

PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

2012

Ligamiento Genético de Mutaciones
Espontáneas en *Drosophila willistoni*

Bach. Ana María Soler

Orientadora: Dra. Beatriz Goñi

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias



AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Beatriz Goñi, quien me guió durante todos estos años y me transmitió valores que me enriquecieron más allá de lo académico, incentivándome y apoyándome de manera constante.

A Cristina Parada, quien desde el comienzo me brindó su apoyo y amistad.

A los integrantes de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias, quienes crean un excelente ambiente todos los días.

A los integrantes del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, quienes me brindaron su apoyo y su confianza.

A mis amigos por su apoyo incondicional.

A mis padres y mis hermanas, quienes estuvieron en las buenas y en las malas, y sin quienes esto nunca hubiese sido posible.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. OBJETIVOS..... | 7 |
| 2.1. Objetivo general..... | 7 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 7 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| 3.1. Cepas Mutantes..... | 8 |
| 3.2. Descripción de Mutantes..... | 8 |
| 3.3. Análisis de Alelismo | 9 |
| 3.4. Análisis de Ligamiento Cromosómico | 11 |
| 3.5. Interacción Génica..... | 11 |
| 3.6. Análisis de Expresividad y Penetrancia..... | 12 |
| 3.7. Simbología, Sintenia Génica y Cromosómica | 13 |
| 3.8. Condiciones de Cultivo..... | 13 |
| 4. RESULTADOS..... | 15 |
| 4.1. Lista de Mutantes | 15 |
| 4.2. Análisis de Alelismo | 18 |
| 4.3. Análisis de Ligamiento Cromosómico | 20 |
| 4.4. Interacción Génica..... | 21 |
| 4.5. Análisis de Mutantes con Expresividad y Penetrancia Variable..... | 22 |
| 4.6. Sintenia Génica y Cromosómica..... | 24 |
| 4.7. Propuesta de Ligamiento Cromosómico de Mutantes en <i>D. willistoni</i> | 25 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 27 |
| 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 32 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 33 |

RESUMEN

Drosophila se caracteriza por ser un excelente organismo modelo para el estudio de la evolución cromosómica y el orden génico. Müller (1940) propuso que el genoma ancestral del género *Drosophila* estaba compuesto por cinco pares de cromosomas acrocéntricos y un par de cromosomas puntuales (elementos A-F), en los cuales el contenido génico permanecería altamente conservado entre las especies de este género. Ello brinda la posibilidad de identificar grupos de ligamiento equivalentes y reordenamientos cromosómicos entre especies de *Drosophila*. Esta hipótesis está siendo revisada utilizando datos de la secuenciación genómica y el montaje de los *scaffolds* sobre los cromosomas politénicos de 12 especies de *Drosophila* (Schaeffer *et al.*, 2008). *D. willