómalas" (véase texto).

Cruce	a_m	H	gl	P	S_{am}	$V_g^{1/2}$	Inferencia
R1	0,66	36,72	15	<0,01**	0,011	0,0086	heterogéneo

La comparación de las medias de los dos grupos de datos (F_1 y R1) la realizamos mediante la siguiente prueba (Ahearn & Templeton, 1989):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Se acepta H_0 si:

$$|a_{m1} - a_{m2}| / (1/4N + s_{am2}^2)^{1/2} \leq t_{1-1; \varepsilon}. \text{ Donde } N = \sum_i^I n_i, \text{ } (n_i \text{ es el número de individuos}$$

por línea de la F_1), siendo a_{m2} y s_{am2}^2 la media y varianza de la R1 e I es el número de líneas de la R1.

El valor así obtenido es $4,69 > 1,73 = t_{1-1; 0,05}$.

Luego se rechaza H_0 . Es decir, la media correspondiente a los datos R1 (incluidas todas las líneas) es significativamente menor que la correspondiente a la F_1 . Hemos encontrado, pues, que aparece una cierta varianza genética y se produce una disminución de la razón sexual en el paso de la F_1 a la R1.

3.1.2 Localización cromosómica de un factor perteneciente a un sistema de genes complementarios.

En un estudio previo a este trabajo (Naveira & Fontdevila, 1986) se había observado que la sustitución de un segmento distal (telomérico), relativamente grande, del cromosoma X de *D. buzzatii* por su homólogo de *D. koepferae*, era letal en los machos. Un examen posterior (Carvajal *et al.*, 1996) reveló que, de hecho, parecen existir dos regiones en el X de *D. koepferae* cuya introgresión provoca la inviabilidad de los machos híbridos: una efectivamente próxima al telómero, que abarcaría el intervalo citológico XA1d-A2c; y otra más proximal, situada en XE3a-E4i. En la figura 3.1.2.2 se aprecia, mediante la distribución gráfica de distintas líneas de introgresión de regiones del cromosoma X de *D. koepferae* en *D. buzzatii*, cómo la inviabilidad de los machos híbridos se asocia a la presencia de estas regiones. En este trabajo centraremos nuestra atención en la primera de ellas.

3.1.2.1 Localización de un factor próximo al telómero: Estima de la frecuencia de recombinación con el locus *white*:

Para tratar de localizar con la mayor precisión posible el factor o factores de inviabilidad situados dentro del intervalo XA1d-A2c, se realizaron una serie de cruzamientos entre las dos especies. Se utilizó esta vez la cepa de *D. buzzatii* denotada como buzSL-101, que se caracteriza por tener fijado en homocigosis un alelo *white* (*w*), mutante recesivo (el fenotipo mutante es color blanco de ojos). A partir de la F₁ se retrocruzaron hembras *w*⁺ híbridas con machos buzSL-101. Estos datos se muestran en la tabla 3.1.2.1.

Cruces:

P: 10 hembras X^{w+}/X^{w+} *D. koepferae* × 10 machos X^w *D. buzzatii*

R1: 1-hembra X^{w+}/X^w F₁ × 2 machos X^w *D. buzzatii*

R2: 1 hembra X^{w+}/X^w R1 × 2 machos X^w *D. buzzatii*

etc...

Dado que el alelo salvaje domina sobre el mutante *white*, y el sentido en el que se realizan los cruzamientos, todos los individuos de la F₁ (descendencia cruce P) deberían presentar ojos rojos. Puesto que los retrocruzamientos se realizan siempre vía hembra y hacia la cepa mutante, si no hubiera diferencias de viabilidad se esperaría el mismo número de individuos de ojos rojos y de ojos blancos, así como de machos y de hembras. Como puede verse en la tabla 3.1.2.1, no es así. En todos los retrocruzamientos se observa un defecto de machos w^+ , es decir, de portadores de, al menos, parte del X de *D. koepferae*.

Tabla 3.1.2.1. Retrocruces de hembras híbridas para el cromosoma X (sólo para la región XA-D3b a partir de la línea 4) con machos de *D. buzzatii* S.L-101. El orden de las descendencias es hembras w^+ , hembras w , machos w^+ , machos w . El número de machos acumulados se obtiene por suma a partir de la 4ª generación (véase texto).

Generación	Descendencia				machos w^+ /machos
F ₁	33	-	34	-	
1	12	15	2	9	.190
4	273	210	11	254	.040
5	756	673	30	696	.040
6	597	623	23	577	.040
7	256	245	13	268	.046
8	251	227	7	214	.030
9	441	406	19	434	.040
10	231	210	12	218	.050
11	181	160	9	162	.050
12	79	80	3	65	.040
13	30	21	1	23	.040
14	50	40	2	60	.030
15	189	183	5	190	.025
Machos acumulados			135	3161	.041

En la tabla 3.1.2.1, los machos w^+ que se recuperan en cada cruce serían,

presumiblemente, el producto del entrecruzamiento entre el locus *white* y el del factor o factores de inviabilidad asociados al cromosoma X de *D. koepferae*. A medida que se suceden las generaciones de retrocruces hacia *D. buzzatii*, seleccionando en cada una la región XB4a (locus *white*) de *D. koepferae*, incrementamos la probabilidad de desprendernos (por recombinación) del otro posible factor situado en XE3a-E4i, como así ocurrió efectivamente a partir de la cuarta generación, en la que la región que se mantuvo introgresada fue XA-D3b. De esta generación en adelante, los machos salvajes resultarían simplemente del entrecruzamiento entre el locus *white* y el factor letal efectivo de la región XA1d-A2c, y por lo tanto su frecuencia relativa sería estima de la distancia de recombinación. El valor de λ de homogeneidad a partir de la 4ª generación de los datos de la tabla 3.1.2.1 es no significativo ($\lambda_H = 24,98; 33 \text{ gl}; P = 0,84$).

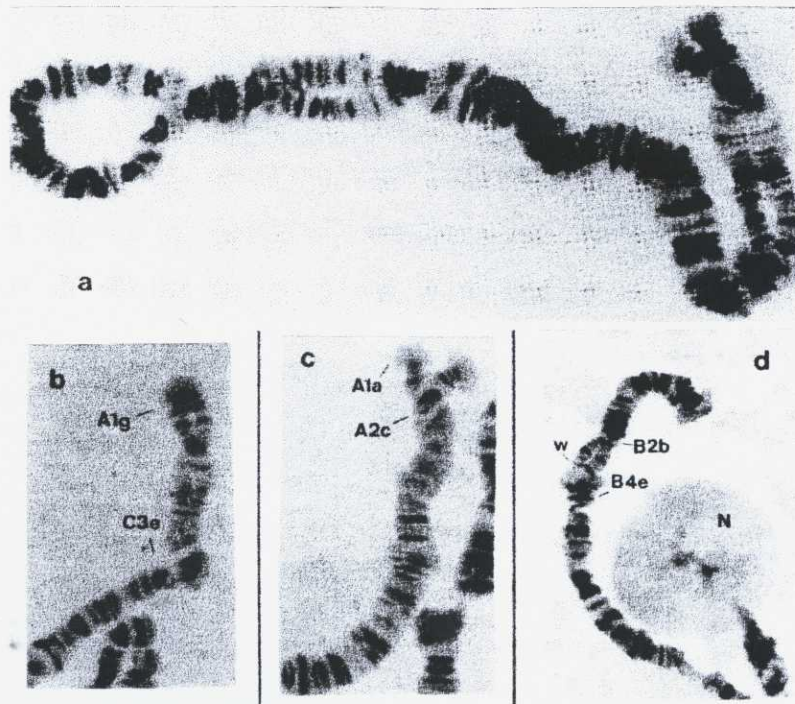


Figura 3.1.2.1. Microfotografías de distintas introgresiones del cromosoma X de *D. koepferae* en *D. buzzatii* incluyendo el locus *white* (*w*). a: Introgresión de todo el cromosoma. b: Introgresión de A1g-C3e. c: Introgresión de A1a-A2c. d: Introgresión de B2b-B4e; *w*-locus *white*; N-nucleolo.

La frecuencia relativa obtenida de los datos acumulados a partir de la cuarta generación (0,041) nos da un valor de aproximadamente 4cM (la frecuencia de recombinación $c = 0,04$) para la distancia de recombinación.

Una corrección a esta estima se puede hacer considerando la viabilidad relativa del cromosoma w respecto al cromosoma w^+ , dejando al margen el efecto específico de macho del factor de inviabilidad; para ello, se estima la viabilidad relativa del cromosoma w mediante el cociente entre las frecuencias de hembras w y hembras w^+ (se excluye la F_1), que equivale a la razón entre las frecuencias genotípicas después de la selección y las frecuencias antes de la selección para el cromosoma w , si consideramos que en el heterocigoto $w/+$ la dominancia del alelo salvaje es total:

$$\phi w/w = \Sigma(\text{hembras } w/w) / \Sigma(\text{hembras } w/+) = 3093/3346 = 0,924.$$

Luego los machos w observados son sólo 92,4% del total que se esperaría de no haber diferencias de viabilidad debidas al cromosoma portador de w . La corrección se puede obtener aplicando el coeficiente $1 / 0,924 = 1,08$ a la frecuencia de machos w observados.

$$c \text{ (corregida)} = \Sigma(\text{machos } w^+) / [\Sigma(\text{machos } w^+) + 1,08 \Sigma(\text{machos } w)] = 0,038$$

La frecuencia de recombinación entre el factor efectivo de inviabilidad y el locus *white* se pudo también estimar de otra forma independiente de la anterior. Para ello, de una serie de cruces individuales entre hembras híbridas para el locus *white* y machos de *buzSL-101*, se hizo un recuento de los genotipos observados en cada descendencia, y se identificaron como recombinantes todas aquellas progenitoras que dejaron en su descendencia machos w^+ con una frecuencia aproximadamente igual a la de machos w . La naturaleza efectivamente recombinante de estas hembras se comprobó mediante análisis del cariotipo politénico en larvas de la descendencia (figura 3.1.2.1). Comparando el número de hembras recombinantes y no recombinantes se calcula la frecuencia de recombinación, como:

$c \text{ (hembras)} = \Sigma(\text{hembras recombinantes}) / \Sigma(\text{hembras totales}) = 15/295 = 0,051$, que es ligeramente superior a la obtenida a partir de los machos.

Mediante el análisis de distintas líneas de introgresión de regiones del cromosoma X de *D. koepferae* en *D. buzzatii* (figura 3.1.2.2) y la viabilidad o no de los machos de la descendencia se pudo llegar a localizar una región citológica de 3 bandas del cromosoma politénico que debe contener un factor de inviabilidad, concretamente la región XA2a-A2c,

situada muy cerca del extremo distal o telómero (figura 3.1.2.3). Este factor de inviabilidad se manifiesta sólo en los machos, bien porque sea recesivo, bien porque sea específico de sexo. Denominaremos a este factor de inviabilidad híbrida en machos como *hmi-1*.

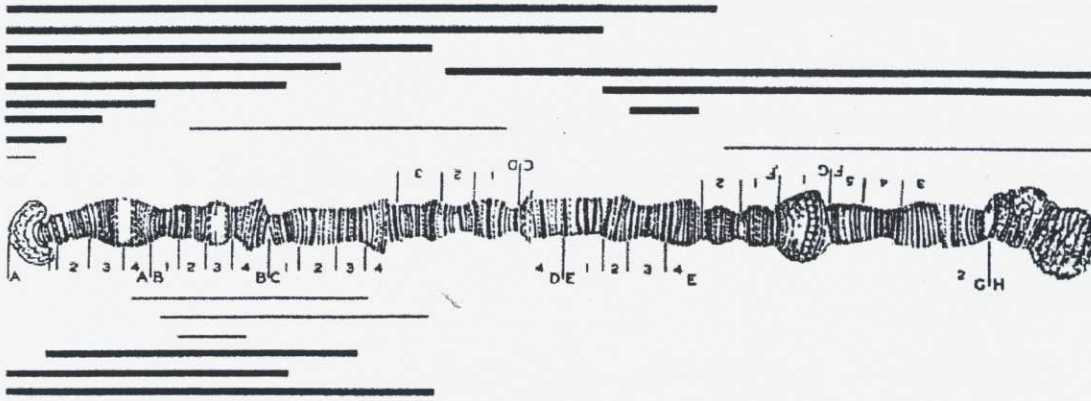


Figura 3.1.2.2. Distribución gráfica de distintas líneas de introgresión de regiones del cromosoma X de *D. koepferae* en *D. buzzatii*. Las barras gruesas corresponden a fragmentos que contienen factores de inviabilidad híbrida, las finas a aquellos que no.

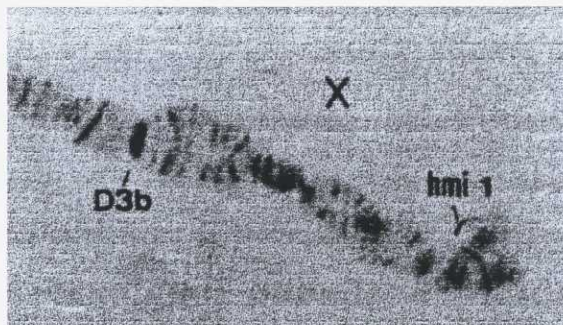


Figura 3.1.2.3. Microfotografía donde se aprecia la introgresión del segmento A-D3b de *D. koepferae* en el cromosoma X de *D. buzzatii* (se indica la posición de *hmi-1*).

Del conjunto de datos presentados en la tabla 3.1.2.1 obtenemos la distribución modelo para la hipótesis de inviabilidad que contrastaremos de aquí en adelante, y que

denominamos inviabilidad 0,04. En esa misma tabla, apreciamos que la frecuencia p (a partir de la cuarta generación de retrocruzamiento) de machos híbridos w^+ respecto al total de individuos (machos y hembras) híbridos w^+ es también 0,04 (135/3469). La frecuencia relativa p esperada de inviabilidad la notaremos de aquí en adelante como $p_0 = 0,04$.

Para obtener información sobre las varianzas aplicamos la transformación arcoseno a los datos correspondientes a individuos híbridos w^+ . El resultado aparece en la tabla 3.1.2.2.

Tabla 3.1.2.2. Valores de los estadísticos para los datos transformados de híbridos w^+ de la descendencia a partir del cuarto retrocruzamiento con buzSL-101 de la tabla 3.1.2.1.

Cruce	a_m	H	S_{am}	$V_g^{1/2}$	g.l	P	Inferencia
R×buzSL-101	0,202	3,80	0,0050	—	11	>0,9	homogéneo

Los datos de los retrocruces con *D. buzzatii* SL-101 son homogéneos, tal y como ya se puso de manifiesto con la prueba de homogeneidad sobre los datos en bruto. Esto quiere decir que no hay varianza genética significativa. La media a_m ha disminuido también con respecto tanto a la de las F_1 (tabla 3.1.1.1) como a la de las R1 (tabla 3.1.1.2). El contraste utilizado para comparar esta media con la correspondiente a la descendencia de la R1 es el siguiente (Ahearn & Templeton, 1989):

$$H_0: p_1 = p_2$$

Se acepta H_0 si $t = |a_{m1} - a_{m2}| / (1/4N + s_{am2}^2)^{1/2} \leq t_{1-\alpha; s}$. Donde $N = \sum_i n_i$, (n_i es el número de individuos w^+ por línea de los retrocruces con buzSL-101), siendo a_{m2} y s_{am2}^2 la media y varianza de la R1 e I es el número de líneas de la R1.

El valor t obtenido es $29,38 \gg t_{18; 0,05}$. Podemos decir que el promedio de machos híbridos viables ha disminuido significativamente respecto a los promedios obtenidos en la F_1 y la R1. La ausencia de varianza genética significativa, al igual que en la F_1 , quiere decir que para el carácter viabilidad de machos híbridos no hay más diferencias entre las líneas que las debidas al muestreo.

El efecto del factor efectivo de inviabilidad, ligado a la región XA2a-A2c, es también

claramente observable si comparamos los resultados de la introgresión en heterozigosis de la región XA1-B4, en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-101 (tabla 3.1.2.3), con los de la región XB1-B4 introgresada en heterozigosis en el mismo fondo de *D. buzzatii* SL-101 (tabla 3.1.2.4).

Tabla 3.1.2.3. Descendencia de cruces de hembras híbridas XA1-B4 con machos de buzSL-101

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w
1	25	35	1	25
2	34	36	1	31
3	39	35	2	45
4	16	15	1	25
5	43	41	1	46
6	25	27	0	43
7	28	24	0	24
8	64	47	1	36
9	128	90	5	112
10	89	80	2	82
11	221	173	10	167
12	141	84	0	91
Totales	853	687	24	727

Tabla 3.1.2.4. Descendencia de cruces de hembras híbridas XB1-B4 con machos de buzSL-101.

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w
1	13	12	16	19
2	7	11	8	12
3	15	8	6	9
4	9	8	6	11
5	14	13	16	12
Totales	58	52	52	63

Tras realizar el análisis de estos datos sin transformar vemos que ambos tipos de líneas son homogéneas, siendo el valor de λ de homogeneidad, $\lambda_H = 46,5$; 13 gl, $P = 0,06$ y $\lambda_H = 9,1$; 12 gl, $P = 0,69$ respectivamente. El valor λ de bondad de ajuste para la hipótesis de inviabilidad de machos w^+ ($p_0 = 0,04$) es no significativo en el primer caso, $P > 0,05$ y significativo en el segundo $P < 0,005$ (tabla 3.1.2.5). Los resultados del segundo tipo de análisis (transformación de los datos) se presentan junto a los valores de λ del primer tipo, en la tabla 3.1.2.5.

Tabla 3.1.2.5. Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste y valores de los estadísticos estimados tras la transformación por el arcoseno de los datos de las tablas 3.1.2.3 (cruce XA1-B4) y 3.1.2.4 (cruce XB1-B4).

Cruce	λ_H	gl	$\lambda_{H_0} = 0,04$; 1 gl	a_m	H	gl	P	s_{am}	$(V_B)^2$	Inferencia
XA1-B4	46,48 ns	33	3,64 ns	0,169	15,44	11	$> 0,1$	0,020	0,011	homogéneo
XB1-B4	9,10 ns	12	536,00 ***	0,758	4,43	4	$> 0,1$	0,050	0,016	homogéneo

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Las hembras que portan en heterocigosis la región XA1-B4 de *D. koepferae* en el fondo genético de *D. buzzatii* SL-101 las denominaremos de aquí en adelante hembras de

inviabilidad.

Para comparar las medias de los dos grupos homogéneos de datos utilizamos el contraste “z” de comparación de medias (Ahearn & Templeton, 1989). $H_0: p_1 = p_2$. Se acepta H_0 si:

$$z = a_1 - a_2 / (1/4N_1 + 1/4N_2)^{1/2} \leq Z_{\alpha/2}$$

$z = 11,65 \gg Z_{0,025}$. Luego se rechaza H_0 . Se detecta un claro efecto de la región XA1-A2 de *D. koepferae* (concretamente XA2a-A2c) sobre la viabilidad de los machos.

Respecto a la varianza en ambos tipos de cruces, el valor del estadístico H nos indica que la varianza genética no tiene un valor significativo, al igual que observábamos en los datos de la tabla 3.1.2.1.

3.1.3 Análisis de la fase de desarrollo afectada por la letalidad en los machos híbridos inviábiles.

Se realizó el examen de placas sembradas con larvas de machos de tercer estadio (ver Material y Métodos) descendientes del cruce de hembras de inviabilidad con machos buzSL-101, a fin de conocer el momento del desarrollo en que se produce la muerte de los individuos. Se observó que 90 machos w^+ no emergieron de un total de 100 (90%), mientras que en las placas control solamente 15 machos w no lo hicieron de un total de 100 (15%). Además la inviabilidad pupal de machos w^+ se pudo asociar principalmente a tres estadios diferentes (Bainbridge & Bownes, 1981), a saber (figura 3.1.3.1 y tabla 3.1.3.1):

1. P1-P2: Formación de la burbuja de gas (“bubble prepupa”), 34% de las muertes.
2. P7-P8: El adulto tiene ojos amarillos (no se completó la pigmentación), 23% de las muertes.
3. P15(i): Expansión del ptilinium, 37% de las muertes.
4. Otros: 6% de las muertes.

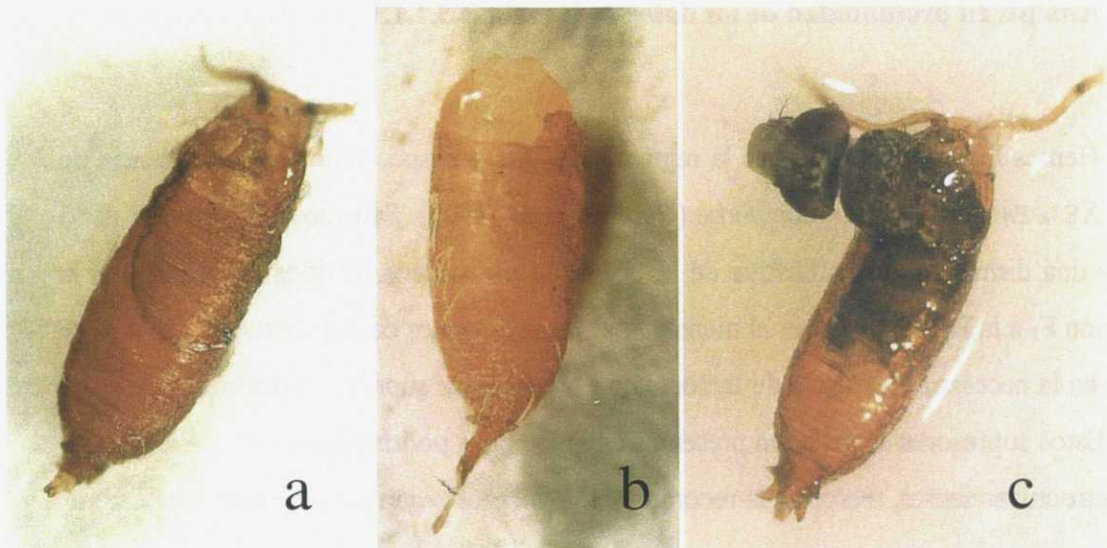


Figura 3.1.3.1. Estadíos en que ocurre la inviabilidad pupal: a, "bubble prepupa". b, adulto de ojos amarillos, pigmentación incompleta. c, expansión del ptilinum.

Tabla 3.1.3.1. Viabilidad de machos w^+ (normalmente portadores de *hmi-1*) y w (normalmente no portadores de *hmi-1*) a través de los distintos estadíos de desarrollo pupal. Estos machos descienden de hembras de inviabilidad que se cruzaron con machos w . Se analizaron 100 larvas de tercer estadío de cada clase. Los números corresponden a los registros de pupas muertas en los correspondientes estadíos (Bainbridge & Bownes, 1981).

Estadío	Machos w^+	Machos w
P1-P2	31	9
P4(ii)	4	0
P7-P8	21	0
P10-P11	1	0
P15(i)	33	2
P15(i)(eclosión)	0	4
Total	90	15

3.1.4 Análisis en profundidad de los datos de las tablas 3.1.1.1 y 3.1.1.2.

Hemos localizado un letal en la región XA2a-A2c y sospechamos de la existencia de otro en XE3a-E4i, ambos de *D. koepferae* (Carvajal *et al.*, 1996). Sabemos también que, dado que hay una disminución significativa de la viabilidad de machos híbridos en el paso de la generación F₁ a la R₁, ha de haber al menos un sistema de genes complementarios; lo cual se traduce en la necesaria existencia de factores de *D. koepferae* supresores del efecto de estos letales. Estos supresores se hallarían presentes en la F₁, pero podrían dissociarse de los letales en los retrocruzamientos, merced a la recombinación durante la gametogénesis de las hembras híbridas.

Se planteó entonces como objetivo generar el modelo más sencillo posible que, partiendo de la evidencia hasta aquí acumulada, permitiera explicar los valores de la razón sexual *R* observados en la F₁ y R₁ (tablas 3.1.1.1 y 3.1.1.2).

Modelo

Supongamos que hay sólo dos letales de machos híbridos en el genoma de *D. koepferae*, *lhA* y *lhE*, con sus correspondientes supresores conespecíficos dominantes, *Su(lhA)* y *Su(lhE)*, conformando dos sistemas de genes complementarios independientes en sus efectos (cada letal tiene su supresor). ¿Qué esperaríamos en la descendencia R₁? Podemos generar el siguiente modelo para calcular la frecuencia de machos R₁ que morirán al ser portadores de al menos un letal pero no de su supresor.

Sea r = frecuencia de recombinación entre *lhA* y *lhE*, ligados al cromosoma X.

Sea s = frecuencia de recombinación entre *Su(lhA)* y *Su(lhE)*, que estarían ligados a los autosomas. Este último supuesto que ubica a los supresores en los autosomas, se justifica, además de por su simplicidad, en el modelo básico existente de evolución de inviabilidad híbrida que involucra dos loci, uno ligado al X y otro autosómico (Coyne, 1994), en lo que vendría a ser una manifestación más de los equilibrios X:autosomas que controlan diversos aspectos del desarrollo sexo-específico en *Drosophila*.

Definimos las siguientes probabilidades a partir de un progenitor de la F₁ en el que están presentes tanto los letales como los supresores:

P_1 , probabilidad de heredar ambos letales = $(1-r)/2$.

P_2 , probabilidad de heredar sólo un letal = r .

P_3 , probabilidad de no heredar los dos supresores = $(1+s)/2$.

P_4 , probabilidad de no heredar un determinado supresor = $1/2$.

Entonces, la probabilidad P_i de que un macho R1 muera será:

$$P_i = (P_1 \times P_3) + (P_2 \times P_4) = [(1-r)(1+s)/4] + (r/2) \quad (3.1.4.1)$$

Podemos hacer una estima de r , aunque sea muy a *grosso modo*: como se vió, estimamos la frecuencia de recombinación c entre el letal contenido en XA2a-A2c y XB4a en 0,04. La distancia entre XA2a-A2c y XE3a-E4i es aproximadamente del triple. Supondremos por ello un valor aproximado de $r = 0,12$. Entonces según la ecuación 3.1.4.1:

$$P_i = 0,28 + 0,22 \times s$$

Por otro lado, podemos utilizar el valor de la razón sexual de la tabla 3.1.1.2 ($R = 0,63$) para obtener el valor de la probabilidad de que un macho R1 muera ($P_i = 1 - 0,63 = 0,37$; valor que coincide con la estima del coeficiente de selección α que actuaría en contra de estos machos), y tendremos de nuevo según 3.1.4.1:

$$0,37 = 0,28 + 0,22 \times s$$

Despejando, se obtiene $s = 0,41$. Explicaríamos de esta manera con unos valores de $r = 0,12$ y $s = 0,41$; los resultados obtenidos en la descendencia de la 1ª generación de retrocruzamientos.

El error asociado a la estima de s viene dado por el error de la estima de P_i . Por ello, el intervalo I de confianza al 95% correspondiente a P_i nos servirá para hallar el rango de valores de s que se observarían en el 95% de los casos si el valor de P_i observado es el real.

El intervalo es (ver Material y Métodos):

$I = [P_i - Z_{\alpha/2} (P_i R/n)^{1/2}, P_i + Z_{\alpha/2} (P_i R/n)^{1/2}]$ donde $n = 3004$ es el número total de hembras de los datos de la R1 una vez eliminadas las tres líneas (5, 10 y 15) "anómalas" (tabla 3.1.1.2).

Sustituyendo se obtiene $I = [0,353 ; 0,486]$. El valor mínimo de s que podemos obtener tomando valores de este intervalo es 0,33 e igualmente el valor máximo es $s = 0,49$.

Luego, según nuestro modelo, y asumiendo $r = 0,12$ tenemos que $s \in [0,33 ; 0,49]$. Como se ve, el valor $s = 0,5$ (que corresponde a los dos supresores ubicados en distintos cromosomas) queda muy próximo al extremo superior del intervalo.

Es posible expresar la ecuación 3.1.4.1 como una función $s = f(r)$. Haciendo esto, es fácil ver que s es decreciente en r , siempre y cuando $P_i < 0,5$ como es nuestro caso. Lo cual quiere decir que mayores valores de s implican menores valores de r . Es decir, bajo el modelo supuesto, sólo podremos aceptar $s = 0,5$ si suponemos valores de r menores o iguales a $0,12$.

Todas estas estimas se han hecho bajo el modelo supuesto en el cual se asume una razón sexual $R = 1$ en la F_1 . La razón sexual observada en la F_1 fue $R = 0,85$ significativamente distinta de $R = 1$ (ver Resultados 3.1.1). Esto corregiría las estimas, mostrando que en realidad el valor máximo obtenible para s es menor que $0,49$ lo cual nos llevaría a suponer valores de r aún menores para poder asumir $s = 0,5$.

3.2 LOCALIZACIÓN DE UN FACTOR AUTOSÓMICO COMPLEMENTARIO AL CONTENIDO EN XA2a-A2c.

Se trató de localizar algún factor complementario al letal localizado en la región XA2a-A2c. Para ello se utilizaron hembras de *D. koepferae* SL-8 y machos de *D. buzzatii* SL-101 (cepa white), realizándose varias generaciones de retrocruces a favor de *D. buzzatii* SL-101. Se seleccionaron siempre hembras portadoras de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* (hembras w^+/w y asinapsis politénica en la susodicha región en larvas de 3^{er} estadio descendientes de la misma madre) en cuya descendencia hubiera una frecuencia de machos w^+ significativamente superior a 0,04. El esquema de los cruces se muestra en la figura 3.2.1.

3.2.1 Frecuencias relativas de machos híbridos portadores de la región XA1a-A2c de *D. koepferae* a lo largo de 6 generaciones de retrocruzamientos.

Se presentan en las tablas 3.2.1.1.1 y siguientes los resultados de los retrocruces de hembras híbridas (a partir de la R2) con machos *D. buzzatii* SL-101 (cepa white). Los cruces son individuales de una hembra por uno o dos machos. En cada generación se realizan entre diez y veinte cruces que llamamos líneas. Todas las líneas son portadoras de la región XA2a - A2c de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis, que como hemos demostrado provoca inviabilidad de los machos portadores de la misma en ausencia de otras regiones de *D. koepferae*. Por ello la información sobre el X no aparece en la columna de composición cromosómica de las tablas, pues siempre está presente una región que al principio varía entre XA1a-C1 y XA1-D4, y que finalmente queda reducida a XA1a-B4 (practicamente coincidiendo con el marcador locus white ubicado en XB4a).

Quede claro entonces que, cuando en una línea cualquiera, la columna de composición cromosómica aparece vacía, ello quiere decir que sólo está presente la región del cromosoma X y que no fue detectada la introgresión de ninguna región autosómica.

Para el resto de los cromosomas introgresados (siempre en heterozigosis) se emplea

la nomenclatura expuesta en el capítulo de Material y Métodos.

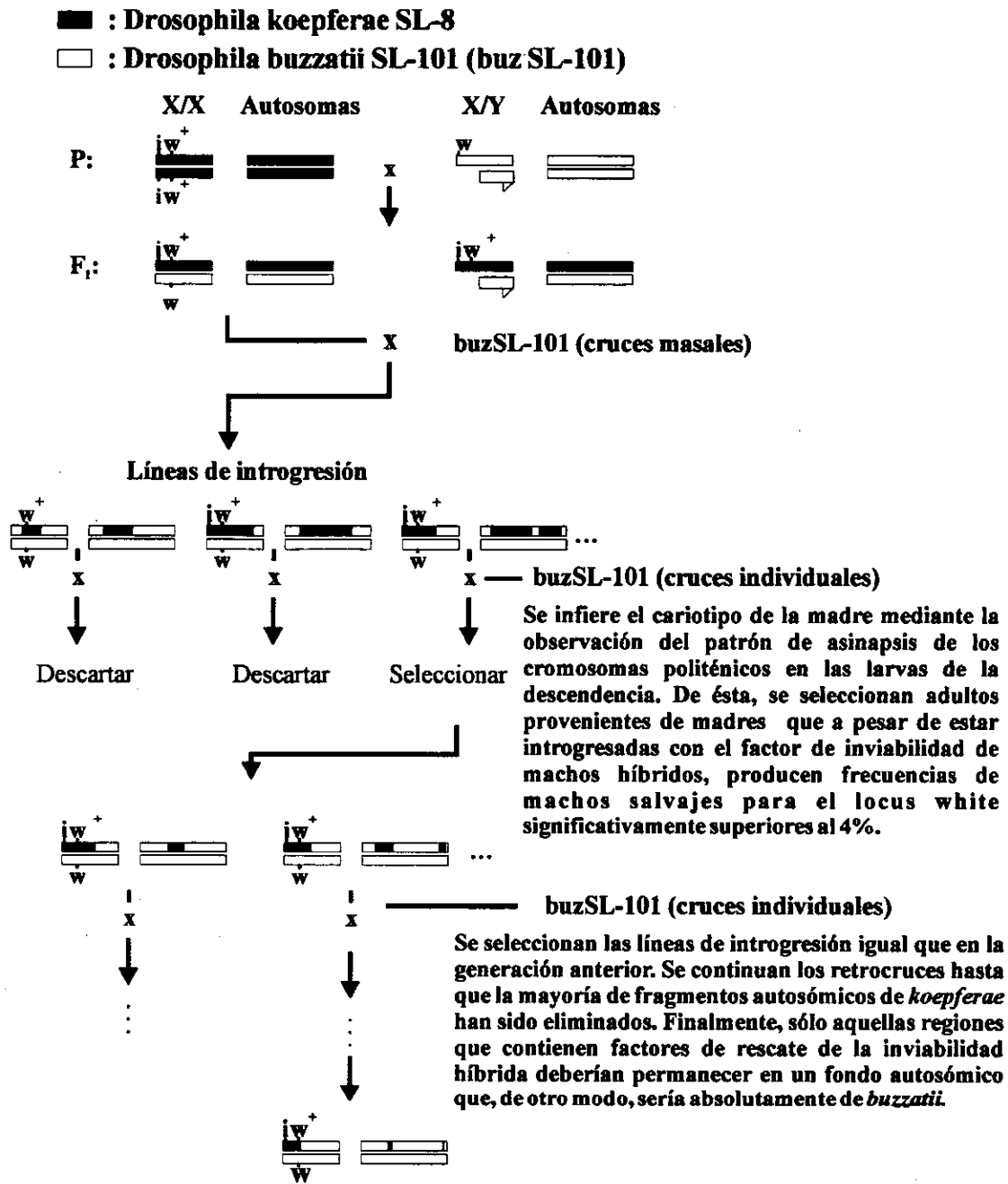


Figura 3.2.1. Diseño de retrocruces para localizar factores complementarios a XA2a-A2c.

Antes de ofrecer los resultados de los retrocruces recordemos, mediante un ejemplo, que en la nomenclatura de las tablas existen algunas peculiaridades. Por ello, si aparece en la columna de composición cromosómica algo como:

2, 4D1-D5+E4a-G2, 5A1a-, querría decir que el cromosoma 2 estaba introgresado íntegramente, que del cromosoma 4 estaban presentes dos regiones separadas y distintas 4D1-D5 y 4E4a-G2 y que del cromosoma 5 se sabe dónde comienza la región introgresada pero no se pudo precisar con exactitud hasta dónde llegaba.

3.2.1.1 Descendencia R2

En la tabla 3.2.1.1.1 se muestran los resultados de la segunda generación de retrocruzamientos de hembras híbridas portadoras como mínimo de la región XA1a-B4 de *D. koepferae* introgresada en heterocigosis en *D. buzzatii* SL-101. Como ya indicamos, esta región no aparece señalada de forma explícita en la columna de composición cromosómica ya que siempre se halla presente.

Tabla 3.2.1.1.1. Descendencia de la R2 o segunda generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w ⁺ /	
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w ⁺
		w ⁺	w	w ⁺	w		
1		39	35	2	45	0,04	0,05
2	3A-C1f, 4C-H, 5	18	19	14	25	0,36	0,44
3	2, 3D2-H, 4A-A3, 5B3-H, 6	24	14	6	14	0,30	0,20
4	2, 3A-B2, 4A-D, 5	29	23	5	16	0,24	0,16
5	3D1-H, 4B1-F4, 5A-	34	30	12	30	0,29	0,26
6	2, 3-, 4-, 5, 6	100	86	55	76	0,42	0,35
7	2, 4A-G1, 5, 6	7	12	9	8	0,53	0,56
8	3B1-F1, 4D1-H, 5, 6	37	35	9	31	0,22	0,20

De los datos de la tabla anterior es interesante destacar por un lado la línea 1, que no presentó ninguna región autosómica introgresada y consecuentemente la frecuencia de machos w^+ es la esperada para el efecto de *hmi-1*. Por otro lado debe notarse que los cromosomas 4 y 5 son los únicos presentes en todas las líneas, si bien las diferentes regiones del 4 no son todas solapantes en las distintas líneas, cosa que sí ocurre con el cromosoma 5, que aparece íntegro en casi todas ellas.

En la tabla 3.2.1.1.2 se muestran los valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste para la hipótesis de inviabilidad. Ambos tipos de valores son significativos, lo que era de esperar dada la heterogeneidad de regiones introgresadas y el potencial efecto recuperador de algunas de ellas.

Tabla 3.2.1.1.2. Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R2.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
44,12 21gl $P < 0,01$	600 1gl $P < 0,001$

3.2.1.2 Descendencias R3 a R7.

En la tabla 3.2.1.2.1 y siguientes se muestran los resultados desde la tercera generación de retrocruzamiento hasta la séptima, así como los correspondientes valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste a la hipótesis de inviabilidad, para los datos de cada generación.

Hay que destacar que en la tercera generación ya aparecieron líneas (por ejemplo las líneas 10 y 11) donde se manifestaba la inviabilidad de los machos w^+ a pesar de que estaban presentes en la madre regiones autosómicas de *D. koepferae*. Según avanzaron las generaciones de retrocruces, este tipo de líneas se hizo más frecuente; aunque, finalmente, en las últimas generaciones (R6 y R7) el número de fragmentos autosómicos distintos se vio muy reducido.

Por otro lado, los valores λ correspondientes a cada generación son siempre

significativos excepto para los datos de la última (R7), en que se excluyeron aquellas líneas portadoras de la región candidata a recuperar la viabilidad de los machos híbridos.

Tabla 3.2.1.2.1. Descendencia de la R3 o tercera generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w^+ /	
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w^+
		w^+	w	w^+	w		
1		17	21	0	19	0,00	0,00
2	3A-A5, 4F1f-H, 5	16	15	7	27	0,21	0,30
3	2, 4D1a-H, 5	15	13	6	12	0,33	0,29
4	4A4-H, 5	11	10	2	6	0,25	0,15
5	2-, 5, ¿6?	24	20	8	22	0,27	0,25
6	2-, 3-, 4-, 5	20	20	5	28	0,15	0,20
7	3F1-H, 4C1-H, 5, ¿6	34	43	22	30	0,42	0,39
8	2-, 4B1-G2, 5F-H	25	23	8	24	0,25	0,24
9	3B2-F1, 4D1-H, 5, 6	19	23	5	21	0,19	0,21
10	3 C4-F1, 5-	17	18	0	15	0,00	0,00
11	4F1-H	12	14	0	18	0,00	0,00
12	3-, 4D1-, 6	10	11	8	17	0,32	0,44
13	2-, 3B-C4, 4D1-H, 5	15	13	7	14	0,33	0,32
14	2, 4-F1, 5A-	24	13	7	7	0,50	0,23
15	3B-G2, 4D1-H, 5	16	13	3	14	0,18	0,16
16	3 C-H, 4C1-G2, 5A-	5	22	4	16	0,20	0,44

Resultados

Tabla 3.2.1.2.2 Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R3.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
68,57 45gl $P < 0,05$	416 1gl $P < 0,001$

Tabla 3.2.1.2.3. Descendencia de la R4 o cuarta generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia		Machos w^+ /		Machos w^- /	
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w^+
		w^+	w^-	w^+	w^-		
1		25	35	1	25	0,04	0,04
2		34	36	1	31	0,03	0,03
3		14	17	0	14	0,00	0,00
4	3A1-B1b, 4F-H, 5A-	22	39	3	25	0,10	0,12
5	5A-B5	30	19	1	1	0,50	0,03
6	4F1c-H, 5A-B1+ 5D1-H	25	16	6	27	0,18	0,19
7	4A-A4	21	13	1	18	0,05	0,04
8	3D2-D5, ζ -	47	55	7	60	0,10	0,13
9		51	49	3	52	0,05	0,06
10	6 ζ -	16	13	8	18	0,30	0,33
11	2-, 5, ζ 6?	16	21	7	17	0,29	0,30
12	2-, 3D1-F1, 4D3-H, 5A-, ζ 6?	56	42	16	40	0,29	0,22
13	3 C-F1, 4D1-H, 5	14	14	5	7	0,42	0,26
14	3D-F, 4D4-H, 5, ζ 6?	15	7	0	11	0,00	0,00
15	4D1-H	14	11	3	13	0,19	0,18
16	4 C2-G2a, 5-H	21	15	4	13	0,23	0,16
17	4D1-G2, 5-H	29	25	12	35	0,25	0,29

Tabla 3.2.1.2.3. Continuación. Descendencia de la R4 o cuarta generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos $w'/$	Machos $w'/$
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w'
		w^+	w	w^+	w		
18	5, $\zeta 6?$	12	15	1	10	0,09	0,08
19	2, 4D1-F1+F4-, 5A-, $\zeta 6?$	33	25	10	28	0,26	0,23
20	2-H, 3E2-H, 4C1-H, 5	16	11	8	12	0,40	0,33
21	3 C4-E1	19	11	0	10	0,00	0,00
22	4 C3-F4, $\zeta 6?$	13	16	7	20	0,26	0,35

Tabla 3.2.1.2.4 Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R4.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
128,00 63gl $P < 0,001$	245 1gl $P < 0,001$

Resultados

Tabla 3.2.1.2.5 Descendencia de la R5 o quinta generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w ⁺ /	
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w ⁺
		w ⁺	w	w ⁺	w		
1	4F1-H	28	18	0	20	0,00	0,00
2	5F-H	43	43	0	41	0,00	0,00
3	4B1-G2, 5F-H	27	26	6	29	0,17	0,18
4	3 C5-F1, 4D2-F4, 5A-	35	43	19	28	0,40	0,35
5	4D1-D5, 5F-H	63	58	27	69	0,28	0,30
6	4D1-F4, 5F-H	24	15	10	14	0,42	0,29
7	4B1-F1	28	16	14	15	0,48	0,33
8	3-	20	12	0	19	0,00	0,00
9	3D2-, 4D3d-H, 5A-	19	18	8	18	0,31	0,30
10		16	18	1	18	0,05	0,06
11	4B1-G2, 6 duplic.	49	36	14	53	0,21	0,22
12	4 C2-F4	20	20	4	23	0,15	0,17
13	3 ₂ E27+F1, 5A-	26	24	2	17	0,10	0,07
14	4B1-G2	21	25	6	28	0,18	0,22
15	4D3-H, 5A-B	15	13	6	14	0,30	0,29
16	4 C3-G2, 5F-H	13	9	0	8	0,00	0,00
17	3 C4-F	15	16	0	17	0,00	0,00
18	3D2-E2, 5A-B	17	14	0	19	0,00	0,00
19		41	31	4	32	0,11	0,09
20		39	35	2	45	0,04	0,05
21		25	16	0	23	0,00	0,00
22	4D2-F1	34	21	12	32	0,27	0,26
23	3A-B1, 4D3-F1	22	12	10	17	0,37	0,31

Como se observa en la tabla anterior, las regiones autosómicas introgresadas se circunscriben a un menor número de cromosomas (por ejemplo el cromosoma 2 ya no aparece) respecto a las generaciones anteriores.

Tabla 3.2.1.2.6 Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R5.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
131,06 66gl $P < 0,001$	428 1gl $P < 0,001$

Finalmente; observando la tabla 3.2.1.2.7, podemos colegir que la región 4D1-D5 parece ser responsable del rescate de la viabilidad de los machos w^+ . Si bien en algunas líneas (como la 2 o la 6) hay cierta viabilidad de estos machos a pesar de no haberse detectado ninguna introgresión autosómica. Igualmente en la línea 9 podría ser una región del cromosoma 5 la que rescatase la viabilidad de los machos w^+ .

Tabla 3.2.1.2.7. Descendencia de la R6 o sexta generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w^+ /	Machos w^+ /
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w^+
		w^+	w	w^+	w		
1		16	15	1	25	0,04	0,06
2		14	11	3	9	0,25	0,18
3		43	41	1	46	0,02	0,02
4	4D1-D5	22	21	7	26	0,21	0,24
5		14	17	1	14	0,07	0,07
6		20	21	6	39	0,13	0,23

Resultados

Tabla 3.2.1.2.7. Continuación. Descendencia de la R6 o sexta generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w ⁺ /	Machos w ⁻ /
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w ⁺
		w ⁺	w ⁻	w ⁺	w ⁻		
7	5F-H	25	18	3	16	0,16	0,11
8	4D1-D5	26	23	10	20	0,33	0,28
9	5F-H	22	35	6	46	0,11	0,21
10	4B1-G2, 5F-H	24	12	5	16	0,24	0,17
11	4D4d-G2	21	16	0	28	0,00	0,00
12	4B1-G2	38	38	24	50	0,32	0,39
13	4B1-D5	41	42	13	58	0,18	0,24
14		25	27	0	43	0,00	0,00

Tabla 3.2.1.2.8 Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R6.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
80,00 39gl $P < 0,001$	237 1gl $P < 0,001$

A continuación, se presentan los resultados de la séptima generación de retrocruzamientos. A partir de estas líneas se seleccionaron las portadoras de la región 4D1-D5, que se mostrarán en el apartado 3.2.2. Hay que destacar que la región 5F-H que parecía, en la generación anterior, ser capaz de rescatar la viabilidad de los machos híbridos, se puede descartar a tenor de los resultados obtenidos en esta generación.

Tabla 3.2.1.2.9. Descendencia de la R7 o séptima generación de retrocruzamientos.

Línea	Composición	Descendencia				Machos w^+ /	Machos w^+ /
		Hembras		Machos		Total de machos	Total de individuos w^+
		w^+	w	w^+	w		
1		28	24	0	24	0,00	0,00
2	5F-H	24	13	0	22	0,00	0,00
3	5F-H	13	5	0	12	0,00	0,00

Selec. lin 4D1- ...

Tabla 3.2.1.2.10 Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste de los cruces R7.

λ homogeneidad	λ bondad de ajuste. $H_0 = 0,04$
3,12 4gl $P = 0,54$ ns	2,7 1gl $P > 0,05$ ns

3.2.1.3 Estudio de las varianzas de los retrocruces.

El análisis de los datos transformados de los retrocruces nos permitirá estudiar la existencia o no de varianza genética asociada a los mismos.

En la tabla 3.2.1.3 se vuelven a mostrar los datos transformados de la F_1 y la R1 junto a los de los retrocruces de la R2 a la R7. Observamos que, excepto la F_1 y la R7, todos los datos son heterogéneos. Esto último, se refleja en la aparición de valores significativos de varianza genética, para el carácter viabilidad de machos híbridos, portadores de la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

Tabla 3.2.1.3 Valores de medias, varianzas y el estadístico H de los datos transformados de la F_1 y los retrocruces.

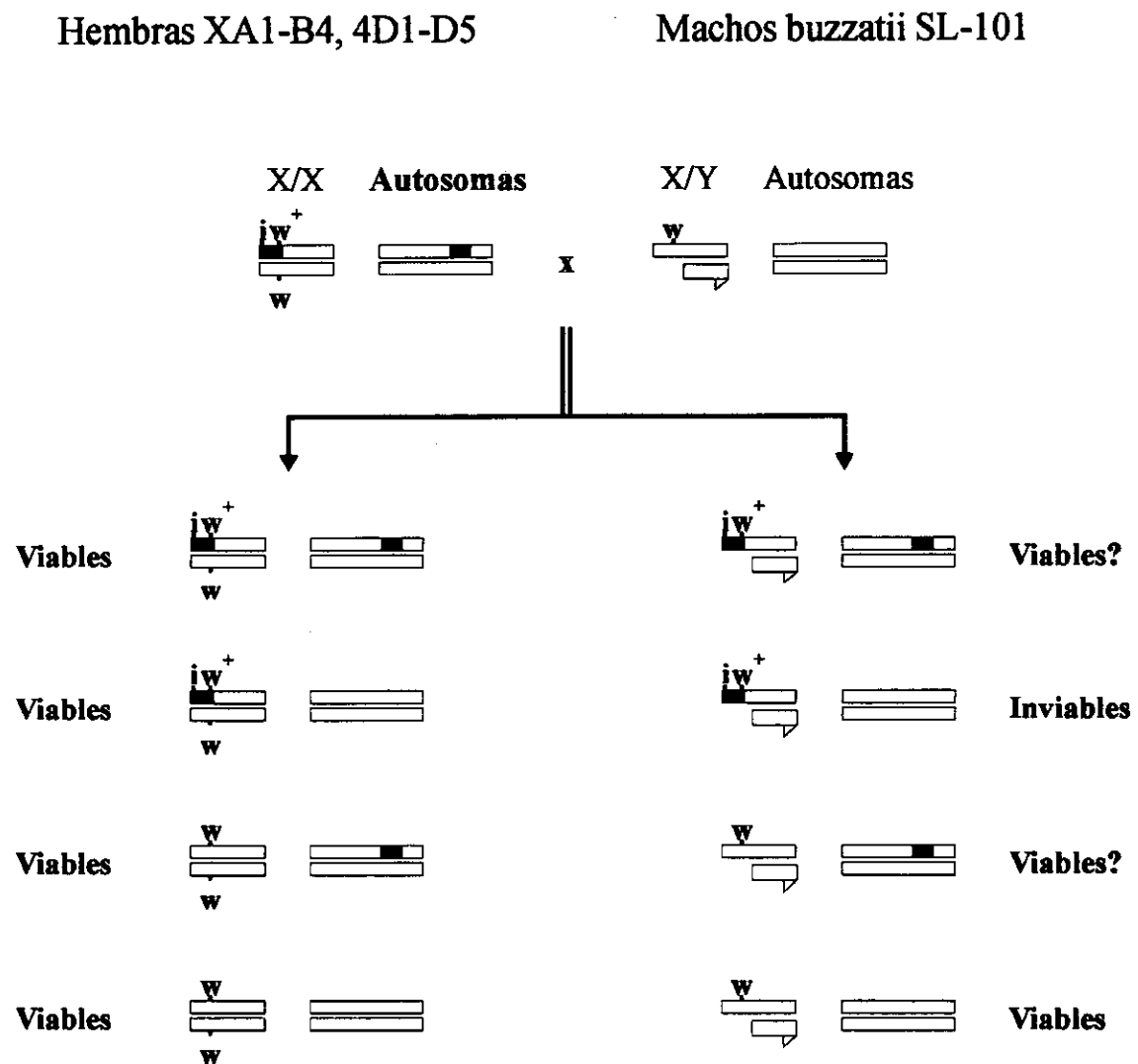
Cruce	a_m	H	$g.l$	P	S_{am}	$V_g^{1/2}$	Inferencia
F_1	0,75	14,77	16	> 0,500 ns	0,0094	—	homogéneo
R1	0,66	36,72	15	< 0,010 **	0,011	0,0086	heterogéneo
R2	0,55	34,35	7	< 0,001 ***	0,0550	0,0490	heterogéneo
R3	0,51	42,00	15	< 0,001 ***	0,0430	0,0350	heterogéneo
R4	0,40	64,20	21	< 0,001 ***	0,0340	0,0280	heterogéneo
R5	0,42	119,6	22	< 0,001 ***	0,0420	0,0370	heterogéneo
R6	0,43	54,62	13	< 0,001 ***	0,0490	0,0430	heterogéneo
R7	0,10	0,06	2	> 0,700 ns	0,011	—	homogéneo

Al hacer la comparación de las varianzas (Material y Métodos), observamos que hay un aumento significativo de la varianza genética, para el carácter en estudio, al pasar de la F_1 (no hay varianza genética) a la R1 (sí hay varianza genética). La varianza vuelve a incrementarse significativamente en el paso de la R1 a la R2 ($V_{g1}/V_{g2} = 32,46 > F_{7,15;\alpha}$; $P < 0,001$) y después se estabiliza, no siendo significativas las diferencias halladas entre las varianzas de la R2 a la R6. Finalmente en la R7 se vuelve a un valor no significativamente distinto de cero para la varianza genética, lo cual es lógico porque no hay viabilidad de machos híbridos para XA2a-A2c en ninguna línea.

3.2.2 Estudio del efecto de la región 4D1-D5 sobre la región XA2a-A2c, ambas de *D. koeperae*, en un fondo genético de *D. buzzatii*.

Se pretende confirmar si, efectivamente, la región 4D1-D5 es capaz de compensar el efecto letal de la región XA2a-A2c. Para ello, se realizan retrocruces de dos modos distintos; en el primero (figura 3.2.2.1) se cruzan, con machos buzSL-101, hembras provenientes de los

retrocruces (R6) y portadoras únicamente de las regiones XA1-B4 y 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresadas en heterozigosis en un fondo genético de buzSL-101; en el segundo tipo de cruce se cruzan hembras de inviabilidad con machos buzSL-101 introgresados en heterozigosis con la región 4D1-D5 de *D. koepferae*.



■ : *Drosophila koepferae* SL-8
 □ : *Drosophila buzzatii* SL-101

Figura 3.2.2.1. Cruces via hembra para contrastar el efecto de 4D1-D5 sobre XA1a-B4a. La región 4D1-D5 de *D. koepferae* se representa mediante un rectángulo oscuro en los autosomas.

Los resultados obtenidos en el primer grupo de cruces aparecen en la tabla 3.2.2.1. Sólo en 4 de 27 líneas no parece haber recuperación de viabilidad de los machos híbridos, puesto que su frecuencia no difiere significativamente del 0,04 esperado y se rechazan para las hipótesis de 0,25 (dos factores supresores interdependientes, necesarios ambos para el efecto supresor, y no ligados, segregando en heterocigosis frente a un letal, $p_0 = 0,20$) ó 0,5 (un factor supresor del efecto letal, $p_0 = 0,33$) de frecuencia relativa de machos.

En el resto de las líneas hay al menos cierta recuperación del efecto letal. En cinco de estas líneas se observó una aparente asinapsis del cromosoma 6 o puntiforme (figura 3.2.2.2). Esta "asinapsis" no había sido detectada en generaciones anteriores, ni lo fue en el resto de las líneas.



Figura 3.2.2.2: Microfotografía del cromosoma 6 en aparente asinapsis.

Para poner a prueba la hipótesis de $p_0 = 0,04$ se realizaron también los contrastes binomiales (Material y Métodos), no observándose ninguna diferencia en la significación de los datos respecto al estadístico λ . Dados los tamaños de muestra por línea que se manejan, se hace difícil distinguir entre las hipótesis $p_0 = 0,33$ ó $p_0 = 0,20$. Aunque parece haber un mejor ajuste para la hipótesis de 0,20 (cruce I en tabla 3.2.2.5).

La hipótesis de dos supresores necesarios ($p_0 = 0,20$) conlleva que la mitad de las líneas que heredan 4D1-D5 presentarán inviabilidad porque no habrán heredado el otro supresor. La puesta a prueba de esta hipótesis con los datos de la tabla 3.2.2.1 resultó significativa ($\lambda = 5,5$; $0,05 < P < 0,01$).

Tabla 3.2.2.1. Resultados de los cruces de hembras portadoras de las regiones XA1a-B4 y 4D1-D5 de *D. koepferae*, introgresadas en heterocigosis en un fondo genético de buzSL-101, con machos de la cepa buzSL-101.

Línea	Hembra w ⁺	Hembra w	Macho w ⁺	Macho w	λ H ₀ : 0,04	g.l
1	31	24	8	19	25,560***	1
2	25	13	5	27	9,450***	1
3	29	18	7	13	18,520***	1
4	17	12	7	11	33,300***	1
5	27	13	8	24	27,690***	1
6	22	7	1	3	0,200 ns	1
7	23	11	4	8	5,650 **	1
8	12	19	1	20	0,001 ns	1
9	34	21	12	32	52,830***	1
10	9	9	1	6	0,026 ns	1
11	10	15	3	16	7,850***	1
12	13	8	5	8	20,670***	1
13	15	14	0	13	0,017 ns	1
14	49	40	7	40	8,440 **	1
15	21	9	1	15	0,170 ns	1
16	73	63	21	79	77,630***	1
17	20	21	6	17	19,920***	1
18	19	13	5	11	13,600***	1
19	34	27	9	36	27,840***	1
20	20	15	8	18	37,860***	1
21	42	25	12	41	42,070***	1

ns: $P > 0,05$, *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Tabla 3.2.2.1. Continuación Resultados de los cruces de hembras portadoras de las regiones XA1a-B4 y 4D1-D5 de *D. koepferae*, introgresadas en heterozigosis en un fondo genético de buzSL-101, con machos de la cepa buzSL-101.

Línea	Hembra w'	Hembra w	Macho w'	Macho w	$\lambda H_0: 0,04$	g.l
22	29	17	6	14	12,510***	1
23	14	9	4	4	11,180***	1
24	23	20	9	19	42,420***	1
25	35	15	7	15	14,400***	1
26	24	13	19	7	170,500***	1
27	25	25	5	17	9,450***	1
Totales	695	496	181	533	629,000***	26

ns: $P > 0,05$, *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Posteriormente se realizaron los cruces siguiendo el segundo diseño que es igual al de la figura 3.2.2.1, salvo que el fragmento 4D1-D5 de *D. koepferae* se introgesa vía macho (respecto a la figura 3.2.2.1, las hembras serían ahora sólo XA1-B4 y los machos serían 4D1-D5); los resultados aparecen en la tabla 3.2.2.2.

Tabla 3.2.2.2. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-101 portadores de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterocigosis. No todas las líneas tienen introgresada la misma longitud de la región del 4.

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w	$\lambda H_0: 0,04$	g.l
1	18	17	2	24	0,64 ns	1
2	6	6	5	11	39,02***	1
3	22	20	4	13	6,06 *	1
4	30	10	0	30	0,43 ns	1
5	27	18	3	24	1,47 ns	1
Totales	103	71	14	102	47,62***	4

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Como se puede apreciar en la tabla, tres de cinco líneas se aceptan para la hipótesis de inviabilidad. Aunque si aplicamos el contraste secuencial de Bonferroni (Material y Métodos), son cuatro las líneas que se aceptan para esta hipótesis (se rechaza la línea 2). En la línea 3 se detecta de nuevo un cromosoma 6 aparentemente "asináptico". Debido a la heterogeneidad del tamaño de la región del 4 en esta primera tanda de cruces, se realizó una segunda tanda con línea introgresadas con un mismo segmento cromosómico (tabla 3.2.2.3).

Tabla 3.2.2.3. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-101 portadores de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis. Todas las líneas tienen introgresada la misma longitud de la región del 4.

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w	λ $H_0: 0,04$	g.l
1	11	5	4	4	14,60***	1
2	6	5	1	2	0,18 ns	1
3	23	14	11	22	63,99***	1
4	9	8	5	12	28,88***	1
5	19	21	7	24	29,86***	1
Totales	68	53	28	64	137,51***	4

ns: $P > 0,05$, *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

El análisis de los datos de la tabla 3.2.2.3 corresponde al cruce III de la tabla 3.2.2.5, donde se aprecia que ahora los datos sí son homogéneos, se acepta $p_0 = 0,33$ y se rechaza $p_0 = 0,20$ para un nivel de significación del 5%.

No obstante, la aparición de un cuerpo cromatínico similar a un homólogo del cromosoma 6 en asinapsis, planteó la posibilidad de que el cromosoma 6 de *D. koepferae* estuviera participando de alguna manera en la recuperación de la viabilidad de los machos híbridos. Para dilucidar esta cuestión se realizó un pequeño experimento cuyos resultados aparecen en la tabla 3.2.2.4. El experimento consistió en seleccionar durante diez generaciones la región cromosómica 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis en machos buzSL-101. La selección se hizo utilizando como marcador la asinapsis politénica presente en los cromosomas de los híbridos entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* (Naveira *et al*, 1986). De este modo seleccionamos la presencia citológica, y no la capacidad de recuperar la viabilidad de los machos híbridos, de la región 4D1-D5. Posteriormente, para comprobar si mantienen su capacidad de recuperación de la viabilidad, cruzamos estos machos con hembras de inviabilidad que, como ya se dijo, son portadoras exclusivamente de la región

XA1a-B4a de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis en *D. buzzatii* SL-101.

Tabla 3.2.2.4. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-101 portadores de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis después de diez generaciones de selección.

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w	λ , $H_0: 0,04$	g.l
1	18	34	21	36	239,53 ***	1
2	31	7	12	24	57,93 ***	1
3	27	12	12	13	65,97 ***	1
4	10	6	0	5	0,03 ns	1
5	50	31	8	18	12,05 ***	1
Totales	136	90	53	96		4

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Con los cruces cuyo resultado aparece en la tabla 3.2.2.4, se puso a prueba la hipótesis de si era necesario otro factor (además de 4D1-D5) de *D. koepferae* para contrarrestar el efecto letal de la región XA1a-B4a. De ser así, no observaríamos recuperación de la viabilidad de machos híbridos, porque previamente se seleccionó sólo para la presencia de uno de los factores.

En estos cruces el valor λ de homogeneidad (cruce tipo IV tabla 3.2.2.5) es significativo al uno por mil y no es posible agrupar los datos. Sólo en la línea 4 los resultados no son significativamente distintos de los esperados bajo la hipótesis de inviabilidad de machos híbridos, puesto que $P_{k-1} \leq \epsilon/k$ (ver contraste secuencial de Bonferroni en Material y Métodos); sin embargo hay que notar el pequeño tamaño de muestra en esta línea. Parece que la región 4D1-D5 de *D. koepferae* se basta por sí sola, introgresada en heterozigosis, para recuperar la viabilidad de los machos de buzSL-101 portadores de XA2a-A2c de *D. koepferae*. Los resultados obtenidos indican que si bien la penetrancia de la región 4D1-D5 en

heterozigosis es alta, su expresividad puede ser muy variable.

Tabla 3.2.2.5. Valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste (λ_H y λ_{H_0}) para los cruces con las regiones 4D1-D5 y XA1a-B4a de *D. koepferae*, bajo las hipótesis de valores esperados de machos w^+ 0,33 ó 0,20.

Cruce	λ_H	g.l	Inferencia	$\lambda_{0,33}$	$\lambda_{0,20}$	g.l
I	122,67 ***	78	heterogéneo	59,75 ***	0,20 ns	1
II	27,50 **	12	heterogéneo	22,47 ***	4,23 *	1
III	9,94 ns	12	homogéneo	0,48 ns	4,48 *	1
IV	45,05 ***	12	heterogéneo	1,88 ns	7,15 ***	1

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$. Cruce I: madres portadoras de la región 4D1-D5 de *D. koepferae*, cruces II, III y IV: padres portadores de la misma región de *D. koepferae*.

En la tabla 3.2.2.6 aparecen los valores obtenidos mediante la transformación arcoseno de los datos arriba expuestos: los cruces de hembras portadoras de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* (notados como cruce I) y los cruces de machos portadores de la misma región de *D. koepferae* (notados como cruces II, III y IV).

Tabla 3.2.2.6. Valores de los estadísticos para los datos transformados de los cruces con las regiones 4D1-D5 y XA1a-B4a de *D. koepferae*.

Cruce	a_m	H	S_{am}	$V_g^{1/2}$	g.l	P	Inferencia
I	0,47	37,99	0,0204	—	26	ns	homogéneo
II	0,33	15,31	0,0904	0,0777	4	**	heterogéneo
III	0,58	1,02	0,0258	—	4	ns	homogéneo
IV	0,55	24,23	0,0895	0,0818	4	***	heterogéneo

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

En la tabla 3.2.2.6 observamos que el primer tipo de cruces (hembras portadoras de la región del cromosoma 4 de *D. koepferae*) aparece como homogéneo, cuando antes (datos sin transformar, cruce I en tabla 3.2.2.5) era heterogéneo.

3.3 EL SISTEMA XA2a-A2c, 4D1-D5 DE *D. KOEPFERAE* EN LA ESPECIE GEMELA *D. BUZZATII*.

Sabemos que existen interacciones entre factores contenidos en las regiones XA2a-A2c y 4D1-D5 de *D. koepferae*. El factor contenido en XA2a-A2c se comporta como letal en *D. buzzatii* en ausencia de la región 4D1-D5 y, posiblemente, interaccione también con otras regiones no localizadas de *D. koepferae*. Ignoramos si esta región del cromosoma 4 contiene algún factor que puesto en homocigosis y en ausencia de la región XA2a-A2c de *D. koepferae*, provoque, a su vez, letalidad en *D. buzzatii*.

Además, si en la región 4D1-D5 de *D. koepferae* existe algún factor que, realmente, recupera por sí solo la viabilidad de los machos híbridos portadores de XA2a-A2c, entonces, en los cruces de las llamadas hembras de inviabilidad con machos de *D. buzzatii* híbridos, homocigotos para esta región del 4, la viabilidad de los machos w^+ debiera ser la misma que la de hembras w^+ .

Para comprobar si la introgresión de la región 4D1-D5 en homocigosis tiene algún efecto letal y, por otro lado, confirmar el efecto de esta región a la hora de recuperar la viabilidad de los machos híbridos portadores del letal contenido en XA2a-A2c, se diseñó un protocolo de cruces para ponerla en homocigosis.

3.3.1 Puesta en homocigosis de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-inv4s.

Se utilizó la inversión *4s* (4D1-F1) del cromosoma 4 de *D. buzzatii* como marcador cromosómico. Las secuencias estándar de los cromosomas politénicos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* son idénticas, lo que provoca que sea indistinguible si un fragmento en homocigosis (no hay asinapsis) es de una u otra especie. El diseño de cruces utilizado para poner en homocigosis la región de *D. koepferae* es el de la figura 2.3.3 de Material y Métodos. Se comprobó que los adultos de ambos sexos homocigotos para la región

introgresada eran viables. Esto permitió establecer una nueva cepa híbrida, con la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en homocigosis en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-inv4s. La razón sexual de esta cepa híbrida fue $R = 1,47$ (tabla 3.3.1.1) aunque el conjunto de los datos no fue homogéneo $\lambda_H = 23,36$; $10g.1$; $P = 0,009^{**}$, lo cual presupone que el defecto de hembras no afecta a todas las líneas. Los machos híbridos, sin embargo, son semiestériles, esto es, la cantidad de esperma de un macho apenas es suficiente para dejar una descendencia de unos pocos individuos (tabla 3.3.1.2).

Tabla 3.3.1.1. Descendencia de la cepa híbrida introgresada con la región 4D1-D5 en homocigosis.

Línea	Hembras	Machos
1	30	32
2	8	16
3	8	18
4	15	6
5	49	65
6	22	41
7	64	88
8	23	24
9	46	59
10	22	59
11	6	19
Totales	293	427

Tabla 3.3.1.2. Número de descendientes producidos en cruces entre *D. buzzatii* y la cepa híbrida introgresada con la región 4D1-D5 en homocigosis. Vía macho: machos híbridos x hembras *buzzatii* (1x1). Vía hembra: hembras híbridas x machos *buzzatii* (1x1). En la tercera columna aparecen los resultados de cruces individuales de un macho y una hembra de la cepa de *D. buzzatii* sin introgresiones.

Cruces	Nº descendientes cruces vía macho	Nº descendientes cruces vía hembra	Control
1	12	116	127
2	10	144	87
3	7	36	43
4	2	113	79
Totales	31	409	336

3.3.2 Cruces de hembras de inviabilidad con machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5.

El diseño de los cruces es el que aparece en la figura 3.3.2. Debe tenerse en cuenta que los machos utilizados no son mutantes *white*, mientras que las hembras son heterocigóticas para dicha mutación. Por ello, en la descendencia, aunque todas las hembras son de fenotipo salvaje, se esperaba encontrar ½ de "homocigóticas" ($w^+ \text{-buz}/w^+ \text{-koe}$) y ½ de heterocigóticas ($w \text{-buz}/w^+ \text{-buz}$).

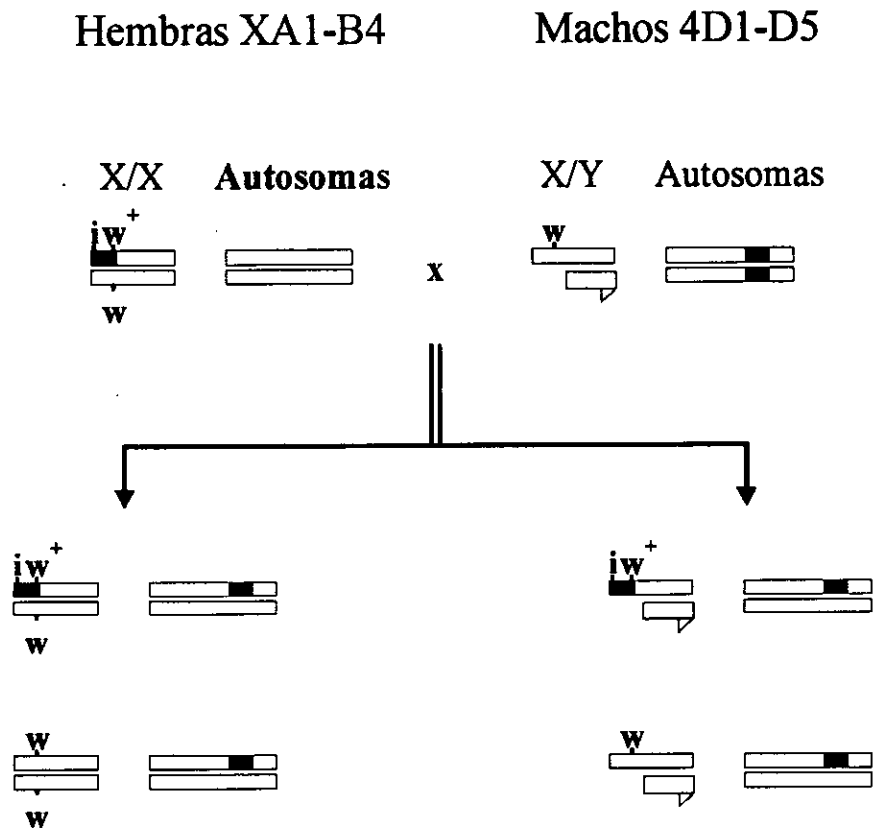


Figura 3.3.2. Cruces de hembras de inviabilidad (portadoras de XA1a-B4a de *D. koepferae* (k) introgresado en heterocigosis en *D. buzzatii* (b) SL-101) con machos híbridos homocigotos 4D1-D5 de *D. koepferae* en *D. buzzatii*. Todos los descendientes son heterocigotos para 4D1-D5 *D.koepferae/D. buzzatii* (b/k). El resto de los autosomas son de *D. buzzatii* SL-inv4s. i: el factor de inviabilidad ubicado en XA2a-A2c de *D. koepferae*.

En la tabla 3.3.2.1 se dan los resultados obtenidos para estos cruces.

Tabla 3.3.2.1. Resultados de los cruces de hembras de inviabilidad con machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzati* SL-inv4s.

Línea	Hembras w^+	Machos w^+	Machos w
1	51	23	15
2	39	14	28
3	12	9	6
4	13	1	3
5	20	14	5
6	17	11	12
Total	152	72	69

Lo primero que llama la atención de las descendencias de la tabla 3.3.2.1 es el mayor número de machos w^+ que de machos w . Por otro lado hay que tener en cuenta que sólo la mitad de las hembras w^+ se espera sean híbridas, portadoras de XA1a-B4a de *D. koepferae* introgresado en heterocigosis. Por ello se espera que la frecuencia de machos w^+ sea la mitad que la de hembras w^+ si ambos sexos híbridos tuviesen la misma viabilidad. En la tabla 3.3.2.2 se dan los valores λ de homogeneidad y de bondad de ajuste para las hipótesis de:

1. Inviabilidad de machos w^+ respecto a individuos (machos y hembras) w^+ híbridos, $p_0 = 0,04$.
2. Viabilidad total de machos w^+ ($p_0 = 0,50$). Sería el caso en que el factor supresor presente en la región 4D1-D5 de *D. koepferae* es suficiente para compensar el efecto del letal.

Tabla 3.3.2.2. Valores λ de homogeneidad (λ_H) y de bondad de ajuste (λ_p) para las frecuencias relativas de machos w^+ de las descendencias de los cruces de la tabla 3.3.2.1.

Cruce	λ_H	g.l	Inferencia	$\lambda_{0,04}$	$\lambda_{0,50}$	g.l
inv x 4D1-D5	7,88 ns	5	homogéneo	1023 ***	0,04 ns	1

Cruce inv x 4D1-D5: hembra de inviabilidad por machos híbridos homocigotos 4D1-D5 de *D. koepferae* en *D. buzzatii* SL-inv4s. ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $0,001 > P$.

Como se observa en la tabla 3.3.2.2, las líneas de los cruces de hembras de inviabilidad con machos híbridos homocigotos 4D1-D5 son homogéneas para los datos de individuos w^+ (columnas 2 y 3 de la tabla 3.2.2.1). Como se aprecia en la tabla 3.3.2.2, se acepta la hipótesis $p_0 = 0,50$ y se rechaza $p_0 = 0,04$. En la tabla 3.3.2.3 se muestran los estadísticos asociados a los datos arco-seno-transformados. Observamos que el valor del estadístico de homogeneidad es, de nuevo, no significativo. Luego el valor de varianza genética obtenido es también no significativo.

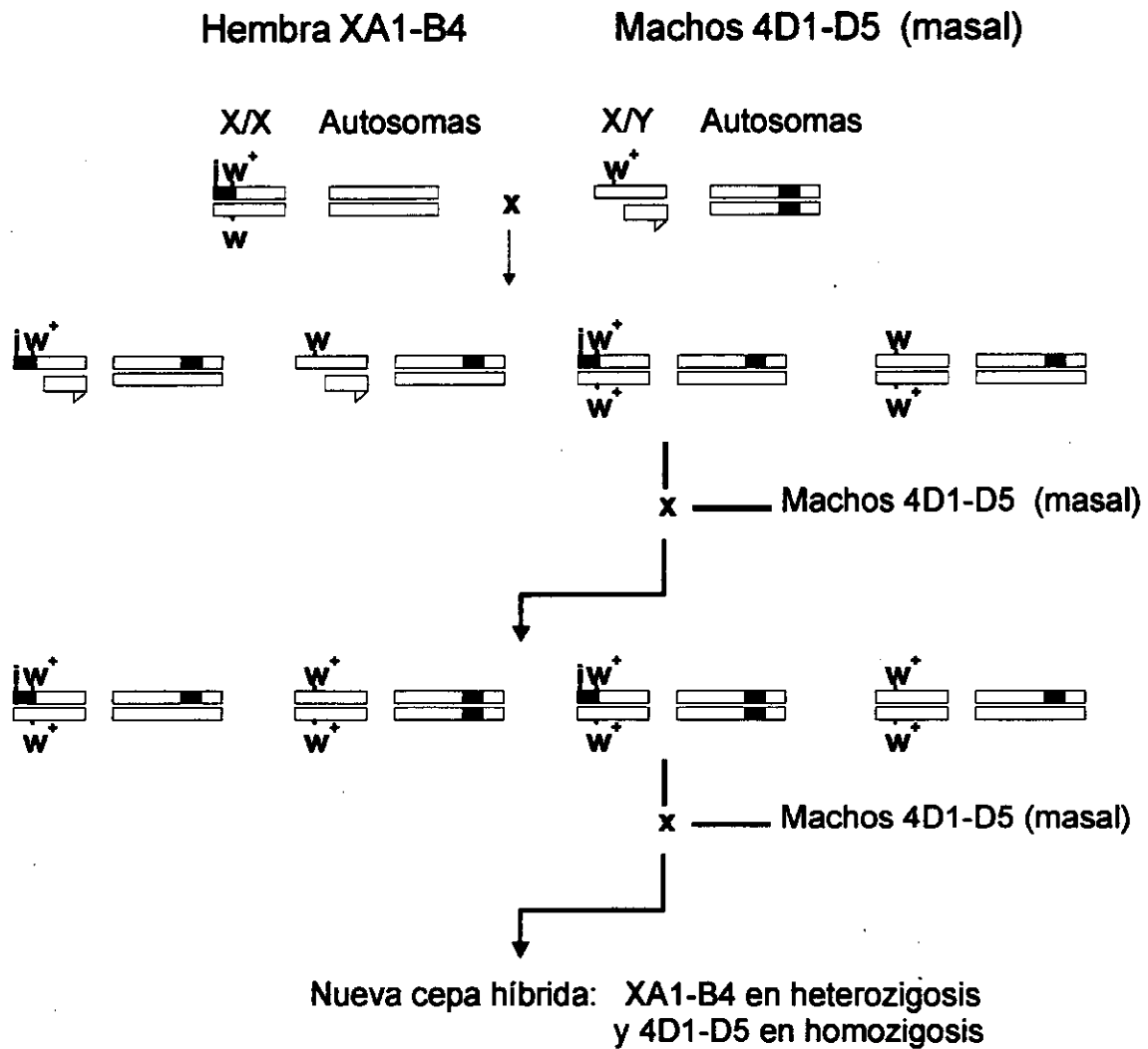
Tabla 3.3.2.3. Valores de los estadísticos para los datos transformados de las frecuencias relativas de machos w^+ de las descendencias de los cruces de la tabla 3.3.2.1.

Cruce	a_m	H	S_{am}	$V_g^{1/2}$	g.l.	P	Inferencia
inv x 4D1-D5	0,60	8,34	0,043	0,027	5	ns	homogéneo

Cruce inv x 4D1-D5: hembra de inviabilidad por machos híbridos homocigotos 4D1-D5 de *D. koepferae* en *D. buzzatii* SL-inv4s. ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $0,001 > P$.

3.3.3 Estudio de la viabilidad y aparición de alteraciones morfológicas en híbridos introgresados con la región XA1a-B4a en heterocigosis o hemizigosis y la región 4D1-D5 en homocigosis.

A fin de comprobar la viabilidad de machos y hembras híbridos introgresados con las regiones del X y del 4 (esta última en homocigosis), se cruzaron hembras de inviabilidad con machos introgresados con 4D1-D5 en homocigosis. Las hembras descendientes se retrocruzaron individualmente con el mismo tipo de machos. De la descendencia obtenida, nuevamente, se cruzaron hembras (que estarán introgresadas con la región 4D1-D5 en heterocigosis u homocigosis) con machos de la misma clase utilizada en los dos cruces anteriores, y se seleccionaron, mediante el análisis del cariotipo politénico de larvas de tercer estadio de la descendencia, aquellos cruces donde estuvieron presentes en las madres ambas regiones, del X y del 4, introgresadas en heterocigosis y homocigosis respectivamente (figura 3.3.3.1).



■ : *Drosophila koepferae* SL-8

□ : *Drosophila buzzatii* SL

Figura 3.3.3.1. Diseño de cruces para obtener hembras híbridas heterocigotas para XA1a-B4a y homocigotas para 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresadas en *D. buzzatii*. D. koep: *D. koepferae*; D. buz: *D. buzzatii*; i: el factor de inviabilidad contenido en XA2a-A2c de *D. koepferae*.

En la tabla 3.3.3.1 se muestran los resultados de las descendencias obtenidas en cruces de estas hembras híbridas con machos híbridos homocigotos para la región del 4. En estos cruces aparecieron una serie de alteraciones morfológicas no apreciadas hasta ese

momento. En la tabla 3.3.3.2 se dan las frecuencias de las distintas alteraciones morfológicas que aparecieron en las líneas de la tabla 3.3.3.1.

Tabla 3.3.3.1. Resultados de los cruces de hembras híbridas heterocigotas para XA1a-B4 y homocigotas para 4D1-D5 con machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzati* SL-inv4s. Entre paréntesis aparece el número de descendientes con alteraciones morfológicas.

Línea	Hembras w^+	Machos w^+
1	50 (1)	58 (-)
2	37 (6)	75 (27)
3	39 (18)	78 (58)
4	5 (1)	8 (5)
5	11 (3)	24 (9)
6	7 (3)	5 (4)
7	33 (13)	59 (42)
Total	182 (45)	307 (145)

De la observación de la tabla 3.3.3.1 parece desprenderse que haya una menor viabilidad de hembras. Menor viabilidad que ya parecía observarse en algunas líneas de los cruces de mantenimiento de la cepa (tabla 3.3.1.1).

Tabla 3.3.3.2. Frecuencias de las distintas alteraciones morfológicas que aparecieron en las líneas de la tabla 3.3.3.1.

Línea	Total descendencia	Vena 5 incompleta	Genitalia rotada	Abdomen alterado
1	108	1		
2	112	32		1
3	117	72	1	3
4	13	4		2

Tabla 3.3.3.2. Continuación. Frecuencias de las distintas alteraciones morfológicas que aparecieron en las líneas de la tabla 3.3.3.1.

Línea	Total descendencia	Vena 5 incompleta	Genitalia rotada	Abdomen alterado
5	35	12		
6	12	7		
7	92	54		1
Totales	489	182	1	7

La más frecuente de las alteraciones morfológicas observadas (tabla 3.3.3.2)) fue el fenotipo de vena 5 incompleta. Otras alteraciones consistieron en malformaciones de la región dorsal del abdomen (como ausencia de tergitos, ver figura 3.3.3.2 en página 151) y genitalia rotada (incluso falta completa de genitalia externa en algunos casos).

En la tabla 3.3.3.8 se dan los valores del estadístico λ , así como los correspondientes a las transformaciones arcoseno. Se observa que los datos pueden considerarse homogéneos y que efectivamente se rechaza la hipótesis de igual viabilidad de machos y hembras ($p_0 = 0,5$). p , aquí, corresponde a la frecuencia de machos respecto al total de individuos.

En la línea 7 de la tabla 3.3.3.1 no se pudo diagnosticar, tras el análisis de ocho larvas hembra de su descendencia, la presencia de la región XA2a-A2c introgresada en la madre. Ello nos hizo sospechar que el posible defecto de hembras, así como las alteraciones fenotípicas observadas (principalmente vena 5 incompleta) estuvieran relacionadas con la puesta en homocigosis de la región 4D1-D5 de *D. koepferae*, sin importar la presencia de la región del cromosoma X de *D. koepferae*.

Para discernir si las alteraciones observadas se asocian a la región introgresada del cromosoma 4 de *D. koepferae* en homocigosis, o a sus relaciones con la inversión *4s* de *D. buzzatii*, o, incluso, a la presencia de esta región de *D. koepferae* en heterocigosis en uno de los progenitores; se presentan los resultados de una serie de cruces (tablas de la 3.3.3.3 a la 3.3.3.7) algunos de los cuales si bien ya se habían realizado previamente, se revisan ahora. Los valores que aparecen entre paréntesis en las tablas se refieren a individuos con

alteraciones morfológicas.

Tabla 3.3.3.3. Resultados de los cruces masales de hembras y machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzatii* SL-inv4s. Entre paréntesis aparece el número de descendientes con alteraciones morfológicas.

Línea	Hembras w ⁺	Machos w ⁺
1	30 (1)	32 (3)
2	8	16 (2)
3	8	18 (1)
4	15	6
5	49 (1)	65 (2)
6	22	41
7	64	88 (4)
8	23	24
9	46 (2)	59
10	22 (5)	59 (25)
11	6 (1)	19 (11)
Total	293 (10)	427 (48)

Tabla 3.3.3.4. Resultados de los cruces de hembras individuales y machos masales, híbridos homocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgesada en *D. buzzatii* SL-inv4s.

Línea	Hembras w^+	Machos w^+
1	20	32
2	23	52
3	22	27 (1)
4	20 (1)	35 (7)
5	32	24
6	9 (2)	12 (1)
7	27 (1)	49 (2)
Total	153 (4)	231 (11)

Tabla 3.3.3.5. Resultados de los cruces individuales de hembras híbridas homocigotas para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgesada en *D. buzzatii* SL-inv4s con machos de *D. buzzatii* SL-inv4s.

Línea	Hembras w^+	Machos w^+
1	59	57
2	52	92
3	78 (1)	81 (11)
Total	189 (1)	230 (11)

Tabla 3.3.3.6. Resultados de los cruces individuales de hembras híbridas homocigotas para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzatii* SL-inv4s con machos híbridos heterocigotos para 4D1-D5 en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-inv4s.

Línea	Hembras w^+	Machos w^+
1	21	15 (1)
2	54	59
3	13	9
4	29	26
5	64	54 (1)
6	104 (1)	115 (2)
Total	285 (1)	278 (4)

En las tablas arriba expuestas se observa, excepto en la última (tabla 3.3.3.6), un cierto defecto de hembras.

A continuación, se presentan en la tabla 3.3.3.7 los datos recopilados de cruces de hembras de *D. buzzatii* SL-101 con machos híbridos en heterocigosis para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-101. El interés de revisar estos datos consiste en estudiar si ya se observaba defecto de hembras en estos cruces. Los individuos son todos w .

Tabla 3.3.3.7. Resultados de los cruces individuales de hembras de *D. buzzatii* SL-101 y machos híbridos heterocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzatii* SL-101.

Línea	Hembras w	Machos w
1	36	25
2	30	41
3	22	25
4	16	11
5	14	13
6	23	30
7	42	43
8	25	21
9	15	21
10	46	29
11	57	47
12	47	46
Total	373	352

Como se observa en la tabla, no hay defecto de hembras.

En la tabla 3.3.3.8 se presentan los valores de λ de homogeneidad y de bondad de ajuste, así como el valor de los distintos estadísticos, calculados a partir de los datos transformados, para los seis tipos de cruces anteriormente expuestos en las tablas de la 3.3.3.1 a la 3.3.3.7. Se contrastó el ajuste a la hipótesis de igual viabilidad de machos y hembras ($p_0 = 0,5$). Siendo p la frecuencia relativa de machos respecto al total de individuos.

A la vista de los análisis de los cruces presentados en la tabla 3.3.3.8 parece claro que el posible efecto de inviabilidad parcial de las hembras no depende de la presencia de la región del cromosoma X de *D. koepferae*. Las pruebas de bondad de ajuste dan valores

significativos de defecto de hembras en los tres primeros tipos de cruces, aquellos en que los progenitores masculinos y femeninos eran homocigotos para la región del cromosoma 4 de *D. koepferae*. Las varianzas genéticas halladas sólo son significativas (valores significativos de H) en el caso de los cruces 4 k/k masal (hembras y machos homocigotos para la región del 4) y 4 k/s (hembras homocigotas cruzadas con machos buzSL-inv4s). En cuanto a las frecuencias de las alteraciones hay que decir que si bien los números de individuos con ellas no son muy elevados, se debe a que inicialmente sólo se contabilizaron las alteraciones morfológicas más llamativas, como alteraciones en la disposición o presencia de los tergitos, la genitalia rotada o ausente en los machos, etc. De hecho, en las líneas donde se contabilizaron los fenotipos de vena 5 incompleta (cruces de la tabla 3.3.3.1) la frecuencia de las alteraciones sube hasta casi alcanzar frecuencias de la mitad de individuos.

Tabla 3.3.3.8. Valores de λ y valores estimados tras la transformación por el arcoseno, de los datos de las tablas 3.3.3.1 a 3.3.3.7.

Cruce	λ_H	g.l	$\lambda_b 0,5$	a_m	H	s_{am}	$(V_E)^S$
X b/k, 4 k/k	8,27 ns	6	31,45 ***	0,91	7,78 ns	0,026	0,012
4 k/k masal	23,36 **	10	24,57 ***	0,88	22,9 *	0,028	0,021
4 k/k	11,14 ns	6	15,44 ***	0,88	10,76 ns	0,034	0,023
4 k/s	7,26 *	2	3,82 ns	0,83	7,28 *	0,047	0,040
4 k/k x 4 k/s	3,42 ns	5	0,06 ns	0,78	3,31 ns	0,017	—
4 b/b x 4 b/k	11,35 ns	11	0,55 ns	0,77	11,07 ns	0,019	0,0015

X b/k, 4 k/k: Cruces de hembras híbridas heterocigotas para XA1a-B4a y homocigotas para 4D1-D5 de *D. koepferae* en *D. buzzatii* SL-inv4s con machos híbridos homocigotos para 4D1-D5; 4 k/k masal: Cruces masales de individuos híbridos homocigotos para 4D1-D5; 4 k/k: Cruces individuales (una hembra con varios machos) de individuos híbridos homocigotos para 4D1-D5; 4 k/s: Cruces individuales de hembras híbridas homocigotas 4D1-D5 con machos de la cepa buzSL-inv4s; 4 k/k x 4 k/s: Cruces individuales de hembras híbridas homocigotas 4D1-D5 con machos híbridos heterocigotos para 4D1-D5 en fondo genético buzSL-inv4s; 4 b/b x 4 b/k: Cruces individuales de hembras de la cepa buzSL-101 con machos híbridos heterocigotos para 4D1-D5 en un fondo genético de buzSL-101. λ_H : λ de homogeneidad; $\lambda_b p$: λ de bondad de ajuste para $H_0 = p$. Los grados de libertad se refieren a ambas pruebas de heterogeneidad λ_H y H , el número de grados de libertad de las pruebas de bondad de ajuste es 1. ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Posteriormente se tomaron individuos híbridos homocigotos 4D1-D5 de ambos sexos y se dividieron en dos categorías:

1. Individuos con vena 5 completa en ambas alas.
2. Individuos con vena 5 incompleta en ambas alas.

Se cruzaron hembras de la categoría 1 con machos de la categoría 1 (cruce 1×1) y hembras de la categoría 2 con machos de la categoría 2 (cruce 2×2). Los resultados (tabla 3.3.3.9) muestran que el carácter es fácilmente seleccionable.

Tabla 3.3.3.9. Resultados de los cruces de las dos categorías, vena 5 completa (1) y vena 5 incompleta (2), de hembras y machos híbridos homocigotos para la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzatii* SL-inv4s.

Cruce	Hembras w^+	Machos w^+
1×1	8	16 (5)
2×2	25 (22)	18 (17)
2×2	21 (21)	23 (23)
2×2	33 (28)	38 (33)

Los valores entre paréntesis indican fenotipos de vena 5 incompleta en ambas alas excepto en el cruce 1×1.

Los cinco individuos con fenotipo vena 5 incompleta de la categoría 1×1 corresponden a fenotipos de vena 5 muy ligeramente incompleta y en tres de los cinco casos afectando a una sola ala.

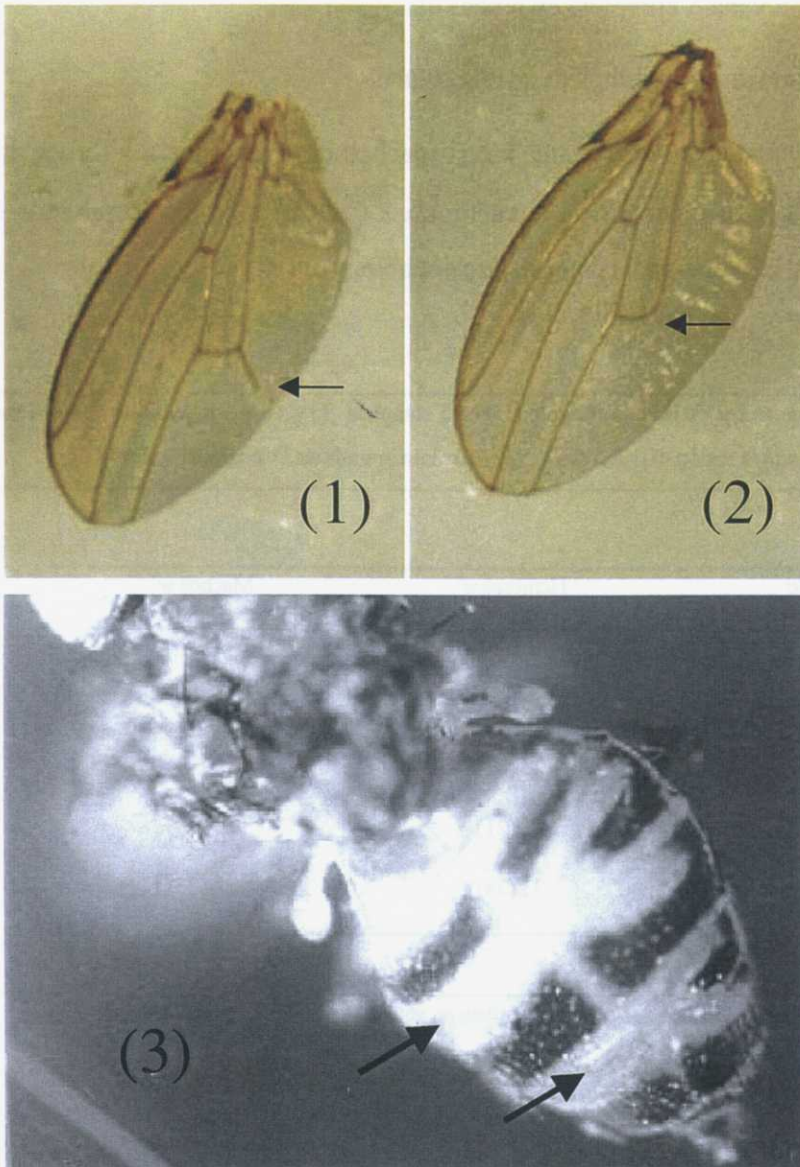


Figura 3.3.3.2: Microfotografías de vena 5 ligeramente incompleta (1); incompleta (2) y de tergitos ausentes o alterados (3).

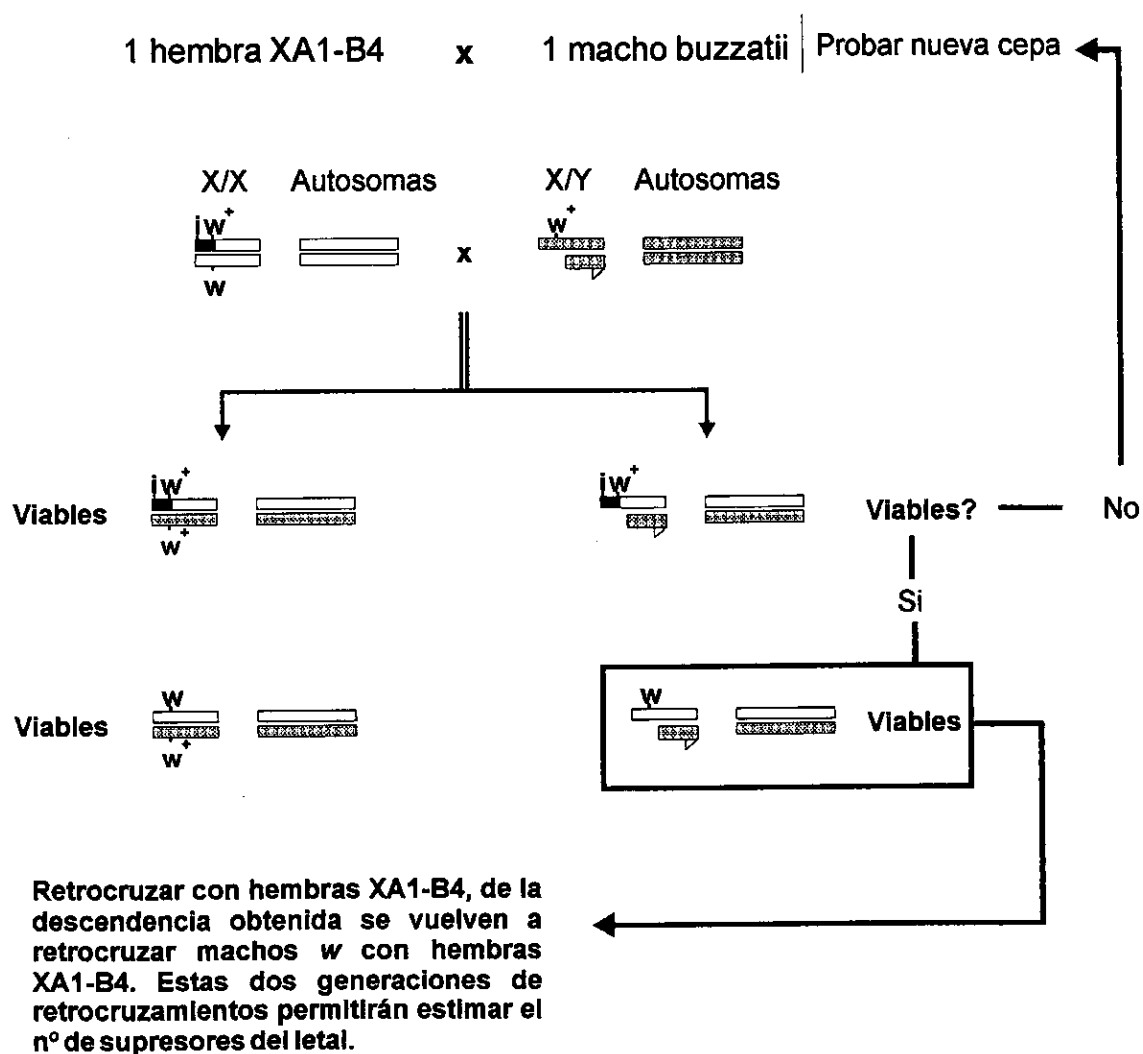
3.4 EFECTO DEL FACTOR CONTENIDO EN $X_{A2a-A2c}$ DE *D. KOEPFERAE* EN DISTINTAS CEPAS DE *D. BUZZATII*.

Se trató de responder a la pregunta: *¿existe variabilidad en D. buzzatii respecto al efecto letal del factor contenido en la región $X_{A2a-A2c}$ de D. koepferae?*

Se diseñó un protocolo de cruces (figura 3.4) que permitió contrastar si el efecto de este factor variaba en el fondo genético de las distintas cepas de *D. buzzatii* probadas. Tal y como aparece en la figura, se cruzaron individualmente hembras de inviabilidad con machos de diferentes cepas de *D. buzzatii*. Si en un tipo de cruce el efecto del factor era el mismo que el observado en la cepa buzSL-101 (cepa *white*), entonces se esperaría que en todas las líneas o réplicas de ese cruce la frecuencia relativa p de machos entre los híbridos no fuera significativamente diferente de 0,04.

Se cruzaron distintas cepas de *D. buzzatii*, incluyendo un cruce control con la cepa buzSL-101.

Aparte de registrar la mencionada variabilidad en cuanto a los efectos del letal (apartado 3.4.1), se planteó un segundo objetivo, que consistió en tratar de estimar el número de factores que contribuirían a la supresión del efecto letal (apartado 3.4.2). Para ello, tal y como aparece en la figura 3.4, si se detecta una cepa con efecto supresor en todas las líneas, se seleccionan los machos w , hermanos de los machos w^+ , y se retrocruzan con hembras de inviabilidad obteniéndose la R1 y repitiéndose el proceso (selección de machos $w...$) para obtener la R2.



■ : *Drosophila koepferae* SL-8

▨ : *Drosophila buzzatii*

□ : *Drosophila buzzatii* SL-101

Figura 3.4. Diseño de cruces para detectar cepas con efecto supresor sobre el letal (i = letal).

3.4.1 Análisis de los resultados de los cruces de hembras híbridas portadoras en heterozigosis de la región XA1a-B4a de *D. koepferae* introgresada en *D. buzzatii* SL-101 (hembras de inviabilidad), con machos de distintas cepas de *D. buzzatii*.

En la tabla 3.4.1.1 se muestran los valores λ de homogeneidad y bondad de ajuste (para la hipótesis inviabilidad de machos w^+) de los resultados obtenidos en todos los cruces realizados (tablas 3.4.1.2 a la 3.4.1.13). En esa misma tabla aparecen también los valores de los estadísticos de los datos arco-seno-transformados. Se aprecia que cuatro cepas produjeron descendencias que presentan diferencias significativas con la hipótesis de inviabilidad. Así mismo sólo en tres de ellas se aprecia un valor significativo de varianza genética.

Tabla 3.4.1.1. Valores de los estadísticos λ y arco-seno-transformados de los cruces de hembras de inviabilidad con distintas cepas de *D. buzzatii*. Se denomina el cruce con el nombre de la cepa de *D. buzzatii* utilizada.

Cruce	λ_H	g.l	λ_b 0,04	a_m	H	g.l	s_{am}	$(V_g)^{1/2}$
buzSL-101	18,95 ns	21	0,49 ns	0,24	8,17 ns	7	0,042	—
buzSL-5 (1)	30 ns	20	4096 ***	0,53	15,76 ns	10	0,018	—
buzSL-5 (2)	30,6 ***	8	274,6 ***	0,50	14,45 **	4	0,056	0,048
buzSL-6	3,58 ns	6	0,27 ns	0,19	0,27 ns	3	0,010	—
buzSL-inv4s(1)	19,5 **	6	17,15 ***	0,25	12,22 **	3	0,080	0,070
buzSL-inv4s(2)	11,7 ns	16	0,84 ns	0,17	11,28 ns	8	0,028	—
buzSL-inv5I	25,6 ns	22	0,61 ns	0,14	8,05 ns	11	0,019	—
buzDF	15,39 ns	10	24,17 **	0,24	16,08 **	5	0,055	0,046
buzC	13,27 ns	8	3,52 ns	0,21	6,42 ns	4	0,050	—
buzP	7,99 ns	6	1,71 ns	0,21	1,78 ns	3	0,033	—
buzPR	8,05 ns	6	0,76 ns	0,20	3,40 ns	3	0,056	—
buzM	12,6 ns	10	8,54 **	0,23	8,07 ns	5	0,045	—

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

El primer cruce (buzSL-101) corresponde a un control, puesto que es el cruce del cual se obtuvo el valor de la frecuencia esperada de machos w^+ híbridos. De la observación de la tabla 3.4.1.1 se colige que los datos de este cruce fueron homogéneos y la frecuencia p no fue significativamente diferente de la esperada bajo la hipótesis de inviabilidad $p_0 = 0,04$. Además, la varianza genética no fue significativamente distinta de cero. Por otro lado, aparecieron algunos fenotipos de vena 5 incompleta en las líneas 2 y 3 (tabla 3.4.1.2). En la línea 3 se detectó en una larva macho la presencia de un cuerpo similar al cromosoma puntiforme ("dot").

Las descendencias del cruce control se muestran en la tabla 3.4.1.2.

Tabla 3.4.1.2. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-101.

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+	Macho w
1	22	17	1	25
2	30	29	3	27
3	19	17	3	16
4	19	15	0	9
5	13	9	0	14
6	29	19	0	17
7	13	10	1	14
8	14	11	1	4
Totales	159	127	9	126

En cuanto a los cruces con el resto de las cepas, es preciso tener en cuenta que el macho progenitor es w^+ y la hembra de inviabilidad es w^+/w ; luego en la descendencia no hay hembras de fenotipo w , pero sí machos. Por ello, para contrastar $p_0 = 0,04$ debe dividirse el número de hembras w^+ por la mitad. Esto es así debido a que, excepto en los cruces con buzSL-101, en el resto sólo la mitad de las hembras de fenotipo w^+ se espera sean híbridas,

portadoras de XA1a-B4a de *D. koepferae* introgresado en heterozigosis.

Los datos de las descendencias de las cepas en que se acepta la hipótesis de inviabilidad, aparecen en las tablas 3.4.1.3 a 3.4.1.7. Estas cepas son (ver los contrastes en la tabla 3.4.1.1): buzSL-6 (San Luís, Argentina), tabla 3.4.1.3; buzSL-inv5I (San Luís, Argentina, con la inversión 5I fijada), tabla 3.4.1.4; buzC (Carboneras, Almería-España), tabla 3.4.1.5; buzP (Plasencia, Cáceres-España), tabla 3.4.1.6; buzPR (Puebla del Río, Sevilla-España), tabla 3.4.1.7.

En todos estos cruces, los datos fueron homogéneos y no aparecieron valores significativos de varianza genética.

En los cruces con buzSL-6 (tabla 3.4.1.3) debe notarse que en la línea 2, donde el factor de inviabilidad y el alelo w^+ recombinaron, la frecuencia de machos w^+ es significativamente superior ($\lambda = 6,48$; 1gl; $P < 0,05$) a la de machos w , y ligera, aunque no significativamente ($\lambda = 1,26$; 1gl; $P > 0,05$), superior a la de la mitad de la frecuencia de hembras. Posiblemente este exceso de machos w^+ recombinantes pone de manifiesto la inferior viabilidad de los mutantes white.

Tabla 3.4.1.3. Cruces individuales de hembras de inviabilidad con machos de buzSL-6.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	56	2	25
2 (recombinó la región XA2a-A2c)	68	45	23
3	55	1	21
4	43	1	24
5	35	1	9
Total (sin incluir líneas recombinantes)	189	5	79

Tabla 3.4.1.4. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-inv5L

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	36	1	18
2	58	3	21
3	36	0	19
4	38	0	7
5	32	1	11
6	23	0	13
7	22	1	7
8	42	0	13
9	63	0	28
10	22	0	16
11	122	2	47
12	14	0	1
Totales	508	8	201

En los cruces con la cepa buzC (tabla 3.4.1.5) se observa en la línea 6, que es recombinante, un exceso de machos w^+ , que, si bien no es significativo ni en la comparación con la mitad de las hembras ($\lambda = 1,88$; 1gl; $P > 0,05$) ni con los machos w ($\lambda = 3,05$; 1gl; $P > 0,05$), parece nuevamente apoyar la hipótesis de una menor viabilidad de los portadores del cromosoma w . Este exceso de machos w^+ recombinantes se observará en prácticamente todos los casos de líneas recombinantes, en los cruces de hembras de inviabilidad con las distintas cepas de *D. buzzatii*.

Tabla 3.4.1.5. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzC.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	26	2	4
2	22	1	4
3	26	3	5
4	31	0	3
5	27	0	12
6 (recombinó la región XA2a-A2c)	15	15	6
Totales (sin incluir líneas recombinantes)	132	6	28

Tabla 3.4.1.6. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzP.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	37	2	16
2	26	0	2
3	40	2	19
4(recombinó la región XA2a-A2c)	75	55	36
5	29	1	12
6(recombinó la región XA2a-A2c)	31	16	21
Totales (sin incluir líneas recombinantes)	132	5	49

Tabla 3.4.1.7. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzPR.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	26	2	3
2	15	1	3
3	29	0	12
4	16	0	3
Totales	86	3	21

En cuanto a las cepas en que las frecuencias de machos w^+ de la descendencia fueron significativamente superiores a la esperada según la hipótesis de inviabilidad, vimos (tabla 3.4.1.1) que eran cuatro. Estas cepas fueron: buzSL-inv4s (San Luís, Argentina, con la inversión 4s fijada); buzSL-5 (San Luís, Argentina); buzDF (Deán Funes, Argentina) y buzM (Mazarrón, Murcia-España).

Los datos de las descendencias de estos cruces aparecen en las tablas 3.4.1.8 a 3.4.1.13.

La hipótesis de inviabilidad de machos w^+ en todas las líneas de un cruce dado es una hipótesis nula compuesta. Por ello, para contrastar la hipótesis, se hace necesario aplicar el contraste secuencial de Bonferroni (Material y Métodos), en los cruces con datos no agrupables, para mantener la posibilidad de error tipo I fijada en un nivel ϵ . Además, es conveniente aplicar este contraste siempre que rechazemos la hipótesis nula, sean agrupables o no los datos, para incrementar la potencia a la hora de diagnosticar más de una línea como responsable del rechazo de dicha hipótesis (Rice, 1989).

Por todo ello, en las tablas correspondientes a cruces donde se rechazó la hipótesis de inviabilidad, aparecen dos nuevas columnas, correspondientes al valor "Z" del contraste binomial respecto a la hipótesis $H_0: p_0 = 0,04$, realizado para cada línea no recombinante, y a

su correspondiente valor P (mínimo nivel de significación para el cual se rechaza la hipótesis nula).

Con la cepa buzSL-inv4s se realizaron sendas tandas de cruces en dos épocas diferentes, buzSLinv4s(1) (tabla 3.4.1.8) y buzSL-inv4s(2) (tabla 3.4.1.9). De éstas, sólo en la primera tanda se rechaza la hipótesis de inviabilidad (tabla 3.4.1.1). Por ello sólo en la tabla correspondiente a esta primera tanda (tabla 3.4.1.8) aparecen las dos nuevas columnas.

El contraste secuencial de Bonferroni mostró que, en estos cruces, sólo las líneas 1 y 3 eran significativas respecto a la hipótesis nula de inviabilidad a un nivel del 5%.

Tabla 3.4.1.8. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-inv4s (1ª tanda). La columna "Z" se refiere al valor del estadístico utilizado para el contraste binomial y la columna "P" se refiere al valor P de ese contraste. Las líneas recombinantes no se contrastan.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w	Z	P
1	40	5	0	4,08	< 0,0002
2	32	0	3	-0,81	> 0,5000
3	36	6	1	5,25	< 0,0002
4	31	0	6	-0,80	> 0,5000
5(recombinó la región XA2a-A2c)	62	44	1		
6(recombinó la región XA2a-A2c)	79	58	8		
Totales (sin incluir líneas recombinantes)	139	11	10		

Respecto a la segunda tanda de cruces con la cepa buzSL-inv4s(2) (tabla 3.4.1.9), ya se mencionó que no se observaron diferencias significativas respecto a la hipótesis nula de inviabilidad en todas las líneas (tabla 3.4.1.1). Por ello, no ha lugar al contraste secuencial de Bonferroni.

Tabla 3.4.1.9. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-inv4s (2ª tanda).

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w
1	24	0	10
2	20	1	4
3	13	1	6
4	102	3	29
5	78	5	26
6	80	0	23
7	40	1	14
8(recombinó la región XA2a-A2c)	30	8	2
9	30	1	8
10	49	0	13
Totales (sin incluir líneas recombinantes)	439	12	133

Debemos notar también que en ambas tandas de cruces con la cepa buzSL-inv4s, aunque especialmente en la 1ª tanda, se detectó un fuerte defecto de machos w .

En las tablas 3.4.1.10 y 3.4.1.11 se muestran los resultados de los cruces de hembras de inviabilidad con machos de buzSL-5 (San Luis, Argentina). Las tablas corresponden a dos tandas diferentes de cruces en dos épocas diferentes. En ambas tandas se rechazó la hipótesis nula de inviabilidad. Sin embargo, en la primera tanda los datos fueron homogéneos y por tanto agrupables, no siendo así en la segunda tanda (ver tabla 3.4.1.1). En ambos casos el contraste secuencial de Bonferroni fue inmediato, puesto que el mayor valor de P observado cumplió la desigualdad $P_k \leq \epsilon/k$, siendo k el número de líneas (Material y Métodos). Este valor máximo de P fue menor que 0,0002 tanto en la primera como en la segunda tanda de cruces, siendo $0,0002 < 0,05/11$ y $0,0002 < 0,05/5$ respectivamente. Por tanto, en ambos casos se rechazó para todas las líneas la hipótesis de inviabilidad a un nivel de significación del 5%.

Tabla 3.4.1.10. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzzSL-5 (1ª tanda). La columna "Z" se refiere al valor del estadístico utilizado para el contraste binomial y la columna "P" se refiere al valor P de ese contraste.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w	Z	P
1	53	22	25	14,70	< 0,0002
2	82	28	38	15,50	< 0,0002
3	330	112	135	30,94	< 0,0002
4	131	45	63	19,70	< 0,0002
5	48	28	31	18,34	< 0,0002
6	51	13	12	9,42	< 0,0002
7	40	16	11	12,38	< 0,0002
8	61	25	24	15,60	< 0,0002
9	35	18	29	14,20	< 0,0002
10	29	5	15	4,87	< 0,0002
11	67	12	32	7,70	< 0,0002
Totales	927	324	415		

Tabla 3.4.1.11. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzSL-5 (2ª tanda). La columna "Z" se refiere al valor del estadístico utilizado para el contraste binomial y la columna "P" se refiere al valor P de ese contraste.

Línea	Hembra w ⁺	Macho w ⁺	Macho w	Z	P
1	58	12	33	8,26	<0,0002
2	43	25	11	17,32	<0,0002
3	55	8	12	5,63	<0,0002
4	20	11	3	11,31	<0,0002
5	44	11	16	8,60	<0,0002
Totales	220	67	75		

En los cruces con la cepa buzDF (tabla 3.4.1.12), las líneas 1, 3 y 4 se rechazaron para la hipótesis de inviabilidad a un nivel de significación del 5% según el contraste de Bonferroni.

Tabla 3.4.1.12. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzDF. La columna "Z" se refiere al valor del estadístico utilizado para el contraste binomial y la columna "P" se refiere al valor P de ese contraste.

Línea	Hembra w ⁺	Macho w ⁺	Macho w	Z	P
1	33	4	18	3,58	<0,0002
2	33	2	21	1,49	0,0680
3	30	3	13	2,74	0,0031
4	62	8	31	5,26	<0,0002
5	50	0	20	-1,02	>0,5000
6	38	0	9	-0,89	>0,5000
Totales	246	17	112		

En los cruces con buzM (tabla 3.4.1.13) sólo la línea 2 se rechazó para un nivel de significación al 5% según el contraste de Bonferroni.

Tabla 3.4.1.13. Cruces de hembras de inviabilidad con machos buzM. La columna "Z" se refiere al valor del estadístico utilizado para el contraste binomial y la columna "P" se refiere al valor P de ese contraste.

Línea	Hembra w^+	Macho w^+	Macho w	Z	P
1	25	2	17	1,90	0,0290
2	44	4	14	2,96	0,0015
3	38	0	22	-0,90	> 0,50
4	22	2	12	2,09	0,0180
5	32	2	9	1,54	0,0618
6	27	0	8	-0,75	> 0,50
Totales	188	10	82		

Se compararon los promedios de frecuencia de machos w^+ entre los cruces con recuperación de la viabilidad de esos machos, notados como buzSL-5(1), buzSL-5(2), buzSL-inv4s(1), buzDF y buzM (tabla 3.4.1.1) mediante el estadístico:

$$t = \frac{(a_i - a_m)}{\left(\frac{1}{4 \cdot n_i} + s_{am}^2\right)^{1/2}} \text{ donde } a_i \text{ es el valor de la línea } i \text{ o el promedio de un grupo}$$

homogéneo de datos y n_i el tamaño muestral del mismo, en nuestro caso los cruces con buzSL-5(1); siendo a_m y s_{am}^2 la media y varianza muestral de un grupo heterogéneo de datos. Se comparó el cruce buzSL-5(1) con los cuatro restantes. En la tabla 3.4.1.14 se dan los valores de las comparaciones y su significación.

Tabla 3.4.1.14. Valores del estadístico t y su significación en las comparaciones entre los cruces con valores de p significativamente distintos de la hipótesis de inviabilidad de machos w^+ . Como se compara siempre el cruce buzSL-5(1) con los otros, la comparación aparece referida por el nombre de la cepa correspondiente al otro cruce

Comparación	t	g.l
buzSL-5(2)	0,51 ns	4
buzSL-inv4s(1)	3,42 *	3
buz-5	5,03 **	5
buz-34	6,67 **	5

ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Como se aprecia en la tabla, los promedios de los cruces con buzSL-5 (1) y (2), no fueron significativamente diferentes. Por el contrario el promedio de buzSL-5(1) sí fue significativamente distinto (superior) de los promedios de buzSL-inv4s(1), buzDF y buzM.

Como se vió aplicando el contraste de Bonferroni, tan sólo en los cruces con buzSL-5 todas las líneas analizadas mostraron una frecuencia de machos híbridos significativamente superior a la esperada por simple recombinación con el marcador *white*. Por ello, se utilizó esta cepa para estimar el número de grupos de ligamiento (cromosomas) implicados en la supresión del efecto letal de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* sobre *D. buzzatii*.

3.4.2 Estima del número de factores complementarios, supresores del efecto letal de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* en *D. buzzatii*, presentes en la cepa *D. buzzatii* SL-5.

3.4.2.1 Retrocruces hacia la cepa *D. buzzatii* SL-101.

Se trató de estimar el número de factores que suprimen el efecto letal y su modo de acción. Para ello, se realizaron dos generaciones de retrocruzamientos hacia *buzSL-101*. Se utilizaron los machos w (hermanos de los machos w^+), obtenidos en la descendencia (F_1) de los cruces de hembras de inviabilidad con machos de *buzSL-5* (tablas 3.4.1.10 y 11 en apartado 3.4.1), como progenitores en la primera generación de retrocruzamientos, y los machos w de las R1 así obtenidas como progenitores en la segunda generación (R2). En ambos casos, estos machos se cruzaron siempre con hembras de inviabilidad que, como sabemos, portan la región XA1a-B4a de *D. koepferae* introgresada en heterocigosis en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-101 (figura 3.4). En las tablas 3.4.2.1 y 3.4.2.2 se muestran los resultados de las dos generaciones de retrocruzamientos realizadas.

Tabla 3.4.2.1. Descendencia de la primera generación de retrocruzamiento hacia *D. buzzatii* SL-5, de hembras de la cepa de inviabilidad cruzadas con machos w provenientes de los cruces de hembras de inviabilidad con *D. buzzatii* SL-5. Entre paréntesis, en la columna "macho w^+ " aparecen las frecuencias relativas p de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ .

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+ (p)	Macho w
1	57	45	9 (0,14)	64
2	82	78	11 (0,12)	59
3	55	49	5 (0,08)	46
4	31	30	9 (0,23)	28
5	29	21	10 (0,26)	27

Tabla 3.4.2.1. Continuación. Descendencia de la primera generación de retrocruzamiento hacia *D. buzzatii* SL-5, de hembras de la cepa de inviabilidad cruzadas con machos *w* provenientes de los cruces de hembras de inviabilidad con *D. buzzatii* SL-5. Entre paréntesis, en la columna "macho w^+ " aparecen las frecuencias relativas p de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ .

Línea	Hembra w^+	Hembra <i>w</i>	Macho w^+ (p)	Macho <i>w</i>
6	53	42	13 (0,20)	34
7	73	59	16 (0,18)	66
8	10	15	6 (0,38)	19
9	59	68	6 (0,09)	50
Totales	449	407	85 (0,16)	393

Tabla 3.4.2.2. Descendencia de la segunda generación de retrocruzamiento hacia *D. buzzatii* SL-5, de hembras de la cepa de inviabilidad cruzadas con machos *w* provenientes de las primeras generaciones de retrocruzamientos. Entre paréntesis, en la columna "macho w^+ " aparecen las frecuencias relativas p de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ .

Línea	Hembra w^+	Hembra <i>w</i>	Macho w^+ (p)	Macho <i>w</i>
1	38	45	3 (0,07)	29
2	53	57	4 (0,07)	40
3	43	42	0 (0)	44
4	76	78	6 (0,07)	60
5	115	103	31 (0,21)	98
6	32	50	5 (0,14)	49
7	24	30	0 (0)	36
8	12	24	1 (0,08)	32
9	22	21	5 (0,19)	30

Tabla 3.4.2.2. Continuación. Descendencia de la segunda generación de retrocruzamiento hacia *D. buzzatii* SL-5, de hembras de la cepa de inviabilidad cruzadas con machos w provenientes de las primeras generaciones de retrocruzamientos. Entre paréntesis, en la columna "macho w^+ " aparecen las frecuencias relativas p de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ .

Línea	Hembra w^+	Hembra w	Macho w^+ (p)	Macho w
10	24	27	5 (0,17)	34
11	35	38	4 (0,10)	39
12	31	34	14 (0,30)	26
13	41	36	15 (0,27)	31
Totales	546	585	93 (0,145)	548

En la tabla 3.4.2.3 se presentan los valores λ de homogeneidad y de bondad de ajuste para el valor de $p_0 = 0,04$; así como los valores de los estadísticos para los datos transformados de ambas generaciones de retrocruzamientos. Es posible apreciar que en los dos casos hay diferencias significativas respecto a la hipótesis de inviabilidad. Sin embargo sólo en la R2 aparece un valor significativo de varianza genética.

Tabla 3.4.2.3. Valores λ y valores de los estadísticos para los datos transformados en las descendencias de la primera generación de retrocruzamiento (R1) y la segunda generación de retrocruzamiento (R2).

Cruce	λ_H	g.l	$\lambda_{0,04}$	a_m	H	g.l	s_{am}	$(V_B)^{1/2}$
R1	16,77 *	8	194***	0,41	15,30 ns	8	0,030	—
R2	42,7***	12	183***	0,38	52,19 ***	12	0,041	0,036

R1: Cruces cuya descendencia es la R1 o primera generación de retrocruzamientos; R2: cruces cuya descendencia es la R2 o segunda generación de retrocruzamientos; ns: $P > 0,05$; *: $0,05 > P > 0,01$; **: $0,01 > P > 0,001$; ***: $P < 0,001$.

Puesto que en ambas generaciones de retrocruzamiento se rechaza la hipótesis nula de inviabilidad, fue necesario aplicar el contraste secuencial de Bonferroni para conocer el número de líneas que estaban implicadas en el rechazo de dicha hipótesis. Para ello se realizaron, línea por línea, los contrastes binomiales para el valor de $p_0 = 0,04$ (tabla 3.4.2.5) y posteriormente se contrastaron los valores P correspondientes (ver más adelante). Como ya se ha dicho, se considera línea con inviabilidad de machos híbridos w^+ aquella en que el valor p de frecuencia relativa de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ no es significativamente distinto de 0,04.

3.4.2.2 Modelos mediante cadenas de Markov.

Como se mostró en Material y Métodos, es posible aplicar modelos de cadenas de Markov para distinguir entre una serie de hipótesis en cuanto al número n de supresores dominantes que segregan en torno a un letal. El diseño de cruces que nos permitió aplicar cómodamente las Cadenas de Markov fue el siguiente (ver figura 3.4 al comienzo del capítulo):

1. Se obtuvo una descendencia F_1 (proveniente del cruce parental $buzSL-5$ del apartado 3.4.1, es decir, hembras de inviabilidad $l/l, n(Su^-)/n(Su^-)$ con machos $buzSL-5$ $l/Y, n(Su)/n(Su)$) del tipo $l/Y, n(Su)/n(Su^-)$ (donde Y es el cromosoma Y , l es el letal y Su es el supresor del letal, el superíndice $-$ indica ausencia de, y n indica que puede haber cualquier número n de supresores).
2. Se retrocruzaron individualmente machos $w F_1$ (se seleccionaron los descendientes de cruces donde la frecuencia de sus hermanos machos w^+ fue alta) con hembras $l/l, n(Su^-)/n(Su^-)$ obteniéndose la R_1 (1ª generación de retrocruzamiento).
3. Se retrocruzaron individualmente machos $w R_1$ $l/Y, x(Su)/n(Su^-)$ (se seleccionaron los descendientes de cruces donde la frecuencia de sus hermanos machos w^+ fue alta) con hembras $l/l, n(Su^-)/n(Su^-)$, donde x indica que se desconocía el número de supresores presentes en el padre: $x \in (n,0)$.

Este diseño corresponde a los retrocruces mencionados en el anterior apartado 3.4.2.1.

El diseño de cruces expuesto nos permitirá considerar modelos de Cadenas de Markov, donde los estados posibles E_i en cada generación se refieren al número i de supresores presentes en heterozigosis (luego los supresores a detectar han de ser dominantes) en el progenitor masculino ($E_n = n$ supresores presentes en heterozigosis, $E_0 = 0$ supresores). Este número de supresores a estimar se refiere en realidad al número de cromosomas de la cepa *buzSL-5* implicado en el proceso de supresión del efecto letal de *hmi-1*, puesto que no hay recombinación en los machos. Las probabilidades de transición de un estado i a otro j venían dadas por la ecuación (1) mostrada en el apartado 2.4.3.2 de Material y Métodos que era:

$$\gamma_{ij} = \binom{i}{j} (1/2)^i \quad \text{si } i \geq j \quad (1)$$

$$\gamma_{ij} = 0 \quad \text{si } i < j$$

donde $i, j \in (n, 0)$.

E igualmente la distribución de estados $\gamma^{(t)} = (\gamma_n^{(t)}, \dots, \gamma_0^{(t)})$ en cualquier generación t era:

$$\gamma^{(t)} = \gamma^{(0)} P^t \quad (2)$$

siendo $\gamma_n^{(0)}$ la probabilidad del estado n en la generación t , $\gamma^{(0)}$ es la distribución inicial de estados y $P = (\gamma_{ij})$ es la matriz de transición.

Nos interesa analizar dos tipos de valores de frecuencias:

1. Las frecuencias m de líneas (réplicas) donde se observa recuperación de la viabilidad dentro de cada tipo de cruce (R1 y R2), esto es, frecuencia de líneas donde la frecuencia de machos w^+ es significativamente superior a 0,04.
2. Las frecuencias p de machos w^+ respecto al total de individuos w^+ dentro de cada línea con viabilidad.

Para obtener los valores esperados (m_0 y p_0) de estos dos tipos de variables m y p en función del número de supresores presentes, debemos distinguir si hay o no epistasis entre los supresores a la hora de suprimir el efecto letal.

A) Modelo no epistático.

Si no hay epistasis entre los supresores, el efecto de un supresor será independiente del fondo genético en que se halle (Hedrick, 1985). Las frecuencias m_0 de líneas (réplicas) donde habrá recuperación de la viabilidad, vendrán dadas por la suma de los valores de los vectores correspondientes a $p^{(0)}$ ó $p^{(1)}$, para la descendencia R1 ó R2 respectivamente, exceptuando el valor asociado al estado E_0 que corresponde a aquellos padres que no portaban ningún supresor.

$$m_0 = \sum_{i=1}^n \gamma_i^{(0)} = 1 - \gamma_0^{(0)} \quad (3)$$

siendo $m_0 \leq 1$ donde $\gamma_0^{(0)}$ es la probabilidad del estado 0 en la generación t .

En cuanto a p_0 , la probabilidad de que un macho no herede ningún supresor será γ_0 (probabilidad de pasar del estado i al estado 0) = $(1/2)^i$, siendo i el número de supresores independientes que porta el padre. En el caso de que $i = 0$, el 96% de los machos w^+ serán inviábiles. Luego a la hora de estudiar frecuencias de machos w^+ inviábiles debe considerarse el producto $0,96 \times \gamma_0$ Y por tanto:

$$p_0 = [1 - 0,96(1/2)^i] / [2 - 0,96(1/2)^i] \quad (4)$$

B) Modelo epistático.

En este modelo el efecto de un supresor cualquiera dependerá del fondo genético en que se halle. La epistasis en "fitness" se manifiesta en que la presencia de un supresor no es suficiente para recuperar la viabilidad, sino que es necesario el concurso de varios genes no alélicos para que los machos sean viables. De este modo, el efecto de un supresor no es independiente del fondo genético. Si suponemos que deben estar presentes n ($n > 1$) supresores para que el efecto letal sea contrarrestado, tendremos:

$$m_0 = \sum_{i=n}^N \gamma_i^{(i)} \quad (5)$$

donde $N \geq n$ es el número total de supresores, n el número necesario de supresores y $m_0 \leq 1$.

La probabilidad de que un macho no herede un número suficiente de supresores será:

$$P_{\text{inv}} = \sum_{j=0}^{n-1} \chi_j = \sum_{j=0}^{n-1} \binom{i}{j} (1/2)^i \quad (6)$$

donde $i \in (N, n)$ corresponde al número de supresores presentes en el padre, siendo $i \geq j$. Si $i \in (n-1, 0)$ entonces $P_{\text{inv}} = 1$. Nuevamente los machos w^+ inviables corresponderán a $0,96 \times P_{\text{inv}}$. Entonces:

$$p_0 = [1 - 0,96 \sum_{j=0}^{n-1} \chi_j] / [2 - 0,96 \sum_{j=0}^{n-1} \chi_j] \text{ donde } i \in (N, n) \quad (7)$$

$p_0 = 0,04$ si $i \in (n-1, 0)$ pero ya no corresponderá a una línea con viabilidad de machos w^+ .

Independientemente del modelo considerado, los valores de m observados se calculan considerando líneas con viabilidad a aquéllas

encontramos seis líneas de trece con viabilidad, lo cual implica $m = 0,46$. Estas líneas son concretamente: 5, 6, 9, 10, 12 y 13. La línea 11 (valor $P_7 = 0,023$) aunque aparece como significativa en la tabla 3.4.2.5 porque $P < 0,05$, no cumple, sin embargo, la desigualdad de Bonferroni para $\epsilon = 0,05$ según la cual:

$$P_7 \leq \epsilon / 7, \text{ que no es el caso.}$$

Los valores p observados dentro de las líneas con viabilidad oscilaron en la R1 entre 0,08 - 0,38 (entre paréntesis en tabla 3.4.2.1) y en la R2 entre 0,1 - 0,30 (entre paréntesis en tabla 3.4.2.2). En la R1 $\bar{p} = 0,19$. En la R2 este promedio fue 0,13 (pero este valor se incrementa a 0,21 si se consideran sólo a las líneas con viabilidad).

3.4.2.3.1 Análisis.

El valor $m = 1$ en la R1 (ya que en todas las líneas se observa recuperación de la viabilidad) indica que, ya sea bajo un modelo epistático o no, o bien los supresores están fijados en la cepa buzSL-5 o su número es muy grande. Esta última posibilidad se excluye al disminuir bruscamente el valor a $m = 0,46$ en la R2.

Bajo un modelo no epistático según (3):

$$m_0 = \sum_{i=1}^n \gamma_i^{(0)} = 1 - \gamma_0^{(0)} = 1$$

indica que $\gamma_0^{(0)}$ es igual a 0 en la R1. Bajo este mismo modelo en la R2:

$$m_0 = \sum_{i=1}^n \gamma_i^{(1)} = 1 - \gamma_0^{(1)} = 0,46$$

indica que $\gamma_0^{(1)}$ es igual a 0,54.

Pero bajo un modelo no epistático el valor mínimo de p_0 (frecuencia esperada de machos w^+ respecto al total de individuos w^+) será precisamente en $i = 1$, siendo según la ecuación (4) $p_0 = [1 - 0,96(1/2)] / [2 - 0,96(1/2)] = 0,34$, valor mínimo que es significativamente superior a muchos de los valores observados en líneas con viabilidad de la R1 (tabla 3.4.2.4) y la R2 (tabla 3.4.2.5).

Según se ha visto en el párrafo anterior, el modelo no epistático no puede explicar

muchos de los valores de p observados en la R1 y R2. Luego, descartamos este modelo, según el cual el efecto de un supresor es independiente del fondo genético en que se halle.

Pasaremos a considerar el caso epistático, según el cual los valores de m_0 en la R1 vienen dados por la ecuación (5)

$$m_0 = \sum_{i=n}^N \gamma_i^{(0)} = 1$$

donde $N \geq n$ es el número total de supresores y n el número necesario de los mismos. El valor 1 implica que, o bien $N \gg n$, o bien los supresores están fijados en la cepa buzSL-5. A la vista del resultado obtenido en la R2:

$$m_0 = \sum_{i=n}^N \gamma_i^{(1)} = 0,46$$

la segunda posibilidad parece más probable. Sin embargo como $n > 1$ (en caso contrario estaríamos en el modelo no epistático), si $N = n = 2$ debería ser $m_0 = \gamma_2^{(1)} = 0,25$, que difiere significativamente del observado 0,46 ($Z = 1,76$; $1gl$; $P = 0,039$) para la muestra considerada (13 líneas). Puesto que para $N = n = 3$, etc... los valores de m_0 son menores de 0,25, entonces debe ser $N > n$.

Debe asumirse, pues, un modelo epistático donde segregan N factores supresores del efecto letal que interaccionan de n en n , siendo $N > n$.

Con el diseño de cruces utilizado en ningún momento se permitió la recombinación entre supresores, de modo que $N_{\text{máx}} = n^\circ$ autosomas = 5. Obviamente, y puesto que la distribución de valores de p en la descendencia R1 recorre un rango de (0,08-0,38), la distribución inicial de estados (los estados correspondientes a los padres de la R1) era $\gamma^{(0)} \neq (1, 0, \dots, 0)$. Sin embargo, nosotros seleccionamos como progenitores para la R2, individuos donde los valores de p fueron máximos, es decir estamos forzando $\gamma^{(0)} = (1, 0, \dots, 0)$, en lo que respecta a la futura distribución de progenitores en la R2. Por otro lado, es fácil ver que, si suponemos que $\gamma^{(0)} = (1, 0, \dots, 0)$, entonces, según la ecuación (2):

$$\gamma^{(1)} = \gamma^{(0)} P = (1, 0, \dots, 0) P = (\gamma_{NN}, \gamma_{Nj}, \dots, \gamma_{N0}).$$

Y debe cumplirse que:

$$\sum_{j=0}^N \gamma_{Nj} - \sum_{j=0}^{n-1} \gamma_{Nj} = 1 - \sum_{j=0}^{n-1} \gamma_{Nj} = m_0 \quad (8)$$

donde γ_{Nj} son las probabilidades de transición del estado N al j .

Para el valor $m_0 = 0,46$ deberá cumplirse

$$\sum_{j=0}^{n-1} \gamma_{Nj} = 0,54$$

Hay cuatro casos de pares (N,n) cuyos valores m_e no presentan diferencias significativas respecto al valor observado $m = 0,46$ (tabla 3.4.2.6). Estos casos son (5,3), (4,3), (4,2) y (3,2). Respecto a los valores p , todo el rango de valores observado (tablas 3.4.2.4 y 3.4.2.5) se explica con los casos (5,3) y (4,3), aunque los otros dos casos explican todas las frecuencias excepto la línea 2 de la R1 (tabla 3.4.2.4). Hay que notar, sin embargo, que la mejor aproximación para m y p la da el caso (5,3).

El menor promedio de p observado en la R1 (0,19) respecto a la R2 (0,21) (considerando sólo las líneas con viabilidad en cada generación) se explicaría simplemente porque, por azar en la elección de progenitores para la R1, hubo una mayor frecuencia de individuos con 3 supresores (en vez de 4 ó 5) que en la elección para la R2; y ello ocurrió a pesar de que en la elección de progenitores para la R1, todos llevaron el número mínimo necesario de supresores, cosa que no ocurrió en la elección de la R2, donde sólo el 46% de los progenitores elegidos portaron, cuando menos, el número mínimo necesario de aquéllos.

Debe notarse también que debido a que, en la selección de la descendencia de la F_1 y de la R1, se utilizaron líneas donde el número de machos híbridos w^+ fue máximo, es posible suponer que en ambos casos todos los progenitores provinieran de líneas donde el padre portaba el número máximo de supresores (individuos de la F_1 para los cruces R1 e individuos de la R1 para los cruces de la R2).

Tabla 3.4.2.4. Valores de los contrastes binomiales de los datos de la R1 para distintas hipótesis nulas $p_0 = 0,04$ (no hay supresor), $p_0 = 0,14$; $p_0 = 0,22$; $p_0 = 0,25$; $p_0 = 0,34$.

Línea	$p_0 = 0,04$	$p_0 = 0,14$	$p_0 = 0,22$	$p_0 = 0,25$	$p_0 = 0,34$
1	3,99 ***	0,08 ns	1,64 ns	2,13 *	3,49 ***
2	3,85 ***	0,60 ns	2,37 *	2,93 **	4,51 ***
3	1,71 ns,*	1,26 ns	2,56 *	2,98 ***	4,17 ***
4	5,97 ***	1,55 ns	0,08 ns	0,36 ns	1,54 ns
5	6,90 ***	2,09 *	0,55 ns	0,09 ns	1,10 ns
6	6,51 ***	1,33 ns	0,45 ns	0,99 ns	2,45 *
7	6,73 ***	1,08 ns	0,91 ns	1,53 ns	3,19 **
8	6,84 ***	2,70 **	1,5 ns	1,15 ns	0,29 ns
9	2,15 *	1,10 ns	2,48 *	2,93 **	4,22 ***

ns: $P > 0,025$; *: $0,025 > P > 0,005$; **: $0,005 > P > 0,0005$; ***: $P < 0,0005$. Nota: La línea 3 es significativa * para el contraste de una cola $p_0 \leq 0,04$ donde *: $0,05 > P > 0,01$

Tabla 3.4.2.5. Valores de los contrastes binomiales de los datos de la R2 para distintas hipótesis nulas $p_0 = 0,04$ (no hay supresor); $p_0 = 0,14$; $p_0 = 0,22$; $p_0 = 0,25$; $p_0 = 0,34$.

Línea	$p_0 = 0,04$	$p_0 = 0,14$	$p_0 = 0,22$	$p_0 = 0,25$	$p_0 = 0,34$
1	1,08 ns	1,23 ns	2,27 *	2,61 **	3,61 ***
2	1,16 ns	1,52 ns	2,73 **	3,13 **	4,30 ***
3	1,34 ns	2,64 **	3,48 ***	3,78 ***	4,71 ***
4	1,53 ns	1,74 ns	3,21 **	3,69 ***	5,10 ***
5	10,69 ***	2,52 *	0,22 ns	1,05 ns	3,26 **

Tabla 3.4.2.5. Continuación. Valores de los contrastes binomiales de los datos de la R2 para distintas hipótesis nulas $p_0 = 0,04$ (no hay supresor); $p_0 = 0,14$; $p_0 = 0,22$; $p_0 = 0,25$; $p_0 = 0,34$.

Línea	$p_0 = 0,04$	$p_0 = 0,14$	$p_0 = 0,22$	$p_0 = 0,25$	$p_0 = 0,34$
6	2,95 **	0,08 ns	1,25 ns	1,61 ns	2,63 **
7	1 ns	1,98 *	2,60 **	2,83 **	3,52 ***
8	0,68 ns	0,65 ns	1,24 ns	1,44 ns	2,00 *
9	3,85 ***	0,68 ns	0,44 ns	0,78 ns	1,70 ns
10	3,64 ***	0,50 ns	0,62 ns	0,96 ns	1,90 ns
11	1,99 *	0,67 ns	1,77 ns	2,13 *	3,13 **
12	9,28 ***	3,3 **	1,47 ns	0,95 ns	0,41 ns
13	8,70 ***	2,76 **	0,86 ns	0,3 ns	1,14 ns

ns: $P > 0,025$; *: $0,025 > P > 0,005$; **: $0,005 > P > 0,0005$; ***: $P < 0,0005$.

Tabla 3.4.2.6. Valores esperados m_e y p_e para distintos casos de (N,n) . Se muestran también los resultados Z de los contrastes binomiales entre los valores esperados m_e y el observado $m = 0,46$ en la R2.

(N,n)	m_e	Z	p_e 's
(5,4)	0,19	2,50 *	0,09; 0,18
(5,3)	0,50	0,28 ns	0,14; 0,25; 0,34
(5,2)	0,81	3,20 **	0,22; 0,34; 0,41; 0,45
(4,3)	0,31	1,18 ns	0,14; 0,25
(4,2)	0,69	1,78 ns	0,22; 0,34; 0,41
(3,2)	0,50	0,28 ns	0,22; 0,34

ns: $P > 0,025$; *: $0,025 > P > 0,005$; **: $0,005 > P > 0,0005$.

3.5 ANÁLISIS MOLECULAR.

3.5.1 Hibridación in situ sobre cromosomas politénicos.

3.5.1.1 Genes *scute* y *Sex-lethal*.

Inicialmente se seleccionaron dos genes candidatos a ser el factor letal interespecífico presente en la región XA2a-A2c de *D. koepferae*. Estos genes fueron *scute* (*sc*), del complejo *Achaete-scute*, y *Sex-lethal* (*Sxl*). El motivo de esta elección fue que ambos, pero sobre todo *sc*, son genes situados cerca del telómero del cromosoma X de *D. melanogaster*, y ambos se relacionan con fenotipos mutantes sexo-específicos. *Sxl* es gen llave tanto en el proceso de la compensación de dosis como en la determinación sexual. Por su parte, *sc* es uno de los factores numeradores que participan en la señal primaria de la determinación del sexo y compensación de dosis, la razón X/A, e interviene, además, en la diferenciación del sistema nervioso periférico (Cline, 1989, 1993; Tórres y Sánchez, 1989). Por ello, decidimos realizar una hibridación in situ sobre cromosomas politénicos de *D. koepferae*, utilizando como sonda sendos clones de ADN genómico de estos genes.

El resultado de estas hibridaciones se muestra en la figura 3.5.1.1, donde es posible apreciar que *sc* hibrida en la posición B3 y *Sxl* en C1e en el cromosoma X de *D. koepferae*.

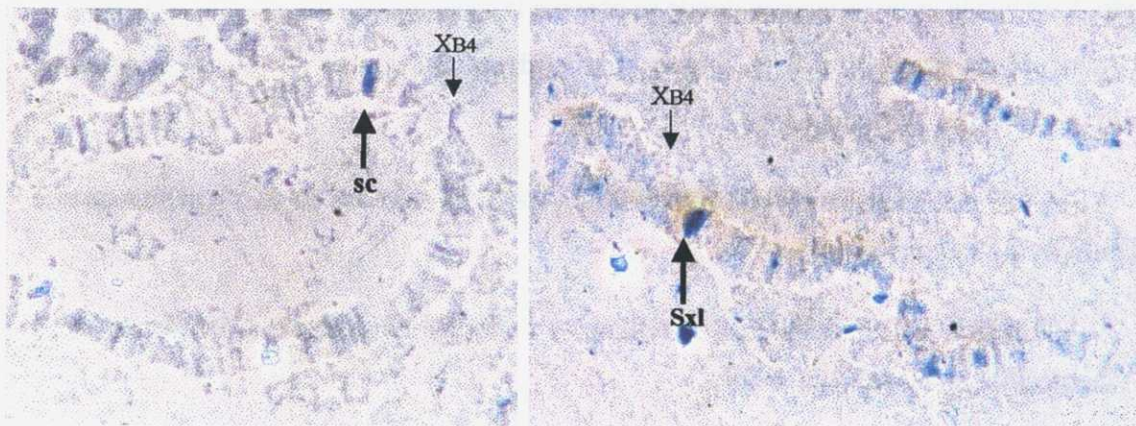


Figura 3.5.1.1: Microfotografía de la hibridación de sendos clones de los genes *sc* y *Sxl* sobre los cromosomas politénicos de *D. koepferae*.

3.5.1.2 Gen Broad-Complex.

Una vez descartados los genes *Sxl* y *sc* como candidatos a factor de inviabilidad interespecífica, nos centramos en otro tipo de genes, como son los genes de respuesta a ecdisona y concretamente el complejo *BR-C*, el cual se mostró como un candidato con muchas posibilidades de ser el responsable o cuando menos estar implicado directamente en la inviabilidad híbrida bajo estudio (ver discusión 4.1.7.2.2).

BR-C se localiza en la región 2B5 del cromosoma X de *D. melanogaster* (Dibello *et al.*, 1991). En otras especies como *D. hydei*, *D. repleta* y *D. virilis*, filogenéticamente próximas a *D. buzzatii* y *D. koepferae*, *BR-C* se localizó por hibridación *in situ* en el extremo distal del cromosoma X (Kokoza *et al.*, 1992). Concretamente en las tres especies arriba citadas, *BR-C* se localiza en el telómero, apareciendo señales secundarias en una vasta zona que se extiende, cuando menos, a lo largo de 5-6 bandas en dirección al centrómero.

Por estos motivos, se decidió tratar de hibridar un clon de *BR-C* sobre los cromosomas politénicos de *D. koepferae*. Para la hibridación *in situ* se utilizó una sonda de ADNc de *D. melanogaster* de la región "core" de *BR-C*. Esta hibridación resultó ser muy difícil, posiblemente debido a la compleja naturaleza genética de *BR-C* (ver discusión 4.1.7.2.2) y a que la sonda era heteróloga. Finalmente, se logró la hibridación en dos únicos núcleos y en una sola preparación de un total de siete hibridadas. Previamente y en otra hibridación se había obtenido señal en un solo núcleo en la banda XA2a pero se descartó el resultado. Esta banda es precisamente donde se observa la señal más fuerte en los dos núcleos mencionados. En la figura 3.5.1.2 se aprecia la señal de hibridación en la zona que va del telómero (XA1a) hasta la banda XA2a.

A pesar de la peculiaridad de la hibridación (señal en sólo dos núcleos), pensamos que el resultado es válido porque:

1. Las preparaciones estaban muy limpias en todos los núcleos, no habiendo señal inespecífica en ninguna de ellas.
2. La región del cromosoma X donde se esperaba la hibridación (el telómero) y que es donde parece haber hibridado, es una zona muy poco refringente donde nunca se

observó señal inespecífica a lo largo de todas las hibridaciones por nosotros realizadas con este u otros genes.

Los motivos que pueden haber causado que sólo se observe señal en dos cromosomas deben relacionarse con los problemas antes mencionados respecto a la hibridación de *BR-C*.

Por otro lado no es raro el fenómeno de cierta irrepetibilidad asociada a las hibridaciones *in situ*. Esta irrepetibilidad puede estar asociada a los efectos de la fijación ácida de los cromosomas politénicos: es precisa una adecuada fijación para eliminar las proteínas asociadas al DNA; cuando no se consigue, la hibridación no se produce; un caso extremo es el del ligamiento de los anticuerpos anti-Z-DNA a los politénicos, que sólo se produce cuando éstos han sido fijados en ácido (acético 45%), que altera drásticamente la organización de la cromatina (desaparece la organización nucleosómica) (Hill & Whytock, 1993). En nuestro caso, si bien con sonda de ADN en vez de anticuerpos, es posible que sólo en un estadio muy concreto del desarrollo ocurra adecuadamente la fijación de los politénicos que permita el acceso de la sonda a la región de *BR-C*.

La mencionada señal de hibridación abarca la región XA1a-A1f del telómero (figura 3.5.1.2), apareciendo también señal en las bandas adyacentes XA2a y XA2e de manera análoga a lo que ocurría en *D. hydei*, *D. repleta* y *D. virilis* (Kokoza *et al.*, 1992).

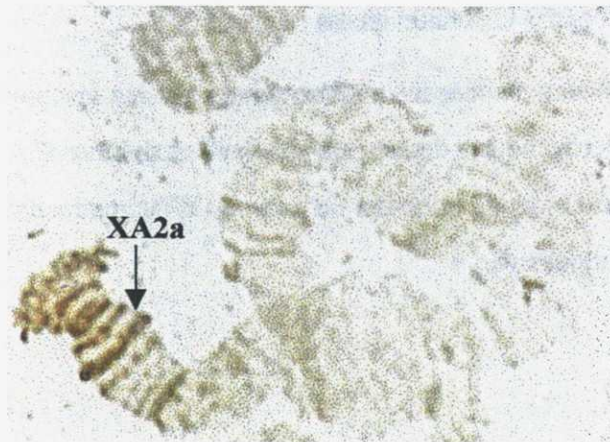


Figura 3.5.1.2: Microfotografía de la hibridación de un clon del gen *BR-C* sobre los cromosomas politénicos de *D. koepferae*.

3.5.2 Intento de rescate del gen *Broad-Complex* de la microgenoteca de la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

Como vimos en el apartado 3.1.3, el análisis de los machos híbridos inviables muestra que los fenotipos de inviabilidad pupal coinciden con fenotipos mutantes de *BR-C*. Esto, junto al resultado de la hibridación in situ y otros motivos que se discuten más adelante (apartado 4.1.8.1 de la Discusión), justifican el intento de rescate de este gen de la microgenoteca de la región que contiene al factor de inviabilidad interespecífica. Si el rescate tenía éxito, confirmaríamos que *BR-C* está contenido en esta región, convirtiéndose en un serio candidato a ser el factor de inviabilidad, con el interés añadido de que tendríamos ya aislado un clon conoespecífico de *BR-C*.

La microgenoteca utilizada consta de 1052 clones de ADN genómico con un tamaño promedio de 3-7 kb y fue obtenida durante una estancia de un mes en el laboratorio de biología molecular del profesor Dr. J. E. Edstrom de la universidad de Lund (Suecia).

Tras realizarse una hibridación sobre membranas de nylon con la microgenoteca transferida utilizando como sonda un ADNc de 1,6 kb de la región del core de *BR-C* marcado con P^{32} y un control con sonda de *Sxl* se obtuvieron varios positivos que efectivamente parecían confirmar que *BR-C* se hallaba contenido en esa región.

Se realizó una nueva hibridación sobre membranas de nylon a las que se transfirieron sólo los clones positivos de la microgenoteca detectados en el primer intento. Como sonda se utilizó de nuevo un ADNc de 1,6 kb de la región del core de *BR-C* marcado con P^{32} . No se obtuvo sin embargo ninguna señal positiva.

3.5.3 Rescate de diferentes clones conteniendo insertos de ADN de genes que se expresan en la región XA2a-A2c de *D. koepferae* durante el estadio de pupa.

Se realizó una nueva hibridación sobre la microgenoteca. Pero, esta vez, se utilizó como sonda el ADNc total de *D. buzzatii* obtenido a partir del ARNm total presente en el estadio de pupa temprana (el ARNm fue obtenido por Manuel Gandarela en el laboratorio de genética de la Universidad de Santiago de Compostela).

El objetivo de realizar esta experiencia es que el factor responsable de la inviabilidad en los machos híbridos probablemente se exprese en momentos próximos a los que ocurre la inviabilidad. De ser así, el gen candidato debiera hallarse entre los clones positivos detectados en esta hibridación.

Se obtuvieron 18 positivos pero ninguna de las señales obtenidas se corresponde a las anteriormente obtenidas con *BR-C*.

3.6 LA INVIABILIDAD VERSUS LA ESTERILIDAD EN HÍBRIDOS DE *DROSOPHILA*.

En *Drosophila* es muy superior el número de casos de esterilidad que cumplen la regla de Haldane al número de casos de inviabilidad (199 vs 14 en Bock, 1984). Sin embargo estas diferencias no se mantienen si comparamos pares de especies con esterilidad o inviabilidad afectando a ambos sexos (84 casos de esterilidad frente a 105 de inviabilidad en ambos sexos). El tiempo de divergencia promedio de las especies que dan lugar a híbridos inviábiles es aproximadamente igual al de las especies que producen híbridos estériles. En esto se basaron Coyne y Orr (Coyne & Orr, 1989) para argumentar que las tasas de evolución de esterilidad e inviabilidad han de ser similares. Wu (1992) criticó esta conclusión al demostrar que, incluso para tasas de evolución de esterilidad considerablemente superiores a las de inviabilidad, no es de esperar una diferencia apreciable en el tiempo promedio de divergencia de las especies que muestran una u otra barrera de aislamiento (tabla 1 en Wu, 1992). Más revelador resulta el análisis de la frecuencia relativa de esterilidad respecto a inviabilidad, R_e , a partir del cual Wu se limitó a observar que si las tasas intrínsecas de evolución de ambas barreras fueran las mismas ($k = 1$), el número observado de casos de inviabilidad debería ser mayor que el de esterilidad (porque la inviabilidad oculta la esterilidad), como así ocurre si consideramos los pares de especies de *Drosophila* con esterilidad o inviabilidad afectando a ambos sexos. Puesto que, considerando todas las categorías en conjunto (esterilidad o inviabilidad en uno o dos sexos) (tablas 3.6.2 y .3), o bien considerando sólo aquellos cruces donde tiene lugar la regla de Haldane (tabla 3.6.4), ocurre precisamente lo contrario, parece verosímil la hipótesis de una mayor tasa de evolución intrínseca de la esterilidad versus la inviabilidad en machos híbridos de *Drosophila*.

Un análisis más profundo del planteamiento hecho por Wu, nos permitió concluir, a partir de los datos existentes sobre *Drosophila* (tabla 3.6.1), que la tasa de esterilidad es 15-20 veces superior a la de inviabilidad. Para ello se consideraron las probabilidades P_i y P_e :

$$P_i = \text{n}^\circ \text{ de casos de inviabilidad} / \text{n}^\circ \text{ casos totales} =$$

$$= \frac{\int_0^T N(1 - e^{-\alpha t}) dt}{N} = 1 - [(1 - e^{-\alpha T}) / \alpha T] \quad (3.6.1)$$

P_e = nº de casos de esterilidad (pero con viabilidad) / nº casos totales =

$$= \frac{\int_0^T N e^{-\alpha t} (1 - e^{-k\alpha t}) dt}{N} = (1 - P_i) - [(1 - e^{-(1+k)\alpha T}) / (1+k) \alpha T] \quad (3.6.2)$$

donde se asume que tanto la evolución de la inviabilidad como de esterilidad siguen una distribución exponencial negativa con unas tasas constantes α y $k\alpha$, respectivamente (k es la razón entre las tasas de esterilidad e inviabilidad). Se asume, además, que la distribución de los tiempos de divergencia correspondientes a las N hibridaciones es uniforme (Wu, 1992). αT es el límite superior del intervalo de tiempo de divergencia.

Entonces, P_i y P_e corresponden a la probabilidades de aparición de inviabilidad y esterilidad, respectivamente, entre un par de especies a lo largo del tiempo de divergencia αT .

Siendo

$$R_c = P_e / P_i$$

Utilizando los datos publicados sobre cruces interespecíficos en *Drosophila* se obtuvieron estimas de P_i , P_e y R_c mediante la frecuencia relativa de cruces entre especies de *Drosophila* que dan lugar a híbridos estériles o inviábiles (tabla 3.6.1). Sin embargo, el aislamiento reproductivo entre distintos pares de especies puede no ser evolutivamente independiente debido a su posible relación filogenética. Para solucionar este problema, se realizaron correcciones basadas en las filogenias proteicas de los distintos grupos de especies estudiadas, utilizando un procedimiento análogo al empleado por Coyne y Orr (1989a). El método permite una única comparación entre especies situadas a ambos lados de una bifurcación filogenética. A tal fin se promediaron todos los cruzamientos entre pares de especies que abarquen un nodo o punto de bifurcación filogenética. Por ejemplo, en el caso del nodo *laticola* versus *montana* (figura 3.6.1), disponemos de los siguientes datos:

laticola × *montana* (D = 0,18): híbridos fértiles en ambos sentidos.

laticola × *borealis* (D = 0,34): estériles en ambos sentidos.

flavomontana × *montana* (D = 0,29): fértiles en un sentido, estériles en el otro.

Los datos de estas tres hibridaciones se refunden entonces en uno solo que aportará 0,50 estériles y 0,50 fértiles al recuento total de las distintas categorías de híbridos, con una distancia de Nei asociada de 0,28.

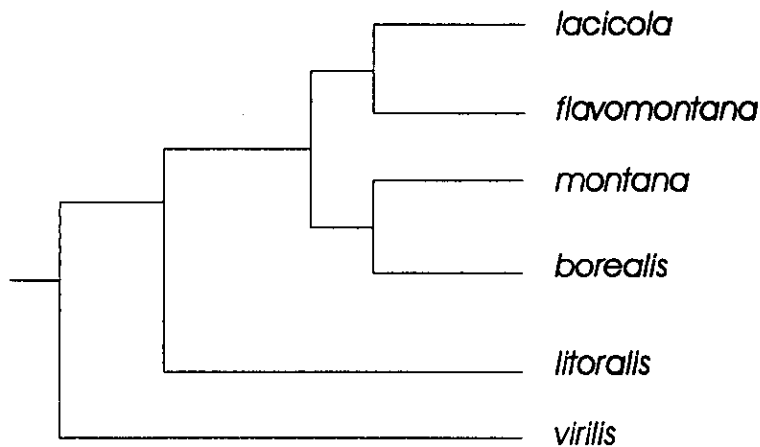


Figura 3.6.1: Árbol filogenético basado en el método UPGMA de una cuantas especies del grupo *virilis*, se observa que hay cuatro posibles cruzamientos entre pares de especies del nodo *lacicola* versus *montana*, si bien sólo se dispone de datos sobre tres de ellos (vease texto).

Fue posible, con los valores estimados de P_i y P_e , calcular k y αT (tablas 3.6.2 y 3.6.3) a partir de las ecuaciones 3.6.1 y 3.6.2, mediante procesos de iteración (programa de cálculo Eureka). Los valores de k obtenidos oscilaron entre 10-20. Sin embargo, cuanto mayor sea la distancia filogenética entre las especies comparadas, más probable es que aparezca inviabilidad que oculte la esterilidad y menos uniforme será la distribución de los tiempos de divergencia correspondientes a los eventos de aislamiento. Luego para mantener uniforme esta distribución sería necesario utilizar mayores tamaños muestrales cuanto mayor sea la distancia filogenética entre especies. Esta necesidad se ve incrementada aún más porque a mayores tiempos de divergencia, más extremos serán los valores de P_i y P_e , y mayor deberá ser la muestra para que NP_e pueda aportar información significativa para estimar la tasa relativa de esterilidad e inviabilidad.

En consecuencia, y puesto que el tamaño muestral está fijado a priori en función de los datos existentes en la bibliografía, parece conveniente reducir el tiempo de divergencia de las especies consideradas para que así sea más factible asumir la uniformidad mencionada. Por

ello, y dado que la relación entre el tiempo de divergencia T y la distancia D se va alejando de la linealidad a medida que aumenta el valor de D , se elige, de forma arbitraria, la categoría $D < 0,5$ (tablas 3.6.2 y 3.6.3).

Otro argumento a tener en cuenta, que favorece la elección de especies con menor tiempo de divergencia, es que el valor R_c arriba definido se aproxima bastante bien a la tasa intrínseca k para valores $P_i \leq 0,1$ pero no así en el caso contrario (tabla 1 Wu, 1992). Puesto que a mayor tiempo de divergencia, P_i será mayor, ello redundará en el interés de considerar especies con menor tiempo de divergencia.

El valor de k obtenido con las estimas echas a partir de los datos con $D \leq 0,5$ osciló entre 16-20 según se corrigieran filogenéticamente o no los datos (tablas 3.6.2 y .3).

Otro modo de reducir el tiempo de divergencia entre las especies consideradas consistió en utilizar los datos de cruces entre pares de especies que siguen la regla de Haldane (tabla 3.6.4). La estima de k obtenida con estos datos (sin corregir) fue $k = 21$.

Por lo tanto diremos que, asumiendo una distribución uniforme de los tiempos de divergencia correspondientes a los eventos de aislamiento y una distribución exponencial negativa para la ocurrencia de esterilidad o inviabilidad, la tasa de evolución de esterilidad parece ser entre 15-20 veces superior a la de inviabilidad.

Como vimos, la estima del verdadero valor de la tasa intrínseca k es función del tamaño de la muestra y de la distancia filogenética entre los pares de especies consideradas. Para disminuir el posible error cometido en la estimación de k , se consideraron menores distancias filogenéticas, sensu D . Además, se calculó el error asociado al tamaño de muestra en cada caso, en la estima de P_e , P_i y R_c (tablas 3.6.2 y 3.6.3).

Tabla 3.6.1. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
Grupo <i>obscura</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>subobscura</i> x <i>madeirensis</i>	ff	<0,5	f	3,4
<i>athabasca</i> EA x <i>athabasca</i> EB	ff	0,02	f	1
<i>athabasca</i> WN x <i>athabasca</i> EA/EB	ff	0,12	f	1
<i>athabasca</i> x <i>algonquin</i>	e	0,65	e	1,5
<i>athabasca</i> x <i>affinis</i>	e	0,74	e	1,5
<i>bifasciata</i> x <i>imaii</i>	e,e	0,56	e	1,5
<i>azteca</i> x <i>tolteca</i>	f,e	1,10	0,5f-0,5e	1,5
<i>pseudoobscura</i> USA x <i>bogotana</i>	f,e	0,19	0,5f-0,5e	1,11
<i>pseudoobscura</i> x <i>persimilis</i>	e,e	0,41	e	1,5
<i>pseudoobscura</i> x <i>loweii</i>	e	1,05	e	1,5
Comparaciones nodo <i>affinis</i> vs <i>narragansett</i> (A):		1,16	0,75e-0,25i	
<i>affinis</i> x <i>narragansett</i>	i	0,97		1,5
<i>athabasca</i> x <i>azteca</i>	e,e	1,25		1,5
<i>athabasca</i> x <i>tolteca</i>	e	1,25		1,5
Comparaciones nodo <i>miranda</i> vs <i>pseudoobscura</i> (B):		0,56	e	
<i>miranda</i> x <i>persimilis</i>	e,e	0,56		1,5
<i>miranda</i> x <i>pseudoobscura</i>	e,e	0,56		1,5

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
Comparaciones nodo <i>obscura</i> vs A y B:		1,71	0,25e-0,75i	
<i>persimilis</i> x <i>tristis</i>	i	>0,5		5,11
<i>pseudoobscura</i> x <i>tristis</i>	i	>0,5		5,11
<i>ambigua</i> x <i>miranda</i>	i	>0,5		5,11
<i>ambigua</i> x <i>persimilis</i>	i,e	1,66		1,5
<i>ambigua</i> x <i>pseudoobscura</i>	i	1,66		1,5
<i>bifasciata</i> x <i>persimilis</i>	i	1,81		1,5
Grupo <i>melanogaster</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>ananassae</i> x <i>pallidosa</i>	ff	0,09	f	1,5
<i>malerkotliana</i> x <i>bipectinata</i>	e,e	0,10	e	1,5
<i>simulans</i> x <i>sechellia</i>	e,e	0,28	e	12,13
<i>kikkawai</i> x <i>leontia</i>	e,e	0,42	e	1,5
Comparaciones nodo <i>mauritiana</i> vs <i>simulans</i> (A):		0,31	0,75e-0,25i	
<i>mauritiana</i> x <i>simulans</i>	e,i	0,30		12,13
<i>mauritiana</i> x <i>sechellia</i>	e,e	0,32		12,13
Comparaciones nodo <i>melanogaster</i> vs A (B):		0,56	0,5e-0,5i	
<i>melanogaster</i> x <i>sechellia</i>	e,i	0,62		12,13
<i>melanogaster</i> x <i>simulans</i>	e,i	0,55		1,5
<i>melanogaster</i> x <i>mauritiana</i>	e,i	0,50		1,5
Comparaciones nodo <i>erecta</i> vs B:		1,23	i	
<i>mauritiana</i> x <i>erecta</i>	i	1,57		5,13
<i>mauritiana</i> x <i>yakuba</i>	i	0,88		5,13

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
<i>mauritiana</i> x <i>teissieri</i>	i	1,24		5,13
Comparaciones nodo <i>malerkotliana</i> vs <i>parabipectinata</i> (C):		0,19	e	
<i>malerkotliana</i> x <i>parabipectinata</i>	e,e	0,23		1,5
<i>bipectinata</i> x <i>parabipectinata</i>	e,e	0,15		1,5
Comparaciones nodo <i>pseudoananassae</i> vs C (D):		0,31	0,67e-0,33i	
<i>malerkotliana</i> x <i>pseudoananassae</i>	i,i	0,28		1,5
<i>parabipectinata</i> x <i>pseudoananassae</i>	e,e	0,37		1,5
<i>bipectinata</i> x <i>pseudoananassae</i>	e,e	0,27		1,5
Grupo <i>willistoni</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>willistoni</i> x <i>quechua</i>	f,e	0,21	0,5f-0,5e	1,10
<i>equinoxialis caribbensis</i> x <i>e. equinoxialis</i>	e,e	0,24	e	1,10
<i>paulistorum</i> Orinocan x <i>p. Interior</i>	e,e	0,07	e	1,10
<i>p. Centroamerican</i> x <i>p. Transitional</i>	f,f	0,04	f	1,10
<i>paulistorum</i> x <i>pavlovskiana</i>	e,e	0,23	e	1,10
Comparaciones nodo <i>p. Transitional</i> vs <i>p. Andean-Brazilian</i> (A):		0,07	0,5f-0,5e	
<i>p. Andean-Brazilian</i> x <i>p. Centroamerican</i> e,e		0,07		1,10
<i>p. Andean-Brazilian</i> x <i>p. Transitional</i>	f,f	0,07		1,10
Comparaciones nodo <i>p. Orinocan</i> vs A:		0,16	e	
<i>p. Orinocan</i> x <i>p. Centroamerican</i>	e,e	0,21		1,10
<i>p. Orinocan</i> x <i>p. Transitional</i>	e,e	0,20		1,10
<i>p. Orinocan</i> x <i>p. Andean-Brazilian</i>	e,e	0,16		1,10
<i>p. Interior</i> x <i>p. Centroamerican</i>	e,e	0,13		1,10
<i>p. Interior</i> x <i>p. Transitional</i>	e,e	0,15		1,10
<i>p. Interior</i> x <i>p. Andean-Brazilian</i>	e	0,13		1,10

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
Comparaciones nodo Amazonian vs A:		0,16	e	
<i>p. Amazonian</i> x <i>p. Andean-Brazilian</i>	e,e	0,17		1,10
<i>p. Amazonian</i> x <i>p. Centroamerican</i>	e,e	0,15		1,10
Comparaciones nodo <i>insularis</i> vs <i>willistoni</i>		1,08	0,5e-0,5i	
<i>insularis</i> x <i>e. equinoxialis</i>	i	1,09		1,10
<i>insularis</i> x <i>p. Transitional</i>	i	1,27		1,10
<i>insularis</i> x <i>willistoni</i>	e	1,07		1,10
<i>insularis</i> x <i>tropicalis</i>	e	0,88		1,10
Grupo Hawaii				
Comparaciones independientes:				
<i>heteroneura</i> x <i>silvestris</i>	f,f	0,03	f	1,5
Comparaciones nodo <i>planitibia</i> vs <i>heteroneura</i> :		0,16	e	
<i>planitibia</i> x <i>silvestris</i>	e,e	0,19		1,5
<i>planitibia</i> x <i>heteroneura</i>	e,e	0,13		1,5
Grupo <i>mesophragmatica</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>gaucha</i> x <i>pavani</i>	e,e	0,46	e	1,5
<i>mesophragmatica</i> x <i>pavani</i>	i,i	0,99	i	1,5
Grupo <i>virilis</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>texana</i> x <i>americana</i>	f,f	0,01	f	1,14
<i>lunnei</i> x <i>virilis</i>	f,f	0,35	f	1,14
<i>lacicola</i> x <i>flavomontana</i>	e	0,18	e	1,14
<i>montana</i> x <i>borealis</i>	f,e	0,21	0,5f-0,5e	1,14

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
Comparaciones nodo <i>laticola</i> vs <i>montana</i> (A):		0,28	0,5f-0,5e	
<i>laticola</i> x <i>montana</i>	f,f	0,21		1,14
<i>laticola</i> x <i>borealis</i>	e,e	0,34		1,14
<i>flavomontana</i> x <i>montana</i>	f,e	0,29		1,14
Comparaciones nodo <i>littoralis</i> vs A (B):		0,66	e	
<i>littoralis</i> x <i>montana</i>	e,e	0,66		1,14
<i>littoralis</i> x <i>laticola</i>	e,e	0,66		1,14
Comparaciones nodo <i>novamexicana</i> vs <i>texana</i> (C):		0,43	f	
<i>novamexicana</i> x <i>americana</i>	f,f	0,43		1,14
<i>novamexicana</i> x <i>texana</i>	f,f	0,44		1,14
Comparaciones nodo <i>virilis</i> vs C (D):		0,56	0,78f-0,22e	
<i>virilis</i> x <i>novamexicana</i>	f,f	0,49		1,14
<i>virilis</i> x <i>americana</i>	f,f	0,54		1,14
<i>virilis</i> x <i>texana</i>	f,f	0,58		1,14
<i>lummei</i> x <i>americana</i>	f	0,54		1,14
<i>lummei</i> x <i>texana</i>	e,e	0,64		1,14
Comparaciones nodo B vs D:		1,28	0,16f-0,84e	
<i>americana</i> x <i>laticola</i>	e	1,42		1,14
<i>americana</i> x <i>montana</i>	e,e	1,48		1,14
<i>texana</i> x <i>laticola</i>	e,e	1,45		1,14
<i>texana</i> x <i>montana</i>	e,e	1,51		1,14
<i>novamexicana</i> x <i>montana</i>	e,e	1,22		1,14
<i>novamexicana</i> x <i>laticola</i>	e	1,20		1,14
<i>virilis</i> x <i>laticola</i>	e	1,17		1,14

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
<i>virilis</i> x <i>flavomontana</i>	e,e	1,28		1,14
<i>virilis</i> x <i>montana</i>	f,e	1,23		1,14
<i>virilis</i> x <i>borealis</i>	e,e	1,06		1,14
<i>virilis</i> x <i>littoralis</i>	f,f	1,06		1,14
Grupo <i>repleta</i>				
Comparaciones independientes:				
<i>mulleri</i> x <i>aldrichi</i>	e	0,12	e	1,5
<i>mulleri</i> x <i>wheeleri</i>	e,e	<0,5	e	3,5
<i>mulleri</i> x <i>buzzatii</i>	i	>0,5	i	3,5
<i>starmeri</i> Occidente x s. Oriente	f,e	0,15	0,5f-0,5e	7,8
<i>koepferae</i> Argentina x k. Bolivia	f,f	0,13	f	6
<i>borborema</i> x <i>koepferae</i>	e,e	0,59	e	7,9
<i>arizonensis</i> x <i>mojavensis</i>	f,e	0,21	0,5f-0,5e	1,5
Comparaciones nodo <i>buzzatii</i> vs <i>koepferae</i> (A):		0,70	e	
<i>buzzatii</i> x <i>koepferae</i>	e	0,65		7,9
<i>buzzatii</i> x <i>borborema</i>	e	0,75		7,9
Comparaciones nodo <i>serido</i> vs A (B):		0,84	0,75e-0,25i	
<i>serido</i> x <i>borborema</i>	i	0,89		7,9
<i>serido</i> x <i>buzzatii</i>	e	0,83		7,9
<i>serido</i> x <i>koepferae</i>	e,e	0,81		7,9
Comparaciones nodo <i>venezolana</i> vs <i>starmeri</i> (C):		0,45	0,5f-0,25e-0,25i	
<i>venezolana</i> x s. Occidente	f,f	0,41		7,8
<i>venezolana</i> x s. Oriente	e,i	0,48		7,8

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos Ref.
Comparaciones nodo <i>stalkeri</i> vs C (D):		0,76	e
<i>stalkeri</i> x <i>venezolana</i>	e	0,79	7,9
<i>stalkeri</i> x <i>starmeri</i>	e	0,72	7,9
Comparaciones nodo <i>richardsoni</i> vs D (E):		1,10	e
<i>richardsoni</i> x <i>venezolana</i>	e	1,09	7,9
<i>richardsoni</i> x <i>starmeri</i>	e	1,07	7,9
<i>richardsoni</i> x <i>martensis</i>	e	1,12	7,9
Comparaciones nodo B vs E:		1,61	0,95e-0,05i
<i>borborema</i> x <i>stalkeri</i>	e	1,60	7,9
<i>borborema</i> x <i>richardsoni</i>	e	1,32	7,9
<i>borborema</i> x <i>starmeri</i>	e	1,89	7,9
<i>borborema</i> x <i>venezolana</i>	e	1,81	7,9
<i>koepferae</i> x <i>stalkeri</i>	e		7,9
<i>koepferae</i> x <i>richardsoni</i>	e,e		7,9
<i>koepferae</i> x <i>martensis</i>	e	1,60	7,9
<i>koepferae</i> x <i>uniseta</i>	e	1,53	7,9
<i>koepferae</i> x <i>starmeri</i>	e,e	1,45	7,9
<i>koepferae</i> x <i>venezolana</i>	e,e	1,77	7,9
<i>buzzatii</i> x <i>stalkeri</i>	i	1,21	7,9
<i>buzzatii</i> x <i>richardsoni</i>	e,e	1,61	7,9
<i>buzzatii</i> x <i>venezolana</i>	e	2,02	7,9
<i>serido</i> x <i>richardsonii</i>	e		7,9
<i>serido</i> x <i>starmeri</i>	e,e	1,45	7,9

Tabla 3.6.1. Continuación. Cruces interespecíficos en *Drosophila*. Se muestran los pares de especies que dejan descendencia inviable (i), fértil (f) o estéril (e). Cuando procede se consideran ambos cruces recíprocos de un par de especies, en este caso el resultado de cada cruce aparece separado por una coma (f,f). La corrección filogenética se hace promediando todos los valores dentro de un nodo, de modo que a éste queda asociado un sólo valor.

Especies	Híbridos	D(Nei)	Valores corregidos	Ref.
<i>serido</i> x <i>venezolana</i>	e	1,70		7,9
Comparaciones nodo <i>mojavensis</i> vs <i>aldrichi</i> :		0,29	0,5e-0,5i	
<i>aldrichi</i> x <i>arizonensis</i>	i	0,29		1,5
<i>aldrichi</i> x <i>mojavensis</i>	i	0,33		1,5
<i>mulleri</i> x <i>arizonensis</i>	e	0,23		1,5
<i>mulleri</i> x <i>mojavensis</i>	e	0,32		1,5
Comparaciones nodo <i>mojavensis</i> vs "Navojoa":		<0,5	0,5f-0,5i	
Navojoa x <i>mojavensis</i>	i	<0,5		3,5
Navojoa x <i>arizonensis</i>	f	<0,5		3,5

Ref: 1-Coyne & Orr,1989a. 2-Wu,1992. 3-Russo *et al.*,1995. 4-Khadem & Krimbas,1993. 5-Bock,1984. 6-Fontdevila *et al.*,1988. 7-Sánchez,1986. 8-Ruiz & Fontdevila,1981. 9-Marín *et al.*,1993. 10-Ehrman & Powell,1982. 11-Lakovaara & Saura,1982. 12-Lachaise *et al.*,1986. 13-Cariou,1987. 14-Throckmorton,1982.

Tabla 3.6.2. Valores de k y αT a partir de las estimas de P_e , P_i y R_c , de todos los cruces interespecíficos revisados de *Drosophila*, considerados en ambos sentidos y sin corrección para dependencia filogenética. Se dan también las desviaciones estándar de las estimas P_e , P_i y R_c .

Tipo de cruce	Híbridos				$P_e \pm \sigma_{P_e}$	$P_i \pm \sigma_{P_i}$	$R_c \pm \sigma_{R_c}$	k	R_c/k	αT
	Fértiles	Estériles	Inviabiles	Totales						
Todos	45	135	27	207	$0,65 \pm 0,033$	$0,13 \pm 0,023$	$5 \pm 0,254$	14,9	0,33	0,286
$D \leq 0,5$	36	61	8	105	$0,58 \pm 0,048$	$0,08 \pm 0,026$	$7,6 \pm 0,63$	16	0,47	0,161
$D \geq 0,5$	9	74	19	102	$0,72 \pm 0,044$	$0,19 \pm 0,039$	$3,9 \pm 0,24$	10,6	0,37	0,286

Resultados

Tabla 3.6.3. Valores de k y αT a partir de las estimas de P_e , P_i y R_c , de todos los cruces interespecíficos revisados de *Drosophila*, con corrección para independencia filogenética. Se dan también las desviaciones estándar de las estimas P_e , P_i y R_c .

Clase de cruce	Híbridos				$P_e \pm \sigma_{P_e}$	$P_i \pm \sigma_{P_i}$	$R_c \pm \sigma_{R_c}$	k	R_c/k	αT
	Fértiles	Estériles	Inviabiles	Totales						
Todos	16	36	7	59	$0,61 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,04$	$5,1 \pm 0,535$	12,9	0,39	0,258
$D \leq 0,5$	14	21	2	37	$0,57 \pm 0,078$	$0,05 \pm 0,037$	$10,5 \pm 1,52$	20,4	0,51	0,112
$D \geq 0,5$	2	15	5	22	$0,68 \pm 0,099$	$0,23 \pm 0,089$	$3 \pm 0,44$	11,1	0,27	0,258

Las desviaciones σ_{P_e} y σ_{P_i} son $(P_e Q_e/n)^{1/2}$ y $(P_i Q_i/n)^{1/2}$ respectivamente. El cálculo de la desviación típica en la estima de R_c se hizo según la ecuación 2.4.4.4 (Material y Métodos). Siendo $\sigma_{R_c} = (\sigma_{R_c}^2)^{1/2}$.

En las tablas 3.6.2, 3.6.3 y 3.6.4 se observa que, ciertamente, el valor de R_c se aproxima más a k en función de un menor tiempo de divergencia entre las especies (Wu, 1992). Esto se aprecia observando el valor de la razón R_c/k mostrado en las tablas, que es siempre más próximo a 1 en el caso $D \leq 0,5$ en las tablas 3.6.2 y 3.6.3. El mayor valor de esta razón (la mejor aproximación a k) es el que aparece en la tabla 3.6.4, como era de esperar, puesto que en ella aparecen las estimas que conciernen a los cruces que cumplen la regla de Haldane, los cuales corresponden a especies con menor tiempo de divergencia (sensu D) que aquéllos en que la esterilidad o inviabilidad afecta a ambos sexos (Coyne & Orr, 1989b). Esta mejor aproximación de R_c a k en los cruces entre especies con menor tiempo de divergencia, se aprecia también fijándose en el valor de αT .

Tabla 3.6.4. Valores de k y αT a partir de las estimas de P_e , P_i y R_c , de los cruces interespecíficos de *Drosophila* con inviabilidad o esterilidad específica del sexo heterogamético (regla de Haldane). Se dan también las desviaciones estándar de las estimas P_e , P_i y R_c . Los datos no se corrigen para independencia filogenética.

Clase de cruce	Híbridos				$P_e \pm \sigma_{P_e}$	$P_i \pm \sigma_{P_i}$	$R_c \pm \sigma_{R_c}$	k	R_c/k	αT
	Fértiles	Estériles	Inviabiles	Totales						
R. de Haldane	272	199	14	485	$0,41 \pm 0,022$	$0,03 \pm 0,008$	$14,2 \pm 0,77$	20,9	0,68	0,059

En la figura 3.6.2 se muestra la relación entre R_c y αT para diferentes valores de k según se desprende de las ecuaciones 3.6.1 y 3.6.2. De la observación de esta figura es posible notar tres cosas:

- 1.- Para un mismo tiempo de divergencia, R_c es peor estima de k cuanto mayor es el propio valor de k .
- 2.- R_c es peor estima de k según aumenta el tiempo de divergencia αT .
- 3.- La pendiente de la gráfica se incrementa con k . Esto es, el efecto del tiempo de divergencia a la hora de subestimar k es mayor también cuanto mayor es k .

Esto se aprecia mejor al estudiar la relación entre la razón R_c / k y el tiempo αT (figura 3.6.3).

Tal y como aparece en la figura 3.6.3, R_c se aproxima mucho a k cuando $k = 1$; y, en general, para tiempos de divergencia pequeños. De cualquier modo, según aumenta k , el valor de la razón R_c/k se aleja de k . Sin embargo, de los datos presentados en las tablas 3.6.2 a .4, sabemos que la mejor aproximación de R_c a k ($R_c/k = 0,68$) se obtuvo con los datos de especies en cuya descendencia se cumplía la regla de Haldane. Estos datos, a su vez, corresponden a la estima del máximo valor de k . Ello se debe a que, a pesar de que en el resto de casos el valor estimado de k fue menor (10-15), los tiempos αT de divergencia, eran muy superiores.

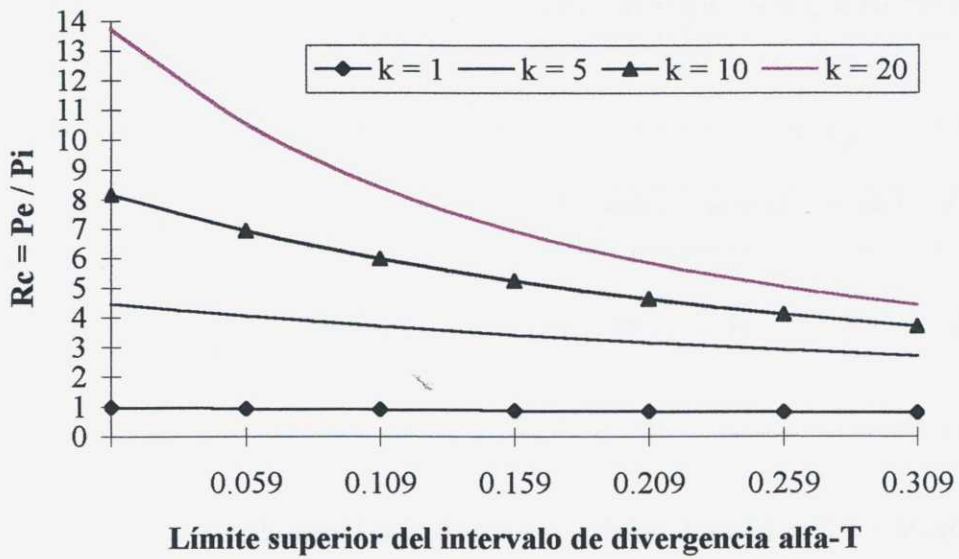


Figura 3.6.2. Relación de R_c con αT para distintos valores de k .

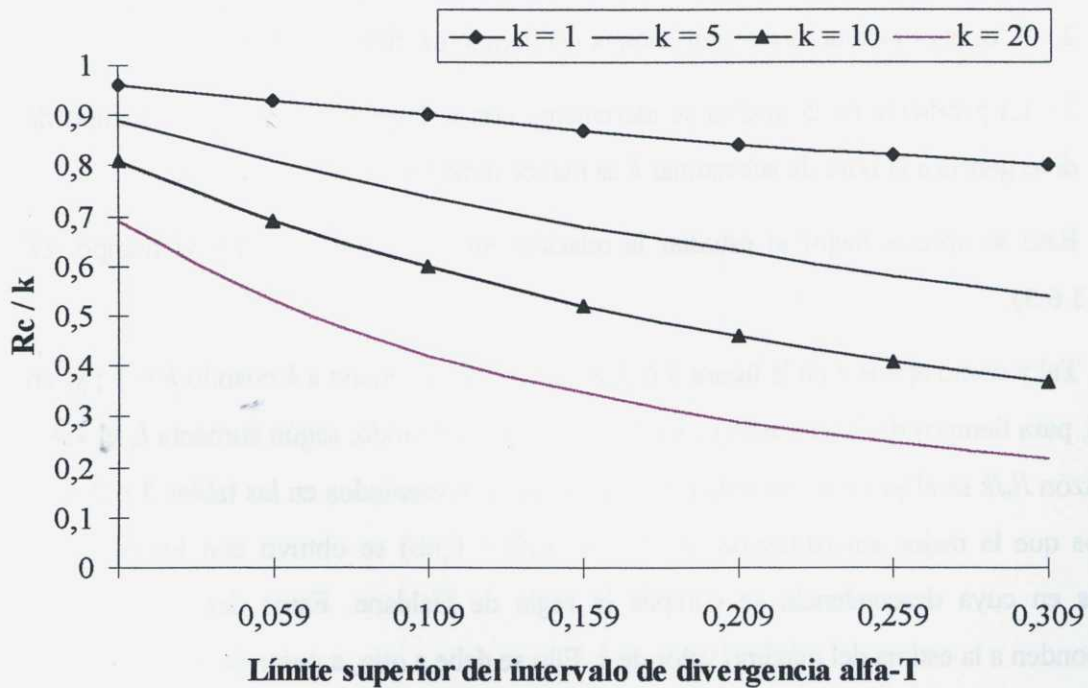
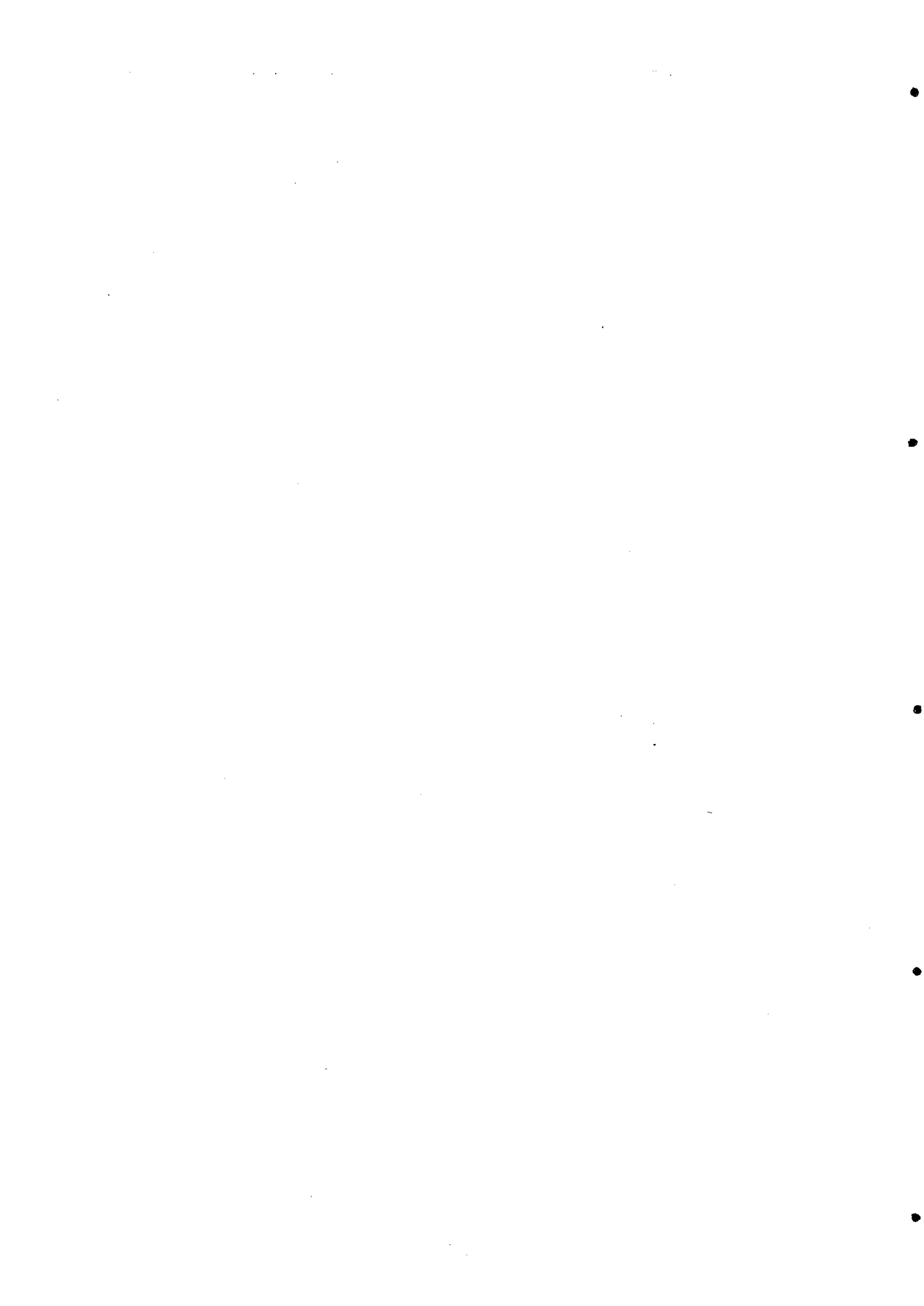


Figura 3.6.3. Relación de la razón R_c/k con αT para distintos valores de k .

4. DISCUSIÓN



4.1 INVIABILIDAD HÍBRIDA Y COMPLEJOS GÉNICOS COADAPTADOS.

4.1.1 Estudio de las generaciones F₁ y R1 híbridas: La regla de Haldane para la inviabilidad en los híbridos de *D. koepferae* y *D. buzzatii*.

En los híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* se verifica estrictamente la denominada 2ª regla de la especiación, según la cual “las diferencias interespecíficas en el cromosoma X contribuyen de manera desproporcionada a las anomalías observadas en los híbridos” (Coyne & Orr, 1989a). La 1ª regla de especiación, o regla de Haldane, afirma que “si sólo un sexo es raro, inviable o estéril en los híbridos F₁ este sexo es el heterogamético” (Haldane, 1922). Efectivamente, sólo los machos híbridos en la F₁ entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* son estériles. Sin embargo, no se observan grandes diferencias de viabilidad entre los dos sexos en dicha F₁ ($\alpha = 0,15$), aunque sí en la R1 y siguientes generaciones de retrocruzamientos hacia *D. buzzatii*. Aparecen por ello, diferencias significativas para el carácter viabilidad de machos híbridos en el paso de la generación F₁ a la R1 (tabla 3.1.1.2). Este patrón coincide con el llamado “desplome” de la “fitness” en la F₂, característica de los complejos génicos coadaptados (Carson & Templeton, 1984), que, utilizando la terminología de Templeton, es típica de arquitecturas genéticas tipo II (uno o pocos loci de efecto mayor y múltiples modificadores epistáticos) ó III (pares de loci complementarios) (Templeton 1981).

Las diferencias entre las generaciones F₁ y R1 se concretan en un cambio significativo del valor de la razón sexual ($R = n^{\circ} \text{ machos} / n^{\circ} \text{ hembras}$), que pasa de 0,85 a 0,63. Pero además, mientras que en las F₁ de distintos cruzamientos interespecíficos la varianza genética para el carácter viabilidad de machos híbridos no es significativamente distinta de 0, sí lo es en las R1, lo cual implica que una cierta variación genética se libera en esta generación.

Puesto que el paso de la F₁ a la R1 implica una reorganización del genoma debido a la recombinación entre los cromosomas de ambas especies, así como una pérdida de muchas de las regiones de *D. koepferae* (excepto en la línea 10 que se retrocruzó hacia *D. koepferae* y no presentó diferencias significativas de viabilidad respecto a la F₁), la explicación más sencilla para la letalidad observada sería la ausencia de determinadas regiones de *D. koepferae*,

aunque no puede descartarse que su causa sea en realidad la presencia de alguna de las regiones de *D. buzzatii*.

Postulamos entonces la hipótesis de uno o varios complejos de genes coadaptados presentes en *D. koepferae*. Cuando se rompen estos complejos aparece letalidad de los individuos portadores de alguno de los componentes de este complejo.

Imaginamos que el complejo cuya ruptura está provocando la inviabilidad se halla fijado en *D. koepferae* porque no tiene sentido que los supresores del efecto letal no lo estén (el letal o letales serían eliminados por la selección natural), y por otro lado si el efecto letal no está fijado sería más difícil observar una disminución significativa de *R* en el paso de la F_1 a la R_1 . Por ello supondremos que en la F_1 todos los elementos del complejo (o complejos) deben estar presentes. Sin embargo, no es posible aceptar la hipótesis de igual viabilidad de machos que de hembras en los cruces F_1 , puesto que aunque no se detecta ninguna línea en que sea posible rechazar esta hipótesis al nivel de significación usual del 5%, ello se debe a la falta de potencia estadística (tabla 3.1.1.1 y texto posterior). Por ello, tras agruparse los datos y obtener un tamaño de muestra que permite obtener una potencia superior al 95% en el contraste, se estima una pérdida promedio de "fitness" de los individuos F_1 de 0,15. Esta pérdida puede deberse a que los genes del complejo coadaptado no interactúan de manera óptima en la F_1 , debido a la presencia de una dotación autosómica completa de *D. buzzatii* (el cromosoma Y sólo afecta a la fertilidad).

Para explicar los valores de la razón sexual en la F_1 y la R_1 definíamos un modelo (Resultados 3.1.4) donde había sólo dos letales de machos híbridos en el genoma de *D. koepferae*, *lhA* y *lhE*, con sus correspondientes supresores conespecíficos dominantes, *Su(lhA)* y *Su(lhE)*, conformando dos sistemas de genes complementarios independientes en sus efectos (cada letal tiene su supresor). Bajo este modelo, los machos híbridos morirían cuando fuesen portadores de al menos un letal pero no de su supresor. Definíamos además, r = frecuencia de recombinación entre *lhA* y *lhE*, ligados al cromosoma X, y s = frecuencia de recombinación entre *Su(lhA)* y *Su(lhE)*, ligados a los autosomas.

A partir del modelo se obtuvo la ecuación

$$P_i = (P_1 \times P_3) + (P_2 \times P_4) = [(1-r)(1+s)/4] + (r/2) \quad (3.1.4.1)$$

que nos da la probabilidad (relativa a las hembras) de que un macho muera. Donde, para la R1:

P_1 , probabilidad de heredar ambos letales = $(1-r)/2$.

P_2 , probabilidad de heredar sólo un letal = r .

P_3 , probabilidad de no heredar los dos supresores = $(1+s)/2$.

P_4 , probabilidad de no heredar un determinado supresor = $1/2$.

Sustituyendo P_i por $1-R$ y asumiendo la frecuencia de recombinación r entre ambos letales como 0,12 obteníamos

$$0,37 = 0,28 + 0,22 \times s$$

Y despejando, $s = 0,41$.

Expresando la ecuación 3.1.4.1 como una función $s = f(r)$, veíamos que s es decreciente en r , siempre y cuando $P_i < 0,5$, como es nuestro caso. Lo cual nos llevaba finalmente, considerando el intervalo de confianza asociado a la estima de s , a aceptar $s = 0,5$ sólo si suponemos valores de r menores o iguales a 0,12. Esto no parece descabellado, puesto que si bien en las F_1 es posible que se registre un aumento de las frecuencias de recombinación respecto a las especies parentales, más tarde, en los retrocruzamientos, al reducirse la cantidad de material introgresado, se produce normalmente una disminución de las frecuencias de recombinación entre los segmentos cromosómicos homólogos de las dos especies (Evgenev, 1976), y nosotros hemos supuesto $r = 0,12$ en los híbridos introgresivos de *D. koepferae* en *buzzatii* en función meramente de un cálculo *a grosso modo* de la distancia cromosómica.

Sin embargo, debe notarse que según la fórmula 3.1.4.1 la probabilidad de que un macho F_1 muera es 0 (puesto que P_3 y P_4 valen cero), cuando en realidad se ha puesto de manifiesto una inviabilidad relativa de estos machos (respecto a sus hermanas), correspondiente a un coeficiente de selección en su contra que se ha estimado en $\alpha=0,15$. Luego el valor de P_i obtenido para la R1 utilizando la fórmula 3.1.4.1. estaría inflado porque hay un efecto externo al modelo planteado (según el modelo, α debería ser 0 en la F_1). Si corregimos la fórmula teniendo en cuenta este hecho, tendríamos para la R1:

$$0,37 - 0,15 = 0,22 = 0,28 + 0,22 \times s$$

Y despejando, $s = -0,27$ lo cual no es posible. Dado que $s, r \geq 0$, despejando en 3.1.4.1 se obtiene la condición:

$$4P_i - 1 \geq r, \text{ y finalmente } P_i \geq 0,25.$$

Lo que esto significa es que si para explicar los datos observados de la F_1 y la R_1 asumimos un modelo de dos letales (que sabemos ligados como se verá más adelante) y dos supresores (ligados o no) presentes todos en la F_1 , debemos asumir también que la probabilidad de inviabilidad en la R_1 debe ser en promedio mayor o igual que 0,25, lo cual implica que la disminución de la "fitness" observada en la F_1 no se acumula necesariamente de manera aditiva sobre la R_1 . Debe considerarse, pues, $P_i - f(\alpha)$ en vez de $P_i - \alpha$, donde $f(\alpha)$ es una función del coeficiente de selección en contra de los machos de la F_1 . El resultado es que, de un modo o de otro, debe suponerse una frecuencia de recombinación entre ambos letales menor que 0,12 para mantener el supuesto de independencia de ambos supresores.

El extremo opuesto a la hipótesis de independencia de ambos supresores ($s = 0,5$) es que ambos estén fuertemente ligados, de modo que sean difícilmente separables mediante recombinación. El caso límite sería $s = 0$ (a nivel citogenético sería equivalente a un supresor eficaz frente a ambos letales), que, si suponemos de nuevo $r = 0,12$, nos permite obtener según la fórmula 3.1.4.1 un valor $P_i = 0,28$, que puede ser un valor aceptable de $P_i - f(\alpha)$.

Ahora, ¿cómo explicar la pequeña varianza genética que aparece en la descendencia R_1 ?

Por un lado, si *D. koepferae* fuese polimórfica para una variante no-letal en alguno de los dos loci de letalidad híbrida, habría madres de la R_1 portadoras de dos letales o de uno solo. Por otro, si los dos letales están fijados en *D. koepferae*, como parece más probable (puesto que no se han encontrado líneas R_1 con viabilidad total de machos), todas las madres serán portadoras de dos letales y dos supresores, ya que los supresores también estarán fijados. Entonces la variabilidad hallada se deberá a las interacciones del fondo genético de *D. buzzatii* con las distintas combinaciones génicas procedentes de *D. koepferae*. Nuestra conjetura es que en *D. buzzatii* segregan modificadores que promueven (o permiten) la letalidad; estos modificadores serán recesivos o dominantes frente a los modificadores que inhiben la letalidad presentes en *D. koepferae* y que denominamos supresores (ver figura 4.1 más adelante). Suponemos que los modificadores dominantes de *D. buzzatii* están a baja

frecuencia porque no se observan líneas con inviabilidad total de machos híbridos ni en la F₁ ni en la R₁. La confirmación de la existencia de ambos tipos de modificadores (recesivos y dominantes) podremos obtenerla más adelante.

4.1.2 Localización cromosómica de un factor perteneciente al sistema de genes complementarios.

Tras obtener y analizar los resultados que expresan la viabilidad diferencial en el paso de la F₁ a la R₁, nos podemos plantear las siguientes preguntas:

¿Cuántos genes forman el sistema de genes complementarios?, ¿en qué cromosomas se encuentran?, ¿cuántos de estos sistemas existen?

Sabemos que se conoce la existencia de dos únicas regiones del cromosoma X de *D. koepferae* que provocan inviabilidad interespecífica en los machos híbridos con *D. buzzatii* (Carvajal *et al.*, 1996).

Se localizó de manera bastante precisa uno de estos factores en la región XA2a-A2c (Resultados 3.1.2.1). Comprobamos además la penetrancia total del letal contenido en esta región al expresarse en un fondo genético de *D. buzzatii* SL-101, y estimamos en 0,04 el valor de la frecuencia de recombinación entre este letal y el locus *white* ubicado en XB4a. Este valor nos da la frecuencia esperada de machos híbridos w^+ si no existen supresores que interaccionen con el letal. No se detectó variabilidad en buzSL-101 para el carácter viabilidad de machos introgressados con esta región en ausencia de otras regiones de *D. koepferae*, como indican los valores no significativos de las varianzas genéticas obtenidas para este carácter (tablas 3.1.2.2 y 3.1.2.5).

En cuanto a la ausencia de varianza genética significativa, es lógica porque todas las líneas llevan la región seleccionada del cromosoma X de *D. koepferae* y el resto del genoma es de *D. buzzatii*. Según nuestro modelo (ver más adelante), toda la variabilidad subyacente

en *D. buzzatii* para los modificadores recesivos o dominantes respecto de los supresores de *D. koepferae* permanece oculta cuando estos últimos no están presentes en el genoma.

Es posible que esta región de *D. koepferae* incluya no uno sino varios factores de menor efecto, pero que al estar constreñidos a una región citológicamente tan pequeña (tres bandas de cromosoma politénico) se comporten como un único factor, gen o unidad segregante de efecto mayor, seleccionable y con penetrancia fenotípica completa. Esto es lo que se observa en las tablas 3.1.2.3 y 3.1.2.4, donde la presencia o no de la región XA2a-A2c conlleva la existencia o no de inviabilidad, respectivamente. Esto es lo esperado para una arquitectura genética tipo II o tipo III, ambas ya definidas al principio de la discusión (Templeton 1981).

Con respecto al análisis de los machos híbridos inviables del apartado 3.1.3, baste decir por ahora que los tres estadios de inviabilidad pupal encontrados (fig. 3.1.3.1) se corresponden perfectamente con los índices 1-2, 4 y 5 descritos para la inviabilidad provocada por algunos de los mutantes de *Broad-Complex* en *D. melanogaster* (Kiss *et al.*, 1988).

4.1.3 La región cromosómica 4D1-D5.

A lo largo del capítulo 3.2 de resultados, se demostró que la región 4D1-D5 de *D. koepferae* contiene un factor (o factores) capaz de contrarrestar el efecto letal en machos híbridos introgresivos de la región XA2a-A2c también de *D. koepferae*. A continuación, pasaremos a discutir primero los resultados obtenidos en los retrocruces, y posteriormente discutiremos los resultados que corresponden ya a las líneas seleccionadas a partir de aquéllos.

4.1.3.1 Interpretación de las varianzas en los retrocruces.

Como se vio en el apartado 3.2.1.3 (tabla 3.2.1.3), las varianzas genéticas para el carácter viabilidad de machos híbridos w^+ no son significativamente distintas de cero ni en la

F₁ ni en la R7. En el paso de la F₁ a la R1 la varianza genética se hace significativa, y vuelve a incrementarse al pasar de la R1 a la R2. En las generaciones que van de la R2 a la R6 no hay diferencias significativas en el valor de las varianzas.

El valor no significativo de varianza genética en la F₁ es lógico si suponemos que ninguno de los factores del complejo en estudio se halla segregando en *D. koepferae*. El incremento de la varianza genética en el paso a la R1 se explica porque en los gametos maternos habrá diferentes combinaciones de letales y supresores, que afectarán a su vez a las interacciones con la variabilidad putativa (modificadores dominantes y recesivos) de *D. buzzatii*. Además, en la R1 el equilibrio de los fondos genéticos de la F₁ se desplaza hacia *D. buzzatii*. La posterior segregación de las diferentes combinaciones genéticas de la R1 explica el nuevo incremento de varianza al pasar a la R2. En la R2 el número de líneas fundadas fue suficientemente grande para que la variabilidad en las sucesivas generaciones se mantuviera constante, al seleccionarse a favor de la presencia de un letal y del efecto supresor.

En la R7 desaparece la varianza genética para el carácter en estudio, puesto que separamos las líneas portadoras de la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterocigosis, que, llegados a ese punto, eran las que parecían llevar asociado el efecto supresor. Dado que, como se vió, la penetrancia del letal en ausencia de supresores es completa (tablas 3.1.2.3 y 3.1.2.4), la varianza genética para el carácter viabilidad de machos w^+ híbridos desapareció.

4.1.3.2 El efecto de la región 4D1-D5.

Se demuestra (en el apartado 3.2.2 de Resultados) que es necesaria la presencia de esta región para recuperar la viabilidad de los machos híbridos w^+ . Detectamos, sin embargo, variabilidad para el carácter viabilidad de machos híbridos, asociada a la presencia de esta región (tabla 3.2.1.3: varianzas de retrocruces, y tablas 3.2.2.5 y .6). Como ya se discutió someramente en el apartado 3.2.2, esta variabilidad encontrada no se debe, como se pensó en un principio, a la presencia, a veces críptica, de otro factor supresor de *D. koepferae*. La esporádica aparición de un cuerpo cromatínico similar a un "dot" extranumerario ha de ser más una consecuencia de las alteraciones que en los híbridos están teniendo lugar que una

causa de esas alteraciones. Podemos descartar la hipótesis de otro factor supresor críptico porque tras diez generaciones de selección para la sola presencia de la región 4D1-D5 de *D. koepferae*, el efecto supresor seguía manifestándose y presentando la misma variabilidad en sus efectos. No es necesario implicar a un tercer locus para explicar estos resultados. Lo más sencillo es suponer que existen en *D. buzzatii* al menos dos clases de alelos modificadores que permiten la inviabilidad: unos dominantes ($Su(lhA)_b$) y otros recesivos ($su(lhA)_b$) en cuanto a su efecto sobre el modificador inhibidor de la letalidad (el supresor $Su(lhA)_k$) presente en *D. koepferae*. Si suponemos que lo más probable es que los alelos de *D. buzzatii* sean recesivos respecto al supresor de *D. koepferae*, los cruces más frecuentes serán del tipo $Su(lhA)_k / su(lhA)_b$ (híbrido) \times $su(lhA)_b / su(lhA)_b$ (*D. buzzatii*), y esperaremos frecuencias de recuperación de 0,5. Esta frecuencia baja a 0,25 en el caso de que el progenitor de *D. buzzatii* sea $Su(lhA)_b / su(lhA)_b$. Y finalmente el supresor de *D. koepferae* se mostrará ineficaz en aquellos casos (raros) en que el progenitor de *D. buzzatii* sea homocigoto para el alelo $Su(lhA)_b$. Explicamos de este modo la existencia de variabilidad asociada a la presencia de la región recuperadora de *D. koepferae* (véase fig. 4.1).

Cruce	Frec. esperada de machos híbridos viables ($Su(lhA)_k / su(lhA)_b$)
1. $Su(lhA)_k / - \times su(lhA)_b / su(lhA)_b \longrightarrow$	1/2
2. $Su(lhA)_k / - \times Su(lhA)_b / su(lhA)_b \longrightarrow$	1/4
3. $Su(lhA)_k / - \times Su(lhA)_b / Su(lhA)_b \longrightarrow$	0

Figura 4.1: Posibles cruces de un híbrido introgresivo, heterocigoto para el supresor, con las variantes de *D. buzzatii*. $Su(lhA)_k$: Supresor de *D. koepferae*; -: cualquiera de los dos alelos de *D. buzzatii*; $su(lhA)_b$: modificador de *D. buzzatii* que promueve la letalidad y es recesivo frente al alelo supresor de *D. koepferae*; $Su(lhA)_b$: modificador de *D. buzzatii* que promueve la letalidad y es dominante frente al alelo supresor de *D. koepferae*

Sería muy fácil explicar así un hipotético paso futuro en cuanto a la plena expresión de la regla de Haldane para la inviabilidad en estos híbridos (inviabilidad de los machos en la F_1). Para ello bastaría que se fijaran en *D. buzzatii* los alelos que dominan frente al supresor o supresores de *D. koepferae* de cualquiera de los letales interespecíficos de esta misma

especie. Si ello ocurriera, la presencia de una copia de cada supresor en la F_1 no sería suficiente puesto que se verían anulados por sus homólogos de *D. buzzatii*.

4.1.4 Estudio de la reciprocidad en las relaciones de las regiones XA1a-A2c y 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresadas en *D. buzzatii*.

En el capítulo 3.3 exploramos también las relaciones entre los dos factores de *D. koepferae* (letal y supresor): si el factor del X es letal en hemizigosis en ausencia del factor del 4, sería posible a su vez que el factor del 4 fuese letal en homocigosis en ausencia del factor del X (o incluso en su presencia).

En el apartado 3.3.1 comprobamos que tanto los machos como las hembras homocigotas para la región del cromosoma 4 de *D. koepferae* son viables. También lo son las hembras portadoras de la región del X introgresada en heterocigosis y de la región del 4 en homocigosis. No es posible poner la región del X en homocigosis porque los machos de *D. buzzatii* introgresados con cualquier región del X de *D. koepferae* son siempre estériles (Naveira & Fontdevila, 1991).

Pero en los cruces realizados para obtener y mantener hembras heterocigotas para el X y homocigotas para la región del 4 (tabla 3.3.3.1), se observa una heterogeneidad en la descendencia que implica un cierto defecto de hembras, y aparecen además alteraciones morfológicas, tales como segmentos abdominales incompletos, genitalia rotada en machos, y vena V incompleta en las alas. Es llamativa la similitud de las alteraciones abdominales con el fenotipo asociado al síndrome de abdomen alterado (*aa*), que es uno de los ejemplos mejor conocidos de complejos génicos coadaptados en *Drosophila* (Carson & Templeton, 1984; Templeton 1979, 1982b, 1983). Este carácter coadaptado se denomina "abdomen alterado" debido a uno de sus efectos pleiotrópicos, y está determinado por una unidad segregante de efecto mayor ligada al cromosoma X (en realidad es ADNr), que presenta fuertes interacciones epistáticas con modificadores ligados a todos los cromosomas (Carson & Templeton, 1984).

Tras hacer un análisis más exhaustivo (tabla 3.3.3.8), observamos que podemos asociar el defecto parcial de hembras a la presencia en homocigosis de la región 4D1-D5 de *D.*

koepferae en ambos progenitores, independientemente de que esté o no presente la región del X de *D. koepferae*. Si bien es en los cruces en los que esta región está presente donde la inviabilidad parcial parece más acentuada, aceptándose la hipótesis de inviabilidad de la mitad de las hembras.

Finalmente, parece existir una relación entre la aparición del fenotipo “vena V incompleta” y la viabilidad de las hembras (tabla 3.3.3.9). Sin embargo, no se detecta correlación significativa entre ambas variables, quizá debido al escaso número de líneas consideradas (cuatro). Está claro que el panorama de interacciones entre las regiones del X y del 4 de *D. koepferae* no es sencillo. Es posible que haya interacciones adicionales con otras regiones de *D. buzzatii*, además de variabilidad en las relaciones de dominancia de los alelos homólogos de *D. buzzatii*. Pero también es posible que, debido al nivel cromosómico al que estamos trabajando, estemos introduciendo en *D. buzzatii* otros genes de *D. koepferae* que no estén implicados directamente en el fenómeno de la inviabilidad de los machos híbridos, pero que sí provocan distorsiones cuando se hallan en homocigosis en *D. buzzatii*.

Llegados a este punto, trataremos de enfocar el problema de la base genética de la inviabilidad de machos híbridos entre las especies de *D. buzzatii* y *D. koepferae* desde dos perspectivas diferentes:

1. Tratando de responder a la pregunta *¿existe variabilidad en D. buzzatii para el efecto del letal interespecífico presente en el cromosoma X de D. koepferae?*.
2. Iniciando una aproximación molecular al problema.

4.1.5 Estudio del efecto de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* sobre distintas cepas de *D. buzzatii*.

En buzSL detectamos variabilidad en sus relaciones con la región 4D1-D5 de *D. koepferae*, que se concretaba en el valor de varianza genética para el carácter viabilidad de machos híbridos observado en la R1 y, en el caso de buzSL-101, en los diferentes valores de viabilidad de los machos híbridos que heredaban esta región (apartados 4.1.1 y 4.1.3). Pero en lo referido al efecto letal de la región XA2a-A2c, no detectamos variabilidad en buzSL-101 (apartado 4.1.2). Es posible, no obstante, que exista variabilidad en otras poblaciones y cepas

de *D. buzzatii*. Al realizar los correspondientes cruces (apartado 3.4), comprobamos efectivamente que así era. Detectamos cuatro cepas de *D. buzzatii* donde la presencia de la región XA2a-A2c introgresada en heterocigosis en las madres no producía los efectos esperados de inviabilidad de machos híbridos w^+ (tabla 3.4.1.1). De ellas, el caso más interesante es el de buzSL-5 (procedencia: San Luís, Argentina), puesto que en todas las líneas analizadas se observaron diferencias significativas respecto al valor esperado de inviabilidad de machos w^+ , y además se obtuvieron los valores más elevados de frecuencia de estos machos. Pero antes de analizar en profundidad este caso, veremos qué ocurrió con las otras cepas.

En buzDF (procedencia: Dean Funes, Argentina) y buzM (procedencia: Mazarrón, Murcia) en algunas líneas hay una cierta recuperación de la viabilidad. Lo mismo ocurre en buzSL-inv4s, pero aquí sólo dos líneas de un total de trece presentaron una cierta viabilidad de machos w^+ .

En el caso de buzSL-inv4s se podría argumentar que, puesto que éste fue el fondo genético donde se puso en homocigosis la región 4D1-D5 de *D. koepferae*, el efecto recuperador de la cepa estaría sesgando la aparente recuperación de la viabilidad de los machos híbridos w^+ por la región 4D1-D5 de *D. koepferae* puesta en homocigosis (tabla 3.3.2.1). Hay que hacer notar, sin embargo, que en los cruces de hembras introgresadas en heterocigosis con la región X de *D. koepferae* (las hembras de inviabilidad) con machos híbridos homocigotos para 4D1-D5, cinco de seis líneas (apartado 3.3.2) presentan recuperación total de la viabilidad, y la otra línea se acepta tanto para la hipótesis de inviabilidad como para la de viabilidad parcial. Si tenemos en cuenta que, en el diseño de cruces para poner en homocigosis la región 4D1-D5 (figura 2.3.3), se utilizaron diferentes hembras de la cepa buzSL-inv4s, obteniéndose por separado, finalmente, distintas líneas con la región 4D1-D5 de *D. koepferae* en homocigosis, es improbable que todas las líneas 4D1-D5 heredaran la capacidad recuperadora de la viabilidad de la cepa invSL-4s, puesto que sólo una de cada seis hembras de esta cepa parecen poseer ésta (ver resultados 3.4.1 y tablas 3.4.1.8 y .9). También debemos tener en cuenta que no todos los machos homocigotos 4D1-D5 utilizados en los cruces con hembras de inviabilidad provenían de las mismas líneas; luego se concluye que es muy poco probable que en cinco de seis líneas se produjera el sesgo debido al fondo genético de buzSL-inv4s.

Hechas estas consideraciones pasaremos a examinar el caso de buzSL-5.

4.1.6 Sobre la estima del número de supresores presentes en buzSL-5.

En todos los cruces hechos con la cepa buzSL-5 hay recuperación de la viabilidad de los machos w^+ híbridos (tablas 3.4.1.1, 3.4.1.10 y 3.4.1.11). Esto significa que el efecto supresor se halla fijado en esta cepa.

En este caso no es posible utilizar la asinapsis interespecífica como marcador de la presencia del factor supresor, porque es un efecto intraespecífico, pero en función de la segregación de este efecto a lo largo de dos generaciones de retrocruzamiento hacia una cepa sin efecto supresor (buzSL-101), podremos decidir si corresponde a uno, dos o más factores supresores, y si debemos considerar un modelo epistático, o no, para la actuación de los mismos. Como vimos en el apartado 3.4.2.3 la mejor explicación de los datos obtenidos ocurría bajo un modelo de epistasis de N supresores que interaccionaban de n en n , siendo $N > n$. Dentro de este supuesto de $N > n$ caben una serie de casos entre los cuales es difícil distinguir, siendo imposible con los tamaños de muestra que hemos manejado descartar unas u otras hipótesis. Éstas son las cuatro siguientes:

1. $N=5, n=3$.
2. $N=4, n=3$.
3. $N=4, n=2$.
4. $N=3, n=2$.

El resto de casos $N > n$ (siendo N máximo = 5, porque no consideramos el cromosoma Y) dan valores significativamente distintos, tanto para los porcentajes de líneas como de machos viables dentro de cada línea.

De todos modos, el mejor ajuste (los valores más próximos a los observados) lo da el caso $N=5$ y $n=3$, aunque, insistimos, hacen falta mayores tamaños de muestra para poder rechazar las otras hipótesis mencionadas.

Dado el diseño de cruces utilizado, este último caso de $N = 5$ supresores involucraría a los 5 autosomas. Esta estima debe confirmarse mediante estudios citogenéticos con marcadores cromosómicos (por ejemplo inversiones) en primera instancia, y posteriormente marcadores que permitan una localización más específica de los efectos supresores y su categorización en genes de efecto mayor o poligenes.

Sin embargo, el resultado obtenido utilizando las cadenas de Markov nos remite a una clase de hipótesis ($N > n$, $n > 1$) concordante con la, a menudo, compleja base genética que subyace al aislamiento reproductivo postzigótico: casos similares, en el sentido de varios o todos los cromosomas involucrados, se dan en la esterilidad de machos híbridos en las especies *D. hydei*-*D. neohydei* y *D. mojavensis*-*D. arizonae* (Wu & Palopoli, 1994). Este resultado parece también concordar con el postulado enunciado por Orr (1995), según el cual es más fácil la evolución de complejas incompatibilidades híbridas si están involucrados 3 o más loci que si son establecidas mediante pares de genes. El caso $(N,n) = (5,3)$ también aparece tentadoramente acorde con la base genética conocida del síndrome de abdomen alterado, donde el factor ligado al X presenta fuertes interacciones epistáticas con modificadores ligados a todos los cromosomas (Carson & Templeton, 1984).

4.1.7 El significado de la variabilidad intraespecífica.

Las regiones XA2a-A2c y 4D1-D5 contienen un complejo génico en *D. koepferae*. La presencia de XA2a-A2c de *D. koepferae* en *D. buzzatii* sin la correspondiente región 4D1-D5 provoca inviabilidad de los machos híbridos. Sin embargo hemos detectado variabilidad en buzSL-101 en cuanto a sus relaciones de dominancia (modificadores recesivos y dominantes) con la región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en heterozigosis. También hemos hallado variabilidad respecto a la presencia en *D. buzzatii* de efectos supresores análogos al asociado a 4D1-D5 de *D. koepferae*, que si bien no están presentes ni en buzSL-101 ni en otras cepas, sí se hallan segregando en algunas de las cepas analizadas y parecen fijados en buzSL-5.

Algunos modelos de evolución de las barreras de aislamiento reproductivo plantean las consecuencias de los "cuellos de botella" poblacionales sobre los polimorfismos de complejos génicos (mecanismos de especiación mediados por efecto fundador: Mayr, 1982;

Carson & Templeton, 1984; Barton, 1989). Estos modelos podrían aplicarse a nuestro caso para explicar la variabilidad presente en *D. buzzatii* para el carácter viabilidad de machos híbridos. Así, la variabilidad entre las cepas provenientes de poblaciones de distintas localidades se explicaría debido a las diferentes historias evolutivas que afectaron a sus complejos génicos. En el caso de las diferentes cepas provenientes de una misma población (San Luis), debemos tener en cuenta que estas cepas de laboratorio han pasado a través de múltiples cuellos de botella durante su historia, el primero de los cuales ocurre en su origen, pues se fundan, en cada caso, a partir de una hembra fecundada capturada en el campo. Esto explicaría la variabilidad existente entre las cepas de San Luis (por ejemplo SL-5 tiene efecto supresor y SL-6 no).

Lo que no deja de ser curioso es que aún hoy detectemos variabilidad dentro de algunas cepas, tanto para el efecto de la región del cromosoma 4, como para el de la región del X, ambos de *D. koepferae*, en *D. buzzatii*. Debe ser sometido a estudio si esta variabilidad existente dentro de las mismas cepas, tanto en buzSL-101 (manifestada en las diferentes frecuencias relativas de machos w^+ en los cruces con las regiones del X y del 4 de *D. koepferae*), como en buzSL-inv4s, buzDF y buzM (manifestada en las diferentes frecuencias de machos w^+ en las descendencias de los cruces con la región del X de *D. koepferae*), se relaciona con los polimorfismos de inversiones del cromosoma 2 presentes en estas cepas, que según se ha demostrado pueden tener valor adaptivo (Barbadilla *et al.*, 1994). La persistencia de polimorfismo para el carácter viabilidad de machos híbridos podría deberse entonces a que alguno de los factores involucrados se halle o bien dentro de alguna de estas inversiones o muy próximo a ellas.

4.1.8 El nivel molecular: Un paisaje complejo.

4.1.8.1 Las hormonas morfogenéticas.

Los resultados de las hibridaciones *in situ* de los genes *Sxl* y *sc* (fig 3.5.1.1), nos permiten descartarlos como potenciales factores contenidos en XA2a-A2c responsables de la inviabilidad de los machos híbridos.

Algunos autores ya se habían planteado el posible papel de los genes que controlan la compensación de dosis y la determinación sexual en el aislamiento reproductivo postzigótico (Coyne & Orr, 1989; Orr 1989a, Naveira & Fontdevila, 1991b). Orr (1989a) descarta *Sxl*, y consiguientemente el mecanismo de compensación de dosis regulado por este gen, como posibles responsables del aislamiento postzigótico en *Drosophila*, omitiendo que, aún descartado *Sxl*, la compensación ocurre vía interacción con los productos de los genes autosómicos *male specific lethal (msl)*-1, -2 y -3 y *maleless (mle)* (Parkhurst & Meneely, 1994). Por otro lado, en lo que concierne a la barrera representada por la esterilidad de los machos híbridos, no está demostrado que los mutantes utilizados por Orr tengan efecto en la línea germinal, además de que, en esta línea germinal, *Sxl* no es el único vínculo entre la razón X/A y la diferenciación sexual, aunque conserva un papel determinante (Steinmann-Zwicky, 1994a y b).

De todos modos, consideramos que la inviabilidad de los híbridos de *Drosophila* en general, y en particular la de los machos híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*, es probable que efectivamente no implique a los genes integrados en la jerarquía regulatoria que controla la determinación del sexo y la compensación de dosis. Los motivos que nos llevan a ello son tres:

- a) Por un lado el resurgimiento de las ideas de Muller (Muller 1940), que explican tanto la regla de Haldane como el efecto predominante del cromosoma X mediante la recesividad parcial o total de los alelos responsables (Turelli & Orr, 1995; Zeng, 1996). Si ambos efectos (regla de Haldane y efecto del X) se explican en términos de recesividad, ya no es necesario buscar genes con un efecto específico de sexo (genes de determinación sexual, genes de compensación de dosis...).
- b) La conservación evolutiva de los mecanismos moleculares de determinación del sexo en *Drosophila* (Boop *et al.*, 1996; Erickson & Cline, 1998). Lo cual no apoya la idea de que sean precisamente alteraciones en estos mecanismos las que conduzcan a la inviabilidad híbrida.
- c) Por otro lado, la constatación de que nuestras observaciones tanto de los estadios de inviabilidad hallados (apartado 3.1.3) como de otras alteraciones que aparecen esporádicamente (genitalia rotada, tergitos incompletos o decolorados, etc.),

coinciden con fenotipos que se observan cuando tienen lugar distorsiones en los niveles de las hormonas morfogenéticas: ecdisona y hormona juvenil.

Concretamente, los tres estadios donde se manifiesta la letalidad en los híbridos corresponden a los definidos para los mutantes de *BR-C* (Kiss *et al.*, 1988): prepupa (índice 1-2), imago sin pigmentar (índice 4), e imago aparentemente bien formado pero sin eclosionar (5).

4.1.8.1.1 *La ecdisona.*

La ecdisona actúa como señal temporizadora para coordinar los cambios morfogenéticos específicos de tejido en *Drosophila* durante la metamorfosis. En este periodo la ecdisona afecta virtualmente a todos los tejidos en tanto el animal entero es reorganizado (Andres *et al.*, 1993). Se han estudiado en *D. melanogaster* a nivel molecular tres "puffs" tempranos inducidos por la ecdisona, a saber 2B5 (*BR-C*), 74EF (*E74*) y 75B (*E75*). Las mutaciones afectando a estos tres genes son letales durante el desarrollo de larva tardía, prepupa o pupa (Andres & Thummel, 1992).

4.1.8.1.2 *La hormona juvenil.*

La hormona juvenil (JH) es antagonista de la ecdisona, lo cual significa que elevadas cantidades de una inhiben la producción de la otra (Riddiford & Truman, 1993). De los estudios realizados con juvenoides (compuestos con actividad de hormona juvenil) en diferentes especies de dípteros (Sehnal & Zdarek, 1976) se concluye que la metamorfosis es determinada primeramente en función de pequeñas o moderadas dosis de juvenoides, pero se bloquea con dosis elevadas. Así, determinadas dosis impiden la eclosión del adulto perfectamente formado, inhiben la rotación de la genitalia en los machos, y sus efectos se manifiestan también en la formación del abdomen, con tergitos ausentes o incompletos y presencia de regiones mal definidas y sin coloración (Bryant & Sang, 1968; Chihara *et al.*, 1972; Postlethwait, 1973; Sehnal & Zdarek, 1976; Bouchard & Wilson, 1987). Como ya

mencionamos, el fenotipo de no eclosión del adulto es una de las categorías de inviabilidad observadas en los mutantes de *BR-C* (Kiss *et al.*, 1988) y también es uno de los fenotipos de inviabilidad que observamos en los machos híbridos de *D. koepferae* y *D. buzzatii*. El resto de los fenotipos descritos para las distorsiones en los niveles de JH también los observamos en nuestros híbridos, con lo cual parece que, ya sea directa o indirectamente, el problema de la inviabilidad de los machos híbridos en *D. buzzatii* y *D. koepferae* ha de estar relacionado con distorsiones en los niveles de hormona juvenil, o bien con alguno de los genes que inician la cascada regulatoria tras el pulso inicial de la ecdisona en la metamorfosis. Algunos de estos fenotipos, como las diferentes alteraciones abdominales y en concreto los tergitos ausentes o incompletos, se relacionan también con el síndrome de abdomen alterado, *aa*, en *D. mercatorum* (Carson & Templeton, 1984). Por otro lado, se han descrito en la bibliografía casos similares en otros híbridos, como los que resultan del cruce entre *D. madeirensis* y *D. subobscura* (Khadem & Krimbas, 1991). Esta aparente coincidencia fenotípica no debe extrañarnos puesto que tanto la pleiotropía como la epistasis son características comunes a los sistemas de regulación.

Recordemos que los niveles de hormona juvenil y ecdisona controlan la metamorfosis mediante la activación de baterías de genes de respuesta temprana (entre los que están *BR-C* y *E-74*), que a su vez interaccionan entre sí para activar otras baterías de genes (de respuesta tardía). Por otro lado, el síndrome de abdomen alterado descrito por Templeton se debe en última instancia a una disminución del número de genes funcionales de ARN's ribosómicos (Templeton *et al.*, 1989). Los genes más afectados por esta disminución serían aquellos que necesitaran incrementar fuertemente su expresión en momentos muy concretos del desarrollo. Este podría ser el caso de esterasas relacionadas con los procesos de degradación de hormonas morfogenéticas como la ecdisona y JH (Templeton *et al.*, 1987).

4.1.8.2 Tres genes de respuesta a ecdisona

Nos fijamos en tres genes de respuesta a ecdisona: *Ddc*, cuyo interés para nosotros radica en que está relacionado con la eclosión del adulto y que presenta dimorfismo sexual en cuanto a su concentración en los órganos reproductores. Igualmente *est-6* también presenta

dimorfismo sexual además de ser una esterasa, que es la clase de enzimas involucradas en la degradación de las hormonas esteroides entre las cuales se hallan la ecdisona y JH. Esto hizo que nos fijáramos en ambos; pues no olvidemos que la inviabilidad en estudio afecta sólo a los machos híbridos. Finalmente *BR-C*, que resultó ser el candidato más interesante en cuanto a su posible papel en la inviabilidad de los machos híbridos de las especies en estudio.

4.1.8.2.1 *Dopadecarboxilasa (Ddc) y la esterasa-6 (est-6)*.

Ddc es un gen de respuesta a ecdisona que se relaciona con los procesos de endurecimiento de la cutícula (Fristrom *et al.*, 1986), los mismos procesos que se suponen responsables de que el adulto no eclosiona y de determinadas alteraciones o heridas abdominales. Se observan, entre otros, niveles máximos de la enzima DDC en la fase de pupación y de eclosión del adulto de *D. melanogaster*. Ya en los adultos emergidos se observan mayores concentraciones de transcritos *Ddc* en el abdomen de los machos respecto a las hembras, muy posiblemente debido a la contribución de los transcritos testiculares a la muestra del macho (se encuentra muy bajo nivel de estos transcritos en los ovarios). La región cromosómica que contiene a *Ddc* está situada en el cromosoma 2L de *D. melanogaster*, que corresponde al cromosoma 3 de *D. buzzatii* y es un cluster de dieciocho genes, catorce de los cuales tienen que ver con el endurecimiento de la cutícula (Spencer *et al.*, 1986).

En *D. melanogaster*, el control de la expresión de la *est-6* (cromosoma 3L de *D. melanogaster*, que corresponde al cromosoma 4 de *D. buzzatii*) en los conductos eyaculatorios y posiblemente en otros tejidos (la actividad de esta enzima se relaciona también con la ontogenia en *D. melanogaster* y *D. simulans*, Aronshtam *et al.*, 1974) está modulado por las hormonas juvenil y ecdisona. Se hallan diferencias en los niveles de actividad de la enzima en los híbridos respecto a las especies parentales, *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. mauritiana*, posiblemente debidas a diferencias regulatorias y no estructurales. Existen además diferentes polimorfismos regulatorios que afectan a la actividad de esta enzima en ambos sexos. Se detecta dimorfismo sexual en la expresión de *est-6* controlada por ecdisona y hormona juvenil (Karotam & Oakeshott, 1993).

4.1.8.2.2 *Broad-Complex (BR-C)*.

BR-C es un gen fundamental en la metamorfosis. Se localiza en la región 2B5 del cromosoma X de *D. melanogaster*, que corresponde a un “puff” de respuesta temprana a ecdisona (Dibello *et al.*, 1991). Ésta es una región muy compleja a nivel genético e incluye al menos cuatro grupos de complementación, así como una serie de alelos que no complementan con ninguno de estos cuatro grupos. Esta región es conocida como *BR-C*. Como ya se ha dicho, entre los fenotipos letales de *BR-C* se describen exactamente los que observamos nosotros en los machos de *D. buzzatii* introgresados en hemizigosis con la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

De los tres genes mencionados, fue finalmente *BR-C* el que centró nuestro interés debido a la serie de motivos que a continuación se exponen:

1. *BR-C* es un gen de respuesta a ecdisona que se activa en los primeros momentos de la metamorfosis.
2. Los mutantes de *BR-C* producen inviabilidad tardía idéntica en algunos casos a la observada en el caso de los machos híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*.
3. Según el clásico modelo de Ashburner (Ashburner *et al.*, 1974), los “puffs” de respuesta temprana contienen una función que activa en “trans” a un elevado número de genes dentro de los “puffs” de respuesta tardía. Esto es interesante desde el punto de vista de la inviabilidad interespecífica, que conlleva precisamente la existencia de incompatibilidades específicas del híbrido (inexistentes dentro de cada especie). Estas incompatibilidades son, en casos como el que nos ocupa, necesariamente debidas a interacciones en “trans”. Pero además en *BR-C* se conoce ya al menos una interacción en “trans” que posiblemente involucra a los productos de *BR-C* y *E-74* (Fletcher & Thummel, 1995). *E-74* se encuentra en el cromosoma 3L de *D. melanogaster* que corresponde al cromosoma 4 en *D. buzzatii* y *koepferae*.
4. *BR-C* se localizó mediante hibridación *in-situ* en el extremo distal del X de distintas especies de *Drosophila*, incluyendo *D. hydei*, *D. repleta* y *D. virilis*, tres especies próximas a *D. buzzatii* y *D. koepferae*. (Kokoza *et al.*, 1992).

4.1.8.3 Análisis molecular de la región XA2a-A2c.

Por todo lo dicho se seleccionó *BR-C* como sonda para realizar la hibridación *in situ* sobre los cromosomas politénicos de *D. koepferae* y para hacer el “screening” sobre la microgenoteca de la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

Se comprobó mediante la hibridación *in situ* que efectivamente una sonda de *BR-C* hibrida sobre esta región, concretamente se obtiene una señal muy clara sobre la banda XA2a (figura 3.5.1.2) que es una de las tres bandas candidatas a contener el factor de inviabilidad.

Sin embargo, como ya se comentó en los resultados (apartado 3.5), no fue posible confirmar los “positivos” inicialmente obtenidos en el “screening” realizado sobre la microgenoteca de la susodicha región con la sonda de *BR-C*.

De cualquier modo, la confirmación definitiva de *BR-C* como un gen de especiación sólo podrá llegar mediante la obtención de machos híbridos w^+ (portadores de la región XA2a-A2c introgresada) cuya viabilidad haya sido rescatada por la inserción de *BR-C* (conespecífico respecto al letal) en la línea germinal de sus madres mediante transformación mediada por elemento P u otro.

Además del “screening” con *BR-C* se realizó otro con ADNc de pupas tempranas (obtenido y cedido amablemente por Manuel Gandarela). El resultado de este “screening” fue también positivo inicialmente, pero tampoco pudo ser confirmado en un segundo intento. De cualquier modo será éste un trabajo cuya realización forma parte ya de otro proyecto de tesis doctoral.

Hay que indicar, además, que hasta hace muy poco todos los intentos de clonar los factores localizados a nivel cromosómico en otras especies como responsables de la inviabilidad híbrida, o capaces de rescatar de la misma, han sido infructuosos (Wu & Palopoli, 1994). Excepción a lo anterior es el caso del clon correspondiente a la región de *Hmr* (Hutter & Karch, 1994), del que, curiosamente, no ha vuelto a aparecer noticia en la literatura sobre el tema, ni ha tenido la repercusión que el caso debiera; todo lo cual hace sospechar que el clon candidato finalmente no era el correspondiente a *Hmr* o bien no ha sido posible realizar el experimento que lo confirme definitivamente como gen de especiación.

Sin embargo, recientemente (Ting *et al.*, 1998) se ha notificado que la región correspondiente al gen de esterilidad híbrida *Odyseus* (*Ods*) contiene un homeobox (*OdsH*) que, aparentemente, ha evolucionado a gran velocidad entre las tres especies gemelas *melanogaster*, *simulans* y *mauritiana*, lo cual podría ser la causa del aislamiento postzigótico observado entre estas especies. No queda claro, de cualquier modo, cuál sería la causa de la selección positiva (la tasa de sustitución nucleotídica observada en los exones del homeobox de las distintas especies es superior a la esperada bajo la hipótesis neutralista) que “dirigió” la evolución de *OdsH*, ni por qué los autores descartan el que las regiones secuenciadas y comparadas no puedan ser en algún caso una duplicación, de modo que se estén comparando genes parálogos que no desarrollan las mismas funciones en sus respectivas especies. Además, en todo caso, la sola introgresión de *Odyseus* no es suficiente para producir esterilidad, sino que han de introgresarse junto con él un número indeterminado de otros factores.

Otro caso reciente es el del molusco abalone (*Haliotis*), en que se describe a nivel molecular un mecanismo de aislamiento prezigótico (Swanson & Vacquier, 1998). Es obvio que estamos entrando en una nueva era de la genética de la especiación, donde la caracterización a nivel molecular de los factores responsables del aislamiento reproductivo deberán permitir combinar los estudios de especiación y evolución molecular en una disciplina coherente, que permita ahondar más en el problema de la especiación.

4.1.9 La regla de Haldane: ¿especificidad o recesividad?.

De lo visto hasta aquí, sabemos que la regla de Haldane podría explicarse en relación a las hormonas morfogenéticas como un reflejo de las diferentes concentraciones de ecdisona halladas en machos y hembras en diferentes etapas del desarrollo (Handler, 1982). Estaríamos de nuevo ante una explicación sexo específica de la regla de Haldane. Sin embargo no parece que ello sea necesario.

Si nos referimos a *BR-C* y *E-74*, la regla de Haldane podría venir explicada porque en el macho falla la interacción entre, por ejemplo, la proteína de *BR-C* de *D. koepferae* y *E-74* de *D. buzzatii*. Sin embargo, en la hembra existiría proteína *BR-C* de *D. buzzatii* que

interaccionará sin problemas con la de *E-74*. Sería ésta una explicación de la regla de Haldane relativa a la base molecular de la dominancia.

Pero mientras no sepamos más, parece más sencillo tratar de abordar el problema en términos de relaciones interalélicas, donde sería la recesividad del factor letal contenido en XA2a-A2c de *D. koepferae* respecto a sus alelos ortólogos en *D. buzzatii*, la que explicaría la inviabilidad exclusiva de los machos híbridos. Si esto fuera así, las hembras híbridas introgresadas con la región XA2a-A2c en homocigosis deberían ser inviables. Como ya se dijo, estas hembras no es posible obtenerlas mediante un diseño de cruces normal puesto que los machos híbridos portadores de cualquier región del cromosoma X introgresada son estériles.

Volviendo a la explicación molecular de la dominancia es tentador retomar una vez más a las hormonas morfogenéticas: En el macho, un mal control de los niveles de hormona debido a la copia de *D. koepferae* provocará la inviabilidad; en la hembra, sin embargo, la copia adecuada del cromosoma X corrige los niveles de hormona. Al hilo de este argumento sobre el adecuado control o no de las dosis de hormona en los tiempos de desarrollo correctos, no debemos olvidar que los machos de *D. koepferae* y *D. buzzatii*, aun siendo especies gemelas, presentan diferentes tiempos de madurez sexual (Ruíz y Naveira, datos no publicados) lo cual es posiblemente reflejo de distintos tiempos de desarrollo. Si esto es así, no sería extraño que, al recombinar ambos programas genéticos, la diferencia en el control de los tiempos de desarrollo desembocara en distorsiones de los pulsos de hormona.

Llegados hasta aquí, no podemos profundizar más en la explicación última de la inviabilidad de estos híbridos, mientras no sean identificados de manera precisa a nivel molecular los factores responsables. Sí podemos tratar de aportar una visión general de lo que, en definitiva, nos parece está ocurriendo en nuestros híbridos y que pensamos no es diferente de otros casos existentes en la bibliografía (Hutter *et al.*, 1990; Khadem & Krimbas, 1991; Sawamura *et al.*, 1993a y b). En última instancia se trata de intentar aportar alguna luz en torno a la pregunta ¿cómo ocurre la especiación? o mejor ¿existe alguna manera concreta en que la especiación ocurra, como parecen sugerir la regla de Haldane y el efecto del X?

4.1.10 Comparación entre las tasas relativas de esterilidad e inviabilidad.

Como vimos (Resultados 3.6), a partir de los datos existentes en la bibliografía sobre cruces entre pares de especies en *Drosophila*, se pudo estimar la tasa relativa de esterilidad respecto a la de inviabilidad híbridas, viéndose que la tasa de esterilidad es 15-20 veces superior a la de inviabilidad.

La cuestión se centraría en torno al número de loci susceptibles de producir la esterilidad en machos híbridos, que parece ser bastante superior (≥ 10 , Wu & Davis, 1993; Carvajal *et al.*, 1996; Hollocher & Wu, 1996) al de los que afectarían a las hembras híbridas o que el número de loci de inviabilidad. Es decir, la tasa de evolución por locus podría ser similar para la esterilidad e inviabilidad. La diferencia radicaría en el número de loci subyacentes a una u otra alteración.

4.2 REGULACIÓN, INTERACCIONES Y ESPECIACIÓN.

La existencia de incompatibilidades bien sea entre dos organismos de una misma especie, dos especies ó dos factores integrados en un proceso cualquiera, conlleva de manera inherente la existencia previa de interacciones entre las partes. La importancia de las interacciones entre genes en organismos con reproducción sexual se manifiesta de modo explícito en la aparición de las barreras de aislamiento reproductivo postzigótico, que implican fenómenos (incompatibilidades) existentes únicamente en los programas genéticos híbridos, pero no en las especies parentales.

Si nos referimos a las relaciones entre genes de distintos loci, podemos suponer que dos o más efectos se añaden uno sobre otro para manifestar un valor final del carácter (por ejemplo de eficacia biológica), donde la aportación de cada factor ha sido independiente del o de los restantes, es decir, donde no hubo interacción entre los factores. Sin embargo, también puede ocurrir que el resultado final no se corresponda al conjunto de las aportaciones individuales, es decir, los factores involucrados no manifiesten independencia unos respecto a otros. En este último caso diremos que hay interacción epistática. Se define epistasis (Hedrick, 1985) como la no independencia entre genes de dos o más loci, en cuanto a sus efectos sobre los valores fenotípicos o de eficacia biológica. Una consecuencia inmediata de la epistasis es pues que el valor de un genotipo para un locus no es independiente de los valores de los genotipos de otros loci. Por ello, cuando hay epistasis, la aportación de un factor al carácter en estudio depende del fondo genético en que este factor se halle. Los modelos sobre los que se contrasta la independencia o no de varios factores en sus efectos sobre el valor final del carácter pueden ser tanto aditivos como multiplicativos (Hedrick, 1985).

4.2.1 Aspectos de importancia evolutiva en la regulación génica.

Se ha argumentado reiteradas veces sobre la importancia de los cambios en la regulación génica en la evolución de los eucariotas (Wilson *et al.*, 1974; Rice, 1998).

En un contexto evolutivo, podemos considerar dos clases fundamentales de genes (Hedrick & McDonald, 1980):

1. Genes regulatorios, definidos como aquellos cuyo papel principal es controlar los compartimentos celulares y los momentos en los que otros genes se expresan.
2. Genes productores o estructurales, aquéllos cuyos productos se involucran directamente en funciones metabólicas o estructurales.

Los modelos de regulación génica son jerárquicos e implican interacciones ADN-ADN, ADN-proteína en la parte alta de la cascada e interacciones proteína-proteína en la expresión final de los fenotipos (aunque ésta puede ocurrir también en la parte alta de la cascada, como posiblemente sea el caso de *BR-C* y *E74*, Fletcher & Thummel, 1995). Al considerar los genes reguladores (en la parte alta de la cascada), obtenemos ejemplos de interacciones génicas poco frecuentes en los genes estructurales. Estas interacciones pueden manifestarse en forma de complejas epistasis a nivel fenotípico (Hedrick & McDonald, 1980).

En algunos casos es posible considerar la epistasis y la pleiotropía como dos caras distintas de la misma moneda, porque si un gen interacciona con otro u otros en una vía de regulación cualquiera, provocando la manifestación de más o menos complejas epistasis, puede ocurrir que otros genes de otras vías interaccionen con el susodicho gen de modo que se relacione con alteraciones en patrones de desarrollo temporales o espaciales bien diferentes (pleiotropía). Este es el caso de genes como *da*, y *sc* (Cline, 1989).

Una importante vía de regulación, que ya hemos mencionado, es la de los genes controlados por la ecdisona, que se hayan involucrados en el proceso de la metamorfosis y del desarrollo del adulto en *Drosophila*. La manera en que esta regulación ocurre es poco conocida. Se sabe de la existencia de receptores de ecdisona (Koelle *et al.*, 1991) y otros factores, que colaboran en la represión o activación de genes. Estos procesos tendrían lugar o bien debido a la existencia de cooperatividad entre moléculas idénticas de estos receptores unidas a múltiples sitios, o a interacciones en las cuales diferentes moléculas de receptor forman heterodímeros (Segraves & Richards, 1990). Como vimos, algunos de los genes que intervienen en los primeros pasos de la cascada activada por la ecdisona son *BR-C*, *E-74* y *E-75*.

En los estudios sobre la evolución de los sistemas de regulación (Cavener, 1992; Karotam & Oakeshott, 1993) se analiza la importancia de las diferencias interespecíficas en interacciones de tipo “trans” (implica distinta cadena de ADN) y “cis” (implica la misma cadena de ADN), considerando que las redes regulatorias se componen de un número limitado de factores que actuarán mediante un mecanismo combinatorio para regular la expresión génica. En híbridos F₁ las interacciones en “cis” nunca se ven alteradas, porque existe una dotación cromosómica completa de cada especie; las interacciones en “trans” se verán o no alteradas en función de las relaciones de dominancia interespecíficas.

La mayoría de los experimentos de transferencias de genes en las especies de *Drosophila* muestran que las diferencias interespecíficas en la expresión génica se deben a elementos actuando en “cis” (prevalece el fenotipo de la especie donadora) (Cavener, 1992), pero debido a lo arriba expuesto estas diferencias no pueden ser determinantes del aislamiento reproductivo. Un menor número de casos aportan evidencias sobre el control en “trans” de estas diferencias interespecíficas. En este caso es importante destacar que los sistemas en los cuales se han demostrado efectos en “trans” son sistemas de respuesta a JH y/o ecdisona (Karotam & Oakeshott, 1993).

Volviendo al caso del par *buzzatii-koepferae*, parece que las diferencias interespecíficas que desembocan en la inviabilidad de los machos híbridos afectan a dos regiones cromosómicas diferentes, que aparentemente interaccionan de modo directo dentro de ambas especies. Obviamente, al situarse en cromosomas diferentes, estas interacciones serán del tipo “trans”, aunque no se excluye que, a mayores, efectos en “cis” tengan también lugar.

Para concluir este apartado sobre los aspectos evolutivos de la regulación génica, recordemos que todo proceso de regulación se entiende como aquél donde interacciones de diverso tipo tienen lugar, existiendo, a su vez, cadenas de estas interacciones que se interrelacionan unas con otras bien mediante elementos comunes (en paralelo), bien de manera secuencial, o de ambas formas a la vez. Por ejemplo, a un nivel básico, siempre será necesario que determinados factores (en “trans”) modifiquen la compactación del ADN (Becker, 1994), haciéndolo accesible de modo que tanto interacciones en “cis” y “trans” de cualquier vía de regulación puedan ocurrir. Debido a esta intrínseca complejidad de los organismos y de los finos (o cuando menos, intrincados) programas genéticos que en ellos

operan, debiera suponerse, por norma, la no independencia en los efectos de los genes que componen las relaciones que constituyen, en última instancia, al propio organismo. Si bien, a veces, modelos simplificados de efectos independientes puedan ser útiles.

4.2.2 Nivel genético: Interacciones y aislamiento reproductivo.

Se definió epistasia como desviación de la independencia en los efectos de cada gen sobre el valor genotípico final para el carácter en estudio. Entendiéndose por valor genotípico el fenotipo promedio de los individuos de ese genotipo en un ambiente determinado.

La existencia de epistasia puede involucrar tanto a genes de efecto mayor como a poligenes o grupos poligénicos, que pueden estar situados en distintos cromosomas (Pontecorvo, 1943; Cabot *et al.*, 1994).

En su origen, el aislamiento reproductivo planteó el problema de cómo podían evolucionar variantes génicas que en los híbridos provocaran esterilidad o inviabilidad. La solución, que ahora parece obvia, llegó de la mano de los sistemas de genes complementarios (Dobzhansky 1937, Muller 1940, 1942). Es decir, los problemas en los híbridos se deben a la existencia de combinaciones de genes en dos o más loci que presentan cierto grado de incompatibilidad. Las combinaciones presentes en las especies parentales son, sin embargo, perfectamente compatibles. El caso de un gen perteneciente a un único locus como responsable del aislamiento reproductivo queda, en general, descartado. Esto es así porque, si A/a es el híbrido inviable o estéril, es virtualmente imposible la fijación de distintos alelos en las especies parentales (A/A y a/a , respectivamente) sin pasar por una fase de polimorfismo transitorio en la que, por definición, los heterocigotos serían inviables o estériles (Dobzhansky 1937, Muller 1942). Una excepción a esta regla serían los mecanismos de especiación cromosómica basados en poliploidías (especiación "cuántica", Ayala 1982), o en reordenaciones que conllevan una reducción de la fecundidad del heterocigoto, tales como translocaciones o fusiones en tándem (White 1982). Tanto en el caso de las autoploidías como en el de las reordenaciones cromosómicas, podría darse la circunstancia de que se produjeran nuevas especies sin apenas divergencia genética. Otra excepción podría ser cuando el carácter que provoca aislamiento reproductivo se hereda maternalmente y los

tamaños eficaces de población son pequeños, como es el caso de los caracoles. De hecho, dejando al margen los mecanismos cromosómicos, especiación via un único gen se ha encontrado sólo en gasterópodos (Orr, 1991).

En general, por lo tanto, el mecanismo genético que provoca aislamiento reproductivo habría de ser epistático (porque depende del contexto genético), e implicar a pares o n -tuplos de genes o factores genéticos.

Nos hemos referido hasta ahora a la manifestación del aislamiento reproductivo. Un problema diferente es cómo evolucionan estas barreras de aislamiento o, si se quiere, estas incompatibilidades. Pueden postularse dos modos generales de evolución de las barreras de aislamiento reproductivo, a saber:

- 1.- Evolución no epistática del aislamiento reproductivo: Aunque los genes susceptibles de provocar aislamiento reproductivo interaccionan con otros, la ausencia de polimorfismos con valor selectivo impide que la variación en un gen afecte a potenciales variantes génicas en otros loci, es decir la evolución asociada a cada locus no depende de otros loci (no ha lugar el efecto epistático). Este es un modo lento de evolución y sería un modelo "Fisheriano".
- 2.- Evolución epistática del aislamiento reproductivo: Corresponde a un modelo "Wrightiano" donde las complejas relaciones entre los genes (pleiotropía, epistasis) y la existencia de polimorfismos, así como la actuación combinada de la selección y la deriva, desembocan en un proceso de evolución más rápido que el modo no epistático antes mencionado.

A continuación centraremos nuestra atención en dos tipos de modelos que abordan de manera diferente el problema del aislamiento reproductivo. El primero de estos dos tipos enfoca el problema desde el punto de vista de la genética cuantitativa, tratando de explicar la aparición de aislamiento reproductivo asociado a un carácter cuantitativo y la disminución de la fitness que este carácter provoca en el híbrido. El segundo tipo de modelos se centra directamente en la incompatibilidad que se manifiesta en el híbrido y en las dos reglas que parecen seguir las barreras de aislamiento reproductivo postzigótico.

4.2.2.1 Modelo de dos loci y dos alelos de Wagner *et al.*

Recientemente se está incrementando el número de trabajos que enfocan el problema de la evolución del aislamiento reproductivo desde la perspectiva cuantitativa (Bryant & Meffert, 1992; Wagner *et al.*, 1994 y Clark & Wang, 1997 entre otros). A continuación expondremos el modelo analizado por Wagner *et al.*, en el cual se supone un carácter cuantitativo sometido a selección estabilizadora (selección a favor del valor medio del carácter). Pero antes hagamos unas consideraciones: si se define un modelo para un carácter, en que varios genes efectúan una contribución aditiva al valor genotípico, y no hay epistasis, es posible que los cambios de pico adaptativo ocurran a una tasa considerable aunque la cantidad de aislamiento reproductivo obtenida por pico sea muy pequeña (Barton 1989a), estimándose una tasa de acumulación del aislamiento reproductivo del orden de la tasa de mutación. Wagner *et al.* se preguntan hasta qué punto esta última afirmación sigue siendo cierta para modelos epistáticos, notando que, en definitiva, la comparación es entre arquitecturas genéticas tipo I (muchos genes con efectos aditivos y sin epistasis) y tipo II (pocos genes con fuertes efectos epistáticos y varios loci modificadores).

El problema, como hacen notar Wagner *et al.*, es que hay muchas maneras de modelar la epistasis, lo que hace que sea difícil generalizar los resultados. Por ello algunos autores (Barton 1989b) concluyen que la tasa de acumulación de aislamiento reproductivo es similar para ambos casos (no epistático y epistático).

El modelo: Se define un modelo epistático de dos loci y dos alelos para un carácter cuantitativo sometido a selección estabilizadora. La intensidad de la epistasis viene indicada por un único parámetro.

Sea $g(x,y) = G$ una función que determina el valor genotípico G , donde x e y se refieren a la contribución de los loci X e Y al valor G del carácter cuantitativo. Se estudian dos casos de esta función: 1) Caso aditivo (lineal, no epistático) y 2) epistático (ligeramente no lineal).

Wagner *et al.* obtienen la siguiente expresión:

$g(x,y) = c' [(x + y - 4) + \beta(xy - 3)]$ donde $c' = \text{constante}$, $x \in \{x_0, x_1, x_2\}$ siendo x_{i+j} el valor del genotipo X_iX_j , e $y \in \{y_0, y_1, y_2\}$ siendo y_{i+j} el valor del genotipo Y_iY_j y β mide la intensidad de la epistasis de modo que en $\beta = 0$, $g(x,y) = c' [(x + y - 4)]$, que es el caso aditivo. Se asignan valores arbitrarios $x_0 = y_0 = 3$; $x_1 = y_1 = 2$; $x_2 = y_2 = 1$.

El aislamiento reproductivo se mide como la selección en contra de los genotipos híbridos. Se considera el genotipo de los híbridos F_1 como el doble heterocigoto $X_0X_1Y_0Y_1$. Bajo el caso no epistático los genotipos $X_0X_0Y_1Y_1$, $X_0X_1Y_0Y_1$ y $X_1X_1Y_0Y_0$ tienen valores idénticos y óptimos. Por el contrario en el caso epistático la fitness media en la F_1 es $1 - s\beta^2$. A lo largo de las generaciones de retrocruzamiento, la recombinación entre los loci interaccionantes incrementa la cantidad de aislamiento reproductivo.

Es obvio pues que, bajo el modelo propuesto, tanto los híbridos F_1 como los retrocruces son menos aptos en el caso epistático que en el no epistático, por lo que podemos decir que para una misma tasa de cambio de pico adaptativo la cantidad de aislamiento reproductivo generada será mayor en el caso epistático. Otra parte del análisis realizado por Wagner *et al.* muestra además que la tasa de cambio de pico adaptativo se ve más afectada también en el caso epistático.

La conclusión final es que el caso epistático predice una mayor tasa de aislamiento reproductivo que el caso no epistático bajo el modelo aditivo analizado por Wagner *et al.*

La arquitectura genética para el carácter en consideración que se desprende del modelo epistático de Wagner *et al.* resulta de dos supuestos:

- 1.- Se asume que el efecto de los genes sobre el fenotipo es mediado previamente por sus efectos independientes en dos caracteres subyacentes (fisiológicos o del desarrollo).
- 2.- Se asume que estas variables subyacentes interaccionan para producir el carácter fenotípico que conlleva la epistasis entre los genes.

Hay a su vez dos diferencias respecto al caso aditivo no epistático considerado, a saber:

- 1.- El genotipo del doble heterocigoto (híbrido entre dos adaptaciones alternativas) no es óptimo bajo el modelo epistático, pero sí lo es en el caso no epistático.

2.- El efecto de las sustituciones génicas sobre los fenotipos óptimos no es simétrico en el caso epistático. En función del genotipo de partida (sobre el que se sustituye), hay un locus mayor y uno menor. El caso extremo es aquél en que la sustitución en el locus mayor es letal, y neutra en el menor.

Este tipo de arquitectura se denomina arquitectura tipo II dependiente de contexto. Esta dependencia de contexto es la mayor diferencia entre los modelos epistáticos discutidos por Barton (Barton, 1989b) y el discutido en Wagner *et al.*

Es interesante destacar que la arquitectura genética que subyace a la inviabilidad híbrida en el par *D. buzzatii-D. koepferae* podría ser de este tipo. El genotipo óptimo del que partimos es *XbY; 4b4b*. El gen mayor sería el ligado al X, puesto que una sustitución en él es letal, siendo el ligado al 4 el gen menor (b es *buzzatii*, X representa XA2a-A2c y 4 4D1-D5). Si partimos del otro genotipo óptimo *XkY; 4k4k* (k es *koepferae*), el ligado al X debería ser un gen menor en una arquitectura dependiente de contexto, como así es, puesto que los machos del tipo *XbY; 4k4k* son viables, mientras que el del 4 debería ser el gen mayor. Sin embargo, hay aquí una asimetría, porque uno de los loci está ligado al X y estamos considerando machos, luego la sustitución equivalente a la ocurrida en el X es *XkY; 4b4b*, que ya sabemos es letal, siendo ahora el ligado al 4 el de efecto mayor.

El modelo epistático analizado por Wagner *et al.* es similar al propuesto por Muller y Dobzhansky, donde se asume que el aislamiento reproductivo se debe inicialmente a unos pocos loci epistáticos.

Se conocen varios casos en que los loci involucrados se comportan como una arquitectura tipo II dependiente de contexto, con relaciones de "fitness" cualitativamente similares al caso $\beta = -4/3$, analizado de manera particular en Wagner *et al.* De especial interés son dos casos en que las bases moleculares subyacentes están bastante bien entendidas.

Caso 1: La génesis de tumores en híbridos entre especies de peces, *Xiphophorus maculatus* y *Xiphophorus helleri* (Anders *et al.*, 1984). Esta forma de inviabilidad híbrida se debe a la interacción entre un oncogen dominante T_u y un gen regulador R (Wittbrodt *et al.*, 1989). La formación de melanoma ocurre siempre que cualquier alelo T_u es separado por recombinación de su correspondiente regulador R . Si se parte del genotipo $T_u T_u R R$, una sustitución en R tiene efecto mayor sobre la viabilidad, mientras que si es en T_u , tiene a lo

sumo efecto menor. Sin embargo, si el genotipo de partida es t_1t_1rr , una sustitución en t_1 tiene efecto mayor, mientras que en r tiene efecto menor.

Caso 2: Otro ejemplo de este tipo de arquitecturas es el ya mencionado síndrome del abdomen alterado de *D. mercatorum* (Carson & Templeton, 1984).

Parece pues que la epistasis que resulta de interacciones entre genes reguladores y genes de respuesta primaria es adecuadamente descrita por el modelo expuesto por Wagner *et al.* o, cuando menos, desemboca en idéntica arquitectura genética que la generada por el modelo.

Debe añadirse aquí que, si bien en el modelo de Wagner *et al.* no se considera el papel del efecto fundador, conviene recordar los trabajos de Goodnight (Goodnight 1987, 1988), donde se muestra cómo, bajo el efecto fundador, la varianza epistática puede transformarse en varianza aditiva en función de la tasa de recombinación, del tamaño de la población segregada y de la reincidencia en el susodicho efecto fundador (pequeños tamaños de población durante varias generaciones) (Bryant & Meffert, 1992).

4.2.2.2 Modelo de las incompatibilidades (Orr 1995).

Partiendo del modelo de especiación de genes complementarios (Dobzhansky 1937, Muller 1942), Orr trata de explorar las consecuencias matemáticas de contemplar el proceso de especiación (cuando menos del aislamiento reproductivo postzigótico) como un simple proceso de acumulación de genes complementarios. La premisa de partida es que la evolución del aislamiento reproductivo postzigótico se puede reducir a la aparición de incompatibilidades entre genes de distintos loci. Estas incompatibilidades son la manifestación de la epistasis existente entre estos genes. No se hace, sin embargo, ninguna suposición sobre el modo de evolución de estas incompatibilidades.

Algunas de las consecuencias que se deducen necesariamente de la mecánica de incompatibilidades analizada por Orr, son:

- 1.- Asimetría en las incompatibilidades. Por ejemplo, sean dos loci con alelos a y b , respectivamente, fijados en la población ancestral. Supóngase que esta población se

subdivide en dos, en una de las cuales el alelo a acaba por ser sustituido por un nuevo alelo, A , mientras que en la otra se produce la sustitución de b por B . Es decir,

$$ab \rightarrow Ab$$

$$ab \rightarrow aB$$

Los híbridos entre las dos poblaciones, Ab/aB , podrían manifestar una incompatibilidad entre A y B , pero no entre a y b .

2.- La cantidad de aislamiento reproductivo se incrementa más rápido que linealmente con respecto al tiempo. Esto es, según se acumulan las sustituciones es más fácil que se genere aislamiento reproductivo.

Hay que notar con respecto al punto (1), que nuevamente estamos ante una arquitectura genética tipo II dependiente de contexto, puesto que, si partimos de Ab , la sustitución alélica de efecto mayor es la de b por B , mientras que si partimos de aB , el efecto mayor estaría asociado a la sustitución de a por A .

4.2.2.3 Modelo de la dominancia de Turelli y Orr (Turelli & Orr, 1995)

Turelli y Orr plantean un modelo para explicar la regla de Haldane y el efecto preponderante del cromosoma X en el aislamiento reproductivo postzigótico. Aquí haremos una pequeña revisión del mismo. En el modelo se asume epistasis aunque no se explicita el efecto de las incompatibilidades sino que simplemente se contabiliza el efecto de una sustitución ocurrida entre dos poblaciones divergentes. Este efecto de una sustitución en el locus B se valora como una cierta disminución en la eficacia biológica del híbrido F_1 . El modelo se centra en las incompatibilidades asociadas a los loci ligados al cromosoma X. De este modo, en las hembras, la disminución de la "fitness" por sustitución en el híbrido se mide como bh , donde h implica el grado de dominancia del efecto deletéreo b . En los machos la disminución de la "fitness" o eficacia biológica vale b .

Para el caso de la inviabilidad se calcula la declinación de la "fitness" del híbrido F_1 como:

$$w(X_1YA_1A_2) = V(\sum^{ni} b_i(k) + v)$$

$$w(X_1X_2A_1A_2) = V(\sum^{n_1} h_1(k)b_1(k) + \sum^{n_2} h_2(k)b_2(k) + v).$$

donde:

$b_i(k)$: contribución a la disminución de la "fitness" en el híbrido del alelo $B_i(k)$ ligado al cromosoma X de la especie i en el locus k .

$h_i(k)$: el grado de dominancia del efecto deletéreo $b_i(k)$ en un contexto genético híbrido.

n_1 : número de loci involucrados en la especie 1.

n_2 : número de loci involucrados en la especie 2.

v : contribución de la interacción autosoma-autosoma a la inviabilidad híbrida.

Esta función $V(x)$ de declinación de la "fitness" toma valores en una escala aditiva, dándose el caso de $V(x) = 0$ (inviabilidad híbrida) cuando $x \geq C$. Si denotamos S_f como el valor de la posición de las hembras en esta escala aditiva de disminución de la "fitness" y S_m la posición de los machos de la especie i , tendremos que si los machos se hacen antes inviables, entonces $S_f < C \leq S_m$. Asumiendo que h y b siguen la misma distribución y que $E(n_1) = E(n_2) = E(n)$, la regla de Haldane se cumplirá en promedio si $2 [E(b) E(h) + \text{cov}(b,h)] < E(b)$. De aquí se deducen dos condiciones necesarias y suficientes para la ocurrencia de la regla de Haldane en cuanto a la inviabilidad:

i) $E(h) \leq 1/2$ (recesividad parcial en el efecto de las sustituciones).

ii) $\text{Cov}(b,h) \leq 0$ (a mayor efecto deletéreo, mayor o igual recesividad).

Para el caso de la esterilidad se utiliza esencialmente el mismo modelo, pero asumiendo que son diferentes los loci que afectan a la esterilidad en machos y en hembras. Las conclusiones en el caso de la esterilidad son las mismas que para la inviabilidad, con el añadido de que, si los factores genéticos de esterilidad en machos evolucionan más rápido que en hembras, esto favorece la regla de Haldane en los casos en que los machos son heterocigotos, y se opone a la regla en el caso contrario.

¿Qué nos dice el modelo de Turelli y Orr en cuanto al modo de evolución del aislamiento reproductivo?

En este modelo, si bien se considera la aportación de cada locus como un efecto epistático que, como vimos, es el modo necesario en que el aislamiento reproductivo se manifiesta, finalmente la aportación de cada sustitución a la función de detrimento de la "fitness" es independiente de la aportación de otros loci, porque esta función es simplemente la suma de las aportaciones individuales. Es decir, se asume que no hay epistasis en el proceso de acumulación de las diferencias, que, finalmente, desembocan en el aislamiento reproductivo, porque la ocurrencia de una sustitución no afecta en nada a la ocurrencia de otras sustituciones.

El modelo de la dominancia es pues, un modelo no epistático de la evolución del aislamiento reproductivo, para cualquier número n de interacciones, donde cada interacción se representa por una sustitución interespecífica en un locus.

En el modelo de Wagner *et al.* antes expuesto, por el contrario, la distinción entre el caso epistático y el no epistático sí que refleja la dicotomía entre los dos posibles tipos de evolución, epistática y no epistática, respectivamente.

Estos modelos tratan pues dos aspectos diferentes de la base genética del aislamiento reproductivo postzigótico:

- 1.- El modelo de la dominancia muestra cómo la recesividad *per se* puede explicar la regla de Haldane en el caso de la inviabilidad, mientras que en el caso de la esterilidad para explicar esta regla sería preciso presumir tanto la recesividad como las diferentes tasas de evolución de los factores de esterilidad en machos y hembras.
- 2.- El modelo de Wagner muestra cómo el aislamiento reproductivo puede evolucionar más fácilmente si la epistasis está involucrada en el proceso que si no lo está.

Llegados a este punto vale la pena recordar, brevemente, la estima hecha de la tasa de evolución de esterilidad respecto a la inviabilidad híbrida en *Drosophila* (apartado 4.1.10). Se estimó que era 15-20 veces superior la tasa de esterilidad respecto a la de inviabilidad, y que estos resultados deberían referirse al número de loci involucrados en la esterilidad de machos respecto al resto de casos. Pero como hemos descrito en los párrafos anteriores, no se trata de loci individuales sino de interacciones entre pares o n -tuplos de loci. Diríamos entonces

que el número de interacciones susceptibles de fallar en los híbridos es 15-20 veces superior para la esterilidad en machos que en el resto de los casos (esterilidad en hembras, inviabilidad en machos y hembras). Es decir ¡hay 15-20 veces más interacciones que afectan a la línea germinal de los machos!. Esto deberá estar relacionado con algunas de las particularidades de la espermatogénesis, como el control de la transcripción durante la meiosis (Fuller, 1993) o el efecto esterilizador de las traslocaciones X-autosomas, probablemente relacionadas con la temprana inactivación del X durante la fase de espermatocito primario (Lyfschytz & Lyndsley, 1972).

Es muy posible entonces que el mayor número de interacciones asociado a la línea germinal de machos no se refiera a genes de efecto mayor, sino más bien a poligenes o incluso a alguna característica intrínseca del ADN o de la cromatina, de modo que las interacciones no necesariamente estarían asociadas a posiciones o loci concretos, sino a determinados tipos de regiones o a tamaños umbrales de ADN híbrido, como parece ocurrir en los híbridos entre *D. simulans* y *D. mauritiana* (Maside *et al.*, 1998).

Para finalizar, un breve apunte en cuanto a la importancia de la epistasis en la evolución del aislamiento reproductivo (y por tanto de la especiación). A pesar de las dificultades técnicas que el planteamiento de la epistasis conlleva, a lo que habría que añadir la falta de consenso en cuanto al propio concepto de epistasis que diversos autores utilizan (ver Hedrick, 1985; Nei, 1987; Narain, 1990), merece la pena el esfuerzo por analizar su papel en los mecanismos de especiación. En palabras de Lewontin, que, aunque antiguas, no han perdido vigencia: "... context and interaction are not simply second-order effects to be superimposed on a primary monadic analysis. Context and interaction are of the essence." (Lewontin, 1974, pag. 318).

5. CONCLUSIONES



5.1.- En el paso de la generación F₁ a la R₁ en los híbridos entre *D. koepferae* y *D. buzzatii*, tiene lugar un incremento de la varianza y disminución de la media para el carácter viabilidad de machos híbridos. Esto indica la posible ruptura por recombinación de al menos un complejo génico coadaptado.

5.2.- La frecuencia de recombinación entre el locus *w* y el factor de inviabilidad denominado *hmi-1*, ambos de *D. koepferae* e introgresados en un fondo genético de *D. buzzatii* San Luis-101 (buzSL-101), es de 4 unidades de mapa.

5.3.- El factor de inviabilidad *hmi-1* se localiza mediante la asinapsis de cromosomas politénicos híbridos en la región XA2a-A2c de *D. koepferae*.

5.4.- Existen regiones autosómicas de *D. koepferae* que al ser cointrogresadas con la región XA2a-A2c permiten recuperar la viabilidad de los machos híbridos.

5.5.- La región 4D1-D5 de *D. koepferae* es necesaria para la recuperación de la viabilidad de los machos híbridos portadores de la región XA2a-A2c introgresada en un fondo genético de buzSL-101.

5.6.- La región 4D1-D5 de *D. koepferae* introgresada en homocigosis en *D. buzzatii* no es letal, incluso en ausencia de XA2a-A2c de *D. koepferae*. Es decir, hay asimetría en las relaciones entre ambos factores de *D. koepferae*. Sin embargo, esta misma región en homocigosis provoca un defecto parcial de hembras y diversas alteraciones morfológicas en machos y hembras de *D. buzzatii*.

5.7.- Existe en buzSL-101 al menos un factor también necesario para la recuperación de los machos híbridos XA2a-A2c. Esto se pone de manifiesto por la variabilidad hallada en buzSL-101 para el efecto recuperador de la región 4D1-D5 de *D. koepferae*. Este factor será ortólogo o no respecto al localizado en *D. koepferae*. Siendo el supuesto más sencillo el que

sí lo sea. Como conclusión se postula la existencia de modificadores que permiten la letalidad, dominantes y recesivos respecto al efecto supresor de la letalidad de la región 4D1-D5 de *D. koepferae*.

5.8.- La penetrancia del efecto letal de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* introgresada en buzSL-101 es completa. Se detecta, sin embargo, variabilidad para este mismo efecto letal en distintas cepas de *D. buzzatii*.

5.9.- Del conjunto de diez cepas de *D. buzzatii* analizadas, la penetrancia del efecto letal fue incompleta en algunas líneas de los cruces con las siguientes tres cepas:

- *D. buzzatii* San Luis-inv4s (buzSL-inv4s) (origen: Argentina).
- *D. buzzatii* Dean Funes (buzDF) (origen: Argentina).
- *D. buzzatii* Mazarrón (buzM) (origen: España).

5.10.- En la cepa *D. buzzatii* San Luis-5 (buzSL-5) (origen: Argentina) la penetrancia del efecto letal fue incompleta en todas las líneas de las dos tandas de cruces realizadas. Se postula pues un efecto supresor de la letalidad fijado en esta cepa.

5.11.- De entre dos clases de modelos planteados (epistático o no), es el caso epistático el que puede explicar las diferentes frecuencias relacionadas con la inviabilidad de machos híbridos en el fondo genético de buzSL-5. A su vez, dentro del caso epistático, es una clase de hipótesis consistente en N grupos de ligamiento (uno por cromosoma) que interaccionan de n en n ($N > n$) la que explica mejor los datos obtenidos.

5.12.- Se hallaron fundamentalmente tres fenotipos diferentes asociados al momento del desarrollo en que la inviabilidad híbrida estudiada ocurre. A saber:

- “bubble prepupa” o prepupa.
- adulto de ojos amarillos, pigmentación incompleta.

- expansión del ptilinum.

Estos estadios se corresponden respectivamente a los índices 1-2, 4 y 5 definidos para los mutantes de *BR-C*.

5.13.- Se obtuvo una microgenoteca de la región XA2a-A2c y quizás alguna banda más de la región A2, que corresponde a un total de 7 bandas, como máximo, de cromosoma politénico. El número de clones obtenido fue de 1000, siendo el tamaño promedio esperado de inserto de 3-7 kb. Todo ello son condiciones suficientes para que cada gen incluido en la región XA2a -A2c esté representado al menos una vez en la microgenoteca.

5.14.- El gen *sc* se localizó por hibridación *in situ* en la banda XB3a de los cromosomas politénicos *D. koepferae*.

5.15.- El gen *Sxl* se localizó por hibridación *in situ* en la banda XC3e de los cromosomas politénicos de *D. koepferae*.

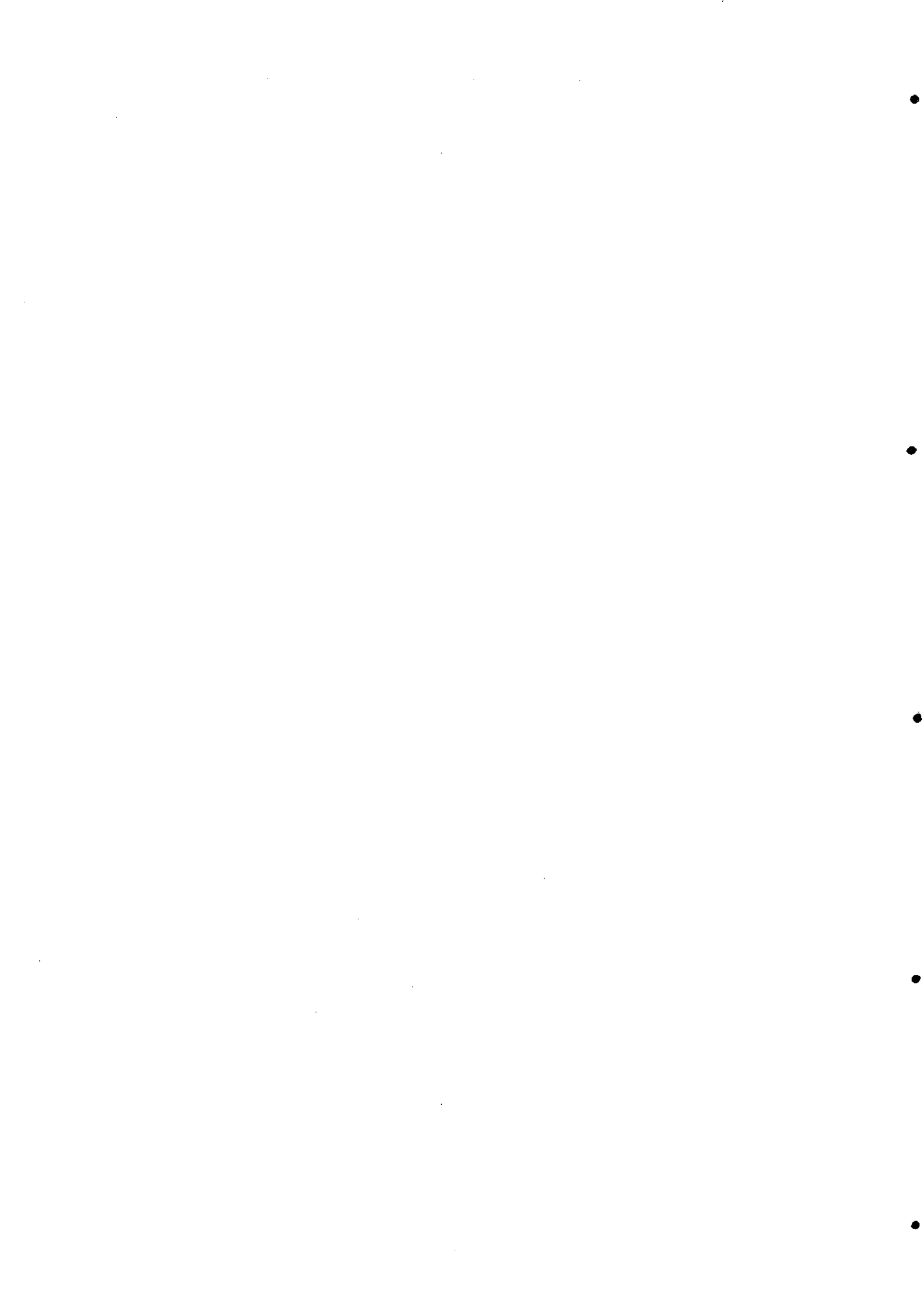
5.16.- El gen *BR-C* se localizó por hibridación *in situ* en diferentes posiciones a lo largo de la región XA1a-A2e de los cromosomas politénicos de *D. koepferae*, lo cual coincide con lo observado para otras especies de *Drosophila* próximas a *D. koepferae*.

5.17.- No fue posible confirmar el rescate de clones de la microgenoteca de la región XA2a-A2c de *D. koepferae* utilizando como sonda la región "core" de *BR-C*.

5.18.- El número de interacciones susceptibles de fallar en híbridos de *Drosophila* parece ser 15-20 veces superior en la línea germinal de machos que en el resto de casos (línea germinal de hembras, línea somática de machos y hembras).



6. BIBLIOGRAFÍA



- Ahearn JN & Templeton AR, 1989. Interspecific hybrids of *Drosophila heteroneura* and *D.silvestris* in courtship success. *Evolution* 43: 347-361.
- Anders F, Schartl M, Barkenow A & Anders A, 1984. *Xiphophorus* as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 42: 191-275.
- Andres AJ & Thummel CS, 1992. Hormones, puffs and flies: The molecular control of metamorphosis by ecdysone. *Trends. Genet.*: 132-138.
- Andres AJ, Fletcher JC, Karim FD & Thummel CS, 1993. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev. Biol.* 160: 388-404.
- Ashburner M, 1989. *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashburner M, 1990. Puffs, genes and hormones revisited. *Cell* 61: 1-3.
- Ayala FJ, 1982. Gradualism versus punctualism in speciation: reproductive isolation, morphology, genetics. En: *Mechanisms of Speciation*, (C. Barigozzi, ed.). New York: Liss; 51-66.
- Baimai V, Sene MM & Pereira MAQR, 1983. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica* 60: 81-92.
- Bainbridge SP & Bownes M, 1981. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. exp. Morph.* 66: 57-80.
- Barbadilla A & Naveira HF, 1988. The estimation of parental genotypes by the analysis of a fixed number of their offspring. *Genetics* 119: 465-472.
- Barbadilla A, Ruiz A, Santos M & Fontdevila A, 1994. Mating pattern and fitness-component analysis associated with inversion polymorphism in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 48: 767-780.
- Barton NH, 1989a. The divergence of a polygenic system subject to stabilizing selection, mutation and drift. *Genet. Res.* 54: 59-77.
- Barton NH, 1989b. Founder effect speciation. En: *Speciation and Its Consequences*, (D. Ott and J.A. Endler, eds.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc; 229-256.

- Barton NH & Charlesworth B, 1984. Genetic revolutions, founder effects and speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 133-164.
- Barton NH & Hewitt GM, 1981. The genetic basis of hybrid inviability in the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity* 47: 367-383.
- Becker PB, 1994. The establishment of active promoters in chromatin. *Bioessays* 16: 541-547.
- Bhadra U & Chatterjee RN, 1986. A method of polytene chromosome preparation of salivary gland of *Drosophila* for in situ transcription and in situ hybridization technique. *DIS.* 63: 140.
- Bock IR, 1984. Interspecific hybridization in the genus *Drosophila*. *Evol. Biol.* 18: 41-70.
- Bopp D, Calhoun G, Horabin JI, Samuels M & Schedl P, 1996. Sex-specific control of *Sex-lethal* is a conserved mechanism for sex determination in the genus *Drosophila*. *Development* 122: 971-982.
- Bouchard LB & Wilson TG, 1987. Effects of sublethal doses of methoprene on reproduction and longevity of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 317-321.
- Bouzada JA, Gandarela MR & Valadé E, 1996. Molecular evolution of regulatory genes of development in *Drosophila*: The *daughterless* gene. *Int. J. Dev. Biol. Supplement*: 87-88.
- Bridges CB, 1921. Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54: 252-254.
- Bryant EH & Meffert LM, 1992. The effect of serial founder-flush cycles on quantitative genetic variation in the house fly. *Heredity* 70: 122-129.
- Bryant PJ & Sang HJ, 1968. *Drosophila*: Lethal rearrangements of metamorphosis and modifications of gene expression caused by Juvenile Hormone mimics. *Nature* 220: 393-394.
- Butlin RK, 1987. Speciation by reinforcement. *Trends Ecol. Evol.* 2: 8-13.
- Butlin RK, 1989. Reinforcement of premating isolation. In: *Speciation and Its Consequences*, (D. Ott and J.A. Endler, eds.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc; 158-179.

- Cabot EL, Davis AW, Johnson NA & Wu C-I, 1994. Genetics of the reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: Complex epistasis underlying hybrid male sterility. *Genetics* 137: 175-189.
- Cabrera AL, 1958. La vegetación de la puna argentina. *Rev. Invest. Agric. (Buenos Aires)* 11: 317-412.
- Cameron RA, Walkup TS, Rood J, Moore J & Davidson EH, 1996. Specific in vitro interaction between recombinant *Strongylocentrotus purpuratus* binding and a recombinant 45A fragment of the putative binding receptor. *Dev. Biol.* 180: 348-352.
- Cariou ML, 1987. Biochemical phylogeny of the eight species in the *Drosophila melanogaster* subgroup, including *D. sechellia* and *D. orena*. *Genet. Res.* 50: 181-185.
- Carracedo MC, Asenjo A & Casares P, 1998. Inheritance mode of *Drosophila simulans* female mating propensity with *D. melanogaster* males. *J. Hered.* 89: 101-104.
- Carson HL, 1968. The population flush and its genetic consequences. En: *Population Biology and Evolution*, (RC. Lewontin, ed.). New York: Siracuse University Press; 123-137.
- Carson HL, 1975. The genetics of speciation at the diploid level. *Am. Nat.* 109: 83-92.
- Carson HL, 1982. Speciation as a major reorganization of polygenic balances. En: *Mechanisms of Speciation*, (C. Barigozzi, ed.). New York: Liss; 411-433.
- Carson HL & Templeton A R, 1984. Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: The founding of new populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 97-131.
- Carvajal AR, Gandarela MR & Naveira HF, 1996. A three locus system of interspecific incompatibility underlies male inviability in hybrids between *D. buzzatii* and *D. koepferae*. *Genética* 98: 1-19.
- Cavener DR, 1992. Transgenic animal studies on the evolution of genetic regulatory circuitries. *Bioessays* 14: 237-244.
- Charlesworth B, Coyne JA & Barton NH, 1987. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Am. Nat.* 130: 113-146.
- Charlesworth B, Lande R & Slatkin M, 1982. A neodarwinian commentary on macroevolution. *Evolution* 36: 474-498.

- Chihara CJ, Petri WH, Fristrom JW & King DS, 1972. The assay of Ecdysones and Juvenile Hormones on *Drosophila* imaginal disks in vitro. *J. Insect. Physiol.* 18: 1115-1123.
- Clark AG & Wang L, 1997. Epistasis in measured genotypes: *Drosophila* P-element insertions. *Genetics* 147: 157-163.
- Cline TW, 1978. Two closely linked mutations in *D. melanogaster* that are lethal to opposite sexes and interact with daughterless. *Genetics* 90: 683-698.
- Cline TW, 1989. The affairs of *daughterless* and the promiscuity of developmental regulators. *Cell* 59: 231-234.
- Cline TW, 1993. The *Drosophila* sex determination signal. How do flies count to two?. *Trends Genet.* 9: 385-390.
- Coyne JA, 1983. Genetic basis of differences in genital morphology among three sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 37: 1101-1118.
- Coyne JA, 1985a. Genetic studies of three sibling species of *Drosophila* with relationship to theories of speciation. *Genet. Res.* 46: 169-192.
- Coyne JA, 1985b. The genetic basis of Haldane's rule. *Nature* 314: 736-738.
- Coyne JA, 1989. Genetics of sexual isolation between two sibling species, *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5464-5468.
- Coyne JA, 1992. Genetics and speciation. *Nature* 355: 511-515.
- Coyne JA, 1994. Ernst Mayr and the origin of species. *Evolution* 48: 19-30.
- Coyne JA, 1996. Genetics of differences in pheromonal hydrocarbons between *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 143: 353-364.
- Coyne JA & Charlesworth, 1989. Genetic analysis of X-linked sterility in hybrids between three sibling species of *Drosophila*. *Heredity* 62: 97-106.
- Coyne JA & Kreitman M, 1986. Evolutionary genetics of the two sibling species, *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Evolution* 40: 673-691.
- Coyne JA & Orr HA, 1989a. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43: 362-381.
- Coyne JA & Orr HA, 1989b. Two rules of speciation. En: *Speciation and Its Consequences*, (D. Ott and J.A. Endler, eds.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc; 180-207.

- Coyne JA, Crittenden AP & Mah K, 1994. Genetics of a pheromonal difference contributing to reproductive isolation in *Drosophila*. *Science* 265: 1461-1464.
- Coyne JA, Rux J & David JR, 1991. Genetics of morphological differences and hybrid sterility between *Drosophila sechellia* and its relatives. *Genet. Res.* 57: 113-122.
- Cuadras CM, 1990. Cadenas de Markov. En: Problemas de Probabilidades y Estadística Vol. 1. Barcelona: Promociones y Publicaciones Universitarias S.A; 339-371.
- Darwin Ch, 1859. El Origen de las Especies, ed. española. Barcelona: Ediciones del Serbal S.A.
- Davis AW & Wu C-I, 1996. The broom of the sorcerer's apprentice: The fine structure of a chromosomal region causing reproductive isolation between two sibling species of *Drosophila*. *Genetics* 143: 1287-1298.
- Davis AW, Noonburg EG & Wu C-I, 1994. Evidence for complex genic interactions between conspecific chromosomes underlying hybrid female sterility in the *Drosophila simulans* clade. *Genetics* 137: 191-199.
- de Frutos R, Kimura K & Kenneth P, 1990. In situ hybridization of *Drosophila* polytene chromosomes with digoxigenin-dUTP labeled probes. *Method Molec. Cell. Biol.* 2: 32-36.
- Dibello PR, Withers DA, Bayer CA, Fristrom JW & Guild GM, 1991. The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* 129: 385-397.
- Dobzhansky Th, 1936. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics* 121: 113-135.
- Dobzhansky Th, 1937. *Genetics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Dobzhansky Th, 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat.* 74: 312-321.
- Dobzhansky Th, 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. New York: Columbia University Press.

- Dover G, 1992. Observing development through evolutionary eyes: A practical approach. *Bioessays* 14: 281-287.
- Dover G, 1997. There's more to life than selection and neutrality. *Bioessays* 19: 91-93.
- Ehrman L & Powell JR, 1982. The *Drosophila willistoni* species group. En: *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3b, (M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson, Jr., eds.). London: Academic Press; 193-220
- Endler JA, 1998. The place of hybridization in evolution. *Evolution* 52: 640-644.
- Erickson JW & Cline TW, 1998. Key aspects of the primary sex determination mechanism are conserved across the genus *Drosophila*. *Development* 125: 3259-3268.
- Eugenev MS, 1976. The cytogenetic study of crossing over in interspecific hybrids between *Drosophila virilis* and *D. texana*. *Genetics* 83: 355-360.
- Fisher RA, 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Oxford University Press.
- Fletcher JC & Thummel CS, 1995. The Ecdysone-inducible *Broad-Complex* and *E74* Early genes interact to regulate target gene transcription and *Drosophila* metamorphosis. *Genetics* 141: 1025-1035.
- Fontdevila A, Pla C, Hasson E, Wasserman M, Sánchez A, Naveira H & Ruiz A, 1988. *Drosophila koepferae*: A new member of the *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81: 380-385.
- Fontdevila A, Ruiz A, Ocaña J & Alonso G, 1982. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. II. How much has chromosomal polymorphism changed in colonization?. *Evolution* 36: 843-851.
- Frank SA, 1991. Divergence of meiotic drive suppression systems as an explanation for sex-biased hybrid sterility and inviability. *Evolution* 45: 262-267.
- Fristrom JW, Alexander S, Brown E, Doctor J, Fechtal K, Fristrom D, Krimbrell D, King D & Wolfgang W, 1986. Ecdysone regulation of cuticle protein gene expression in *Drosophila*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 119-132.
- Fuller M, 1993. Spermatogenesis. En: *Development of Drosophila* (Martinez Arias & M. Bate, eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Gandarela MR, Bouzada JA & Valadé E, 1996. Molecular evolution of regulatory genes of development in *Drosophila*: The *scute* gene. Int. J. Dev. Biol. Supplement: 89-90.
- García PA, 1992. Estadística Aplicada: Conceptos Básicos. Madrid: UNED.
- Goodnight CJ, 1987. On the effect of founder events on epistatic genetic variance. Evolution 41: 80-91.
- Goodnight CJ, 1988. Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance. Evolution 42: 441-454.
- Haldane JBS, 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrids animals. J. Genet. 12: 101-109.
- Haldane JBS, 1932. The Causes of Evolution. New York: Harper.
- Haldane JBS, 1937. The effect of variation on fitness. Am. Nat. 71: 337-349.
- Handler AM, 1982. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 93: 73-82.
- Hartl DL & Clark AG, 1997. Principles of Population Genetics. Sunderland, Mass: Sinauer Associates Inc.
- Hasson E, Naveira HF & Fontdevila A, 1992. The breeding sites of Argentinian cactophilic species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). Revista Chilena de Historia Natural (Chile) 65: 319-326.
- Hedrick PW, 1985. Genetics of Populations. Boston: Jones and Bartlett publishers, Inc.
- Hedrick PW & McDonald JF, 1980. Regulatory gene adaptation: an evolutionary model. Heredity 45: 83-97.
- Henning W, 1966. Phylogenetic Systematics. Urbana: University of Illinois Press.
- Henning W, 1977. Gene interactions in germ cell differentiation of *Drosophila*. En: Advances in Enzyme Regulation, vol. 15 (G. Weber, ed.). Oxford: Pergamon; 363-371.
- Hill RJ & Whytock B, 1993. Cytological structure of the native polytene salivary gland nucleus of *Drosophila melanogaster*: A microsurgical analysis. Chromosoma 102: 446-456.

- Hollocher H & Wu C-I, 1996. The genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: X vs. autosomal effects and male vs. female effects. *Genetics* 143: 1243-1255.
- Holm S, 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6: 65-70.
- Howard DJ & Berlocher SH, 1998. *Endless Forms. Species and Speciation*: Oxford University Press.
- Huijser P, Henning W & Dijkhof R, 1987. poly(dC-dA/dG-dT) repeats in the *Drosophila* genome: a key function for dosage compensation and position effects?. *Chromosoma* 95: 209-215.
- Hurst LD & Pomiankowski A, 1991. Causes of sex ratio bias may account for unisexuality in hybrids: A new explanation of Haldane's rule and related phenomena. *Genetics* 128: 841-858.
- Hutter P & Ashburner M, 1987. Genetic rescue of inviable hybrids between *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Nature* 327: 331-333.
- Hutter P & Karch F, 1994. Molecular analysis of a candidate gene for the reproductive isolation between sibling species of *Drosophila*. *Experientia* 50: 749-762.
- Hutter P, Roote J & Ashburner M, 1990. A genetic basis for the inviability of hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Genetics* 124: 909-920.
- Huxley JS, 1942. *Evolution: The Modern Synthesis*. London: Allen & Unwin.
- Jablonka E & Lamb MJ, 1989. The inheritance of acquired epigenetic variations. *J. Theor. Biol.* 139: 69-83.
- Jablonka E & Lamb MJ, 1991. Carta en respuesta a Coyne (1992). *Nature* 356: 752.
- Jablonka E & Lamb MJ, 1998. Epigenetic inheritance in evolution. *J. Evol. Biol.* 11: 159-183.
- Jenkins TM, Babcock CS, Geiser DM & Anderson WW, 1996. Cytoplasmic incompatibility and mating preference in colombian *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 142: 189-194.

- Johnson NA, 1998. Postzygotic reproductive isolation: Epigenetics for an epiphenomenon?. *J. Evol. Biol.* 11: 207-212.
- Johnson NA, Perez DE, Cabot EL, Hollocher H & Wu C-I, 1992. A test of reciprocal X-Y interactions as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Nature* 358: 751-753.
- Karotam J & Oakeshott JG, 1993. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity* 71: 41-50.
- Kauffman S, 1970. Comportamiento de redes genéticas aleatoriamente construidas. En: *Hacia una Biología Teórica*. Ed. en castellano (1976), Madrid: Alianza Editorial S.A; 439-473.
- Kauffman S, 1993. *The Origins of Order*. Oxford: Oxford University Press.
- Kelly JK & Noor MAF, 1996. Speciation by reinforcement: A model derived from studies of *Drosophila*. *Genetics* 143: 1485-1497.
- Khadem M & Krimbas CB, 1991. Studies of the species barrier between *Drosophila madeirensis* and *Drosophila subobscura*: II. Genetic analysis of developmental incompatibilities in hybrids. *Hereditas* 114: 189-195.
- Khadem M & Krimbas CB, 1993. Studies of the species barrier between *Drosophila subobscura* and *D. madeirensis*. III. How universal are the rules of speciation?. *Heredity* 70: 353-361.
- Kimura M, 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kiss I, Beaton AH, Tardiff J, Fristrom D & Fristrom JW, 1988. Interactions and developmental effects of mutations in the *Broad-Complex* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 247-259.
- Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P & Hogness D, 1991. The *Drosophila EcR* gene encodes an Ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67: 59-.
- Kokoza EB, Belyaeva ES & Zhimulev JF, 1992. Localization of genes *ecs*, *dor* and *swi* in eight *Drosophila* species. *Genetics* 87: 79-85.

- Lachaise D, David JR, Lemeunier F, Tsacas L & Ashburner M, 1986. The reproductive relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana*, *D. simulans* and *D. melanogaster* from the Afrotropical region. *Evolution* 40: 262-271.
- Lakovaara S & Saura A, 1982. Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group. En: *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3b, (M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N Thompson, Jr., eds.). London: Academic Press; 2-49.
- Lande R, 1980. Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *Am. Nat.* 116: 463-479.
- Larson JH, 1990. *Introducción a la Teoría de Probabilidades e Inferencia Estadística*. México, D.F.: Limusa S.A.
- Lewontin RC, 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press.
- Lifschytz E & Lindsley DL, 1972. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *P.Natl. Acad. Sci. USA* 69: 182-186.
- Long AD, Mullaney SL, Mackay TFC & Longley CH, 1996. Genetic interactions between naturally occurring alleles at quantitative trait loci and mutant alleles at candidate loci affecting bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1497-1510.
- Lumme J & Heikkinen E, 1990. Viability of first and second generation hybrids of *Drosophila virilis* and *Drosophila lummei*. *Heredity* 65: 435-447.
- Lyell, C. 1835. *Principles of Geology*. 4th Ed. Londres: Murray.
- Majerus M, Amos W & Hurst G, 1996. *Evolution the Four Billion War*. Harlow-Essex: Addison Wesley Longman Limited.
- Marín I, Ruiz A, Plà C & Fontdevila A, 1993. Reproductive relationships among ten species of the *Drosophila repleta* group from South America and the West Indies. *Evolution* 47: 1616-1624.
- Maside XR, 1996. Base genética de la esterilidad en híbridos entre dos especies del complejo *melanogaster*: *Drosophila simulans* y *Drosophila mauritiana*. Tesis Doctoral. Universidad da Coruña.

- Maside XR & Naveira HF, 1996a. On the difficulties of discriminating between major and minor hybrid male sterility factors in *Drosophila* by examining the segregation ratio of sterile and fertile sons in backcrossing experiments. *Heredity* 77: 433-438.
- Maside XR & Naveira HF, 1996b. A polygenic basis of hybrid sterility may give rise to spurious localizations of major sterility factors. *Heredity* 77: 488-492.
- Maside XR, Barral JP & Naveira HF, 1998. Hidden effects of X chromosome introgressions on spermatogenesis in *Drosophila simulans* × *D. mauritiana* hybrids unveiled by interactions among minor genetic factors. *Genetics* 150: 745-754.
- Mather WB, 1957. Genetic relationships of four *Drosophila* species from Australia. Univ. Texas Publ. 5721: 221-225.
- Matsuda Y, Hirobe T & Chapman VM, 1991. Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *PNAS* 88: 4850-4854.
- Maturana M & Varela F, 1980. *Autopoiesis and Cognition*. Holanda: D. Reidel.
- Mayr E, 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Nat.* 74: 249-278.
- Mayr E, 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Mayr E, 1954. Change of genetic environment and evolution. En: *Evolution as a Process*, (J.S. Huxley, A.C. Hardy and E.B. Ford, eds.). London: Allen & Unwin; 156-180.
- Mayr E, 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap, Cambridge, Mass.
- Mayr E, 1982. Processes of speciation in animals. En: *Mechanisms of Speciation in Animals*, (C. Barigozzi, ed.). New York: Liss; 1-19.
- Metz EC & Palumbi SR, 1996. Positive selection and sequence rearrangements generate extensive polymorphism in the gamete recognition protein binding. *Mol. Biol. Evol.* 13: 397-406.
- Mitrofanov VG & Sidorova NV, 1981. Genetics of the sex ratio anomaly in *Drosophila* hybrids of the *virilis* group. *Theor. Appl. Genet.* 59: 17-22.
- Monod J, 1981. *El Azar y la Necesidad*. Barcelona: Tusquets editores.
- Morello J, 1958. *La provincia fitogeográfica del Monte Tucumán, Argentina*: Universidad Nacional del Tucumán. Instituto "Miguel Lillo".

- Muller HJ, 1940. Bearing of the *Drosophila* work on systematics. En: The New Systematics, (J. Huxley, ed.). Oxford: Clarence Press; 185-268.
- Muller HJ, 1942. Isolating mechanisms, evolution and temperature. Biol. Symposia 6: 71-125.
- Muller HJ, 1950. Our load of mutations. Am. J. Hum. Genet. 2: 111-176.
- Narain P, 1990. Statistical Genetics. New Delhi: Wiley Eastern Limited.
- Naveira HF, 1985. Base genética de las barreras de aislamiento reproductivo en el cluster *buzzatii* de *Drosophila*. Tesis Doctoral. Univ. Autónoma de Barcelona.
- Naveira HF & Fontdevila A, 1991a. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXI. Cumulative action of multiple sterility factors on spermatogenesis in hybrids of *D. buzzatii* and *D. koepferae*. Heredity 67: 57-72.
- Naveira HF & Fontdevila A, 1991b. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXII. Chromosomal and genic sterility in male hybrids of *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. Heredity 66: 233-239.
- Naveira HF, Pla C, & Fontdevila A, 1986. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* XI. A new method for cytogenetic localization based on asynapsis of polytene chromosomes in interspecific hybrids of *Drosophila*. Genética 71: 199-212.
- Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.
- Noor MA, 1995. Speciation driven by natural selection in *Drosophila*. Nature 375: 674-675.
- Ohta T & Kreitman M, 1996. The neutralist-seleccionist debate. Bioessays 18: 673-683.
- Oliver CG, 1979. Genetic differentiation and hybrid viability within and between some Lepidoptera species. Am. Nat. 114: 681-694.
- Orr HA, 1987. Genetics of male and female sterility in hybrids of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. Genetics 116: 555-563.
- Orr HA, 1989a. Does postzygotic isolation result from improper dosage compensation?. Genetics 122: 891-894.
- Orr HA, 1989b. Genetics of sterility in hybrids between two subspecies of *Drosophila*. Evolution 43: 180-189.

- Orr HA, 1991. Is single gene speciation possible?. *Evolution* 45: 764-769.
- Orr HA, 1993a. Haldane's rule has multiple genetic causes. *Nature* 361: 532-533.
- Orr HA, 1993b. A mathematical model of Haldane's rule. *Evolution* 47: 1606-1611.
- Orr HA, 1995. The population genetics of speciation: The evolution of hybrids incompatibilities. *Genetics* 139: 1805-1813.
- Orr HA, 1996. Dobzhansky, Bateson and the genetics of speciation. *Genetics* 144: 1331-1335.
- Orr HA & Turelli M, 1996. Dominance and Haldane's rule. *Genetics* 143: 613-616.
- Pardue ML, Lowenhaupt K, Rich A & Nordheim A, 1987. (dC-dA)_n·(dG-dT)_n sequences have evolutionary conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *EMBO J.* 6: 1781-1789.
- Parkhurst SM & Meneely PM, 1994. Sex determination and dosage compensation: Lessons from flies and worms. *Science* 264: 924-932.
- Parkhurst SM, Bopp D & Ish-Horowicz D, 1990. X-A ratio, the primary sex determination signal in *Drosophila* is transduced by helix-loop-helix proteins. *Cell* 63: 1179-1191.
- Paterson HEH, 1985. The recognition concept of species. En: *Species and Speciation*, (E.S. Vrba, ed.). Pretoria: Transvaal. Museum Monogr. 4: 21-29.
- Patterson JT & Griffen AB, 1944. A genetic mechanism underlying species isolation. *Univ. Texas Publ.* 4415: 212-223.
- Pirrota V & Rastelli L, 1994. White gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in *Drosophila*. *Bioessays* 16: 549-556.
- Pontecorvo G, 1943. Viability interactions between chromosomes of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *J. Genet.* 45: 51-66.
- Popper KR, 1971. *La Lógica de la Investigación Científica*, (edición en castellano). Madrid: Editorial Tecnos.
- Postlethwait JH, 1973. A quantitative Juvenile Hormone assay on *Drosophila*. *DIS* 50: 135-138.

- Prigogine I, 1988. ¿Tan sólo una Ilusión?: Una Exploración del Caos al Orden. Barcelona: Tusquets editores.
- Prout T, 1969. The estimation of fitness from population data. *Genetics* 63: 949-957.
- Rice SH, 1998. The evolution of canalization and the breaking of Von Baer's laws: Modeling the evolution of development with epistasis. *Evolution* 52: 647-656.
- Rice WR, 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Riddiford LM & Truman JW, 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Amer. Zool.* 33: 340-347.
- Rouhani S & Barton NH, 1987. The probability of peak shifts in a founder population. *J. Theor. Biol.* 126: 51-62.
- Ruiz A & Fontdevila A, 1981. Ecología y evolución del subgrupo mulleri de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Cient. Venezolana* 32: 338-345.
- Ruiz A, Fontdevila A & Wasserman M, 1982. The evolutionary history of *D. buzzatii*. III. Cytogenetic relationships between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics* 101: 503-518.
- Russo C A, Takezaki MN & Nei M, 1995. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol. Biol. Evol.* 12: 391-404.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez A, 1986. Relaciones filogenéticas en los clusters *buzzatii* y *martensis* (grupo repleta) de *Drosophila*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Sánchez L & Dübendorfer A, 1983. Development of imaginal discs from lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila mauritiana*. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 192: 48-50.
- Sánchez L & Santamaría P, 1997. Reproductive isolation and morphogenetic evolution in *Drosophila* analyzed by breakage of ethological barriers. *Genetics* 147: 231-242.

- Sawamura K, Taira T & Watanabe TK, 1993a. Hybrid lethal systems in the *Drosophila melanogaster* species complex. I. The *maternal hybrid rescue (mhr)* gene of *D. simulans*. *Genetics* 133: 299-305.
- Sawamura K, Yamamoto M-T & Watanabe TK, 1993b. Hybrid lethal systems in the *Drosophila melanogaster* species complex. II. The *zygotic hybrid rescue (Zhr)* gene of *D. melanogaster*. *Genetics* 133: 307-313.
- Schäfer U, 1979. Viability in *Drosophila hydei* × *D. neohydei* hybrids and its regulation by genes located in the sex heterochromatin. *Biol. Zbl.* 98: 153-161.
- Segarra C & Aguadé M, 1993. Nucleotide divergence of the rp49 gene region between *Drosophila melanogaster* and two species of the Obscura group of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 36: 243-248.
- Segraves WA & Richards G, 1990. Regulatory and developmental aspects of Ecdysone regulated gene expression. *Inv. Reprod. Dev.* 18: 67-76.
- Sehnal F & Zdárek J, 1976. Action of Juvenoids on the metamorphosis of cyclorrhapous diptera. *J. Insect. Physiol.* 22: 673-682.
- Simpson GG, 1944. *Tempo and Mode in Evolution*. New York: Yale University Press.
- Simpson GC, 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. New York. Columbia University Press.
- Sluys R, 1991. Species concepts, process analysis and the hierarchy of nature. *Experientia* 47: 1162-1170.
- Sokal RR & Rohlf FJ, 1984. *Introducción a la Bioestadística*. Barcelona: Reverté S.A.
- Spencer CA, Gietz RD & Hodgetts RB, 1986. Overlapping transcription units in the dopadecarboxylase region of *Drosophila*. *Nature* 322: 279-281.
- Stebbins GL, 1950. *Variation and Evolution in Plants*. New York. Columbia University Press.
- Stebbins GL, 1989. *Evolución: Hacia una Nueva Síntesis*. León. Edita Universidad de León.
- Swanson WJ & Vacquier VD, 1998. Concerted Evolution in an Egg Receptor for a Rapidly Evolving Abalone Sperm Protein. *Science* 281: 710-
- Tauber CA & Tauber MJ, 1977. A genetic model for sympatric speciation through habitat diversification and seasonal isolation. *Nature* 288: 702-705.

- Tauber CA & Tauber MJ, 1989. Sympatric speciation in insects: Perception and perspectives. En: Speciation and Its Consequences, (D. Otte and J.A. Endler, eds.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 307-344.
- Templeton AR, 1979. The unit of selection in *Drosophila mercatorum*. II. Genetic revolutions and the origin of coadapted genomes in parthenogenetic strains. *Genetics* 92: 1265-1282.
- Templeton AR, 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94: 1011-1038.
- Templeton AR, 1981. Mechanisms of Speciation - A population genetic approach. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12: 23-48.
- Templeton AR, 1982a. Genetic architectures of speciation. En: Mechanisms of Speciation, ed. C. Barigozzi. Liss. New York; 105-121.
- Templeton AR, 1982b. The prophecies of parthenogenesis. En: Evolution and Genetics of Life Histories, (H. Dingle and J.P. Hegmann, eds.). New York: Springer-Verlag; 75-101.
- Templeton AR, 1983. Natural and experimental parthenogenesis. En: The Genetics and Biology of *Drosophila* 3C, (M. Ashburner, H.L. Carson and J.N. Thompson, eds.). New York: Academic Press; 343-398.
- Templeton AR, 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. En: Speciation and Its Consequences, (D. Ott and J.A. Endler, eds.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc; 1-26.
- Templeton AR, 1996. Experimental evidence for the genetic-transilience model of speciation. *Evolution* 50: 909-915.
- Templeton AR, Hollocher H, Lawler S & Johnston JS, 1989. Natural selection and ribosomal DNA in *Drosophila*. *Genome* 31: 296-303.
- Templeton AR, Johnston JS & Sing CF, 1987. The proximate and ultimate control of aging in *Drosophila* and humans. En: Evolution and Longevity in Animals, (A.D. Woodhead & K. H. Thompson, eds.). New York: Plenum Press; 8123-8133.

- Throckmorton LH, 1982. The virilis species group. En: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 3b, (M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson, Jr., eds.). London: Academic Press; 227-296.
- Torres M & Sánchez L, 1991. The sisterless-b function of the *Drosophila* gene *scute* is restricted to the state when the X:A ratio signal determines the activity of sex-lethal. *Development* 113: 715-722.
- Turelli M & Orr HA, 1995. The Dominance Theory of Haldane's rule. *Genetics* 140: 389-402.
- Ullman A, Jacob F & Monod J, 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24: 339-351.
- Waddington CH, 1970. *Hacia una Biología Teórica*. Ed. en castellano (1976). Madrid: Alianza Editorial S.A.
- Wade MJ & Goodnight CJ, 1991. Wright's Shifting Balance Theory: An experimental study. *Science* 253: 1015-1018.
- Wade MJ, Johnson NA & Wardle G, 1994a. Analysis of autosomal polygenic variation for the expression of Haldane's rule in flour beetles. *Genetics* 138: 791-799.
- Wade MJ, Patterson H, Chang NW & Johnson NA, 1994b. Postcopulatory, prezygotic isolation in flour beetles. *Heredity* 72: 163-167.
- Wagensberg J, 1985. *Ideas sobre la Complejidad del Mundo*. Barcelona. Tusquets editores.
- Wagner A, Wagner GP & Similion P, 1994. Epistasis can facilitate the evolution of reproductive isolation by peakshifts: A two locus two allele model. *Genetics* 138: 533-545.
- Wasserman M, 1982. Evolution and speciation in selected groups: The *repleta* species group. En: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 3b (M. Ashburner, H. L. Carson, and J.N. Thompson, Jr., eds.). London: Academic Press; 61-139.
- Wasserman M, Fontdevila A & Ruiz A, 1983. Potential gene exchange between South American *Drosophila* species, with description of a new species in the *D. repleta* (Diptera: Drosophilidae) group. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 675-677.

- Watanabe TK, 1979. A gene that rescues the lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Jpn. J. Genet. 54: 325-331.
- Watson JD & Crick FHC, 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737-738.
- Weis S & Schartl M, 1998. The macromelanophore locus and the melanoma oncogene *Xmrk* are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. Genetics 149: 1909-1920.
- Wharton LT, 1942. Analysis of the *repleta* group of *Drosophila*. Texas Univ. Publ. 4228: 23-52.
- Wharton LT, 1943. Analysis of the metaphase and salivary chromosome morphology within the genus *Drosophila*. Texas Univ. Publ. 4313: 282-319.
- White MJD, 1978. Modes of Speciation. San Francisco: Freeman & Company.
- White MJD, 1982. Rectangularity, speciation and chromosome architecture. En: Mechanisms of Speciation, (C. Barigozzi, ed.). New York: Liss; 75-103.
- Wilson AC, Sarich VM & Maxson LR, 1974. The importance of gene rearrangements in evolution. Evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. P.Natl. Acad. Sci. USA 71: 3028-3030.
- Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Maueler W, Raulf F, Telling A, Robertson SM & Schartl M, 1989. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphophorus*. Nature 341: 415-421.
- Wright S, 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. Proc. 6th Int. Congr. Genet. 1: 356-366.
- Wright S, 1935. The analysis of variance and the correlations between relatives with respect to deviations from an optimum. J. Genet. 30: 243-256.
- Wright S, 1948. On the roles of directed and random changes in gene frequencies in the genetics of populations. Evolution 2: 279-294.
- Wright S, 1968, 1969, 1977, 1978. Evolution and Genetics of Populations. Vols. 1-4. Chicago: University of Chicago Press.
- Wright S, 1982. Character change, speciation and the higher taxa. Evolution 36: 427-443.

- Wu C-I, 1992. A note on Haldane's rule: Hybrid inviability versus hybrid sterility. *Evolution* 46: 1584-1587.
- Wu C-I & Davis AW, 1993. Evolution of postmating reproductive isolation: The composite nature of Haldane's rule and its genetic basis. *Am. Nat.* 187: 212.
- Wu C-I & Palopoli MF, 1994. Genetics of postmating reproductive isolation in animals. *Mol. Evol. Annu. Rev. Genet.* 28: 283-308.
- Wu C-I, Johnson NA & Palopoli MF, 1996. Haldane's rule and its legacy: why are there so many sterile males?. *Trends Ecol. Evol.* 11: 281-284.
- Wu C-I, Perez DE, Davis AW, Johnson NA, Cabot EL, Palopoli MF & Wu M-L, 1992. Molecular genetics studies of postmating reproductive isolation in *Drosophila*. In: *Proceedings of the 17th Taniguchi Symposium in Biophysics*, (N. Takahata and A.G. Clark, eds.). Mishima, Japan. Springer-Verlag.
- Zeng L-W, 1996. Resurrecting Muller's theory of Haldane's rule. *Genetics* 143: 603-607.
- Zouros E, 1981. The chromosomal basis of viability in interspecific hybrids between *Drosophila arizonensis* and *D. mojavensis*. *Can. J. Gen. Cytol.* 23: 65-72.

1948

7. APENDICES

CONSTITUTION DE LA COMMISSION DE LA VÉRITÉ

La Commission de la Vérité est constituée de la manière suivante :

Le Président de la Commission est nommé par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu pour une durée de cinq ans.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

Le Président de la Commission est élu par le Parlement.

7.1 SOLUCIONES DE RESERVA, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

Cloroformo isoamílico: Cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1.

Dextrano Sulfato 50%: Disolver el Dextrano Sulfato en H₂O mq.

EDTA (0,5 M pH 8,0): Disolver 18,61 g de etilendiaminotetraacetato sódico-2 H₂O en 80 ml de H₂O. Añadir 2 g de NaOH para ajustar a pH 8,0. Enrasar a 100 ml con H₂O mq. Autoclavar. Guardar a TA.

H₂O DEPC tratada: 0,1% DEPC 12h a 37°C, autoclavar 15 min.

LB / Agar: Se prepara LB y se le añade agar hasta alcanzar una concentración de 15g/l antes del ciclo de autoclavado. Guardar a TA.

LB: Bactotripton 1%; CINa 1%; extracto de levadura bacteriológica (bacto yeast extract) 0,5%; en H₂O destilada. Ajustar a pH 7,0 con NaOH. Esterilizar por autoclavado.

LB-top agarosa: Se prepara LB y se le añade agarosa a una concentración de 7g/l antes del ciclo de autoclavado. Guardar a TA.

Orceina Acético Láctica: Orceina-acética 70%; ácido láctico 30%.

PBS: Disolver 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄ y 0,24 g KH₂PO₄ en 800ml H₂O. Ajustar pH a 7,4 con HCl. Añadir H₂O hasta 1l. Esterilizar autoclavando.

SDS (10%): Disolver 10 g de duodecil sulfato sódico en 100 ml de H₂O mq.

SOC: Bactotripton 2%; extracto de levadura bacteriológica (bacto yeast extract) 0,5%; CINa 10 mM; ClK 2,5 mM; Cl₂Mg 10 mM; SO₄Mg 10 mM; glucosa 20 mM. Autoclavar. Guardar a TA.

Solución de Denhart (50X): Dilución 1:10 en tampón de prehibridación.

SSC (20X): CINa 3 M; citrato sódico 0,3M; se ajusta a pH 7,0 con NaOH 10 N. Esterilizar por autoclave. Guardar a TA.

SSPE (20X): Disolver 175,3 g de NaCl; 27,6 g de NaH₂PO₄· H₂O y 7,4 g EDTA en 800ml H₂O. Ajustar pH a 7,4 con NaOH. Ajustar el volumen a 1l. Esterilizar por autoclave.

Tampón de homogenización (extracción de ADN de 1 mosca): Tris-ClH 10 mM pH 7,5; ClNa 60mM; EDTA 10 mM; Espermina 0,15 μ M; Espermidina 0,15 μ M; Sacarosa 5%.

Tampón de lisis: Tris-ClH 300 mM pH 9; EDTA 100 mM; SDS 0,625%; Sacarosa 5%.

Tampón R: Tris-ClH 10 mM pH 7,5; ClNa 100 mM; ClMg 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM.

TB: Bactotripton 1,2%; 2,4% de extracto de levadura bacteriológica (bacto yeast extract); 0,4% glicerol. en H₂O destilada. Autoclavar. Guardar a TA.

TBE(SX): Disolver 54 g Tris base; 27,5 g ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0.

TE: Tris-ClH 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM. Autoclavar. Guardar a 4°C.

Tris-ClH (1M): 121,1 g Tris base en 1 l de H₂O mq. Se ajusta al pH deseado con ClH. Autoclavar y guardar a 4°C.

7.2 ABREVIATURAS.

μ g	microgramo	mm	milímetro
μ l	microlitro	mM	milimolar
ADN	ácido desoxiribonucleico	mq	MilliQ
dNTP	desoxinucleótido trifosfato	nl	nanolitro
EtOH	etanol	nm	nanómetro
g's	peso de la partícula en el campo de la centrífuga / peso de la partícula bajo la sola acción de la gravedad.	°C	grados centígrados
h	hora	rpm	revoluciones por minuto
Kb	kilobase	RT	retrotranscriptasa
M	molar	seg	segundo
mA	miliamperios	TA	temperatura ambiente
min.	minuto	UV	ultravioleta
ml	mililitro	V	voltios
		v/v	relación volumen/volumen
		w/v	relación peso/volumen

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744274

7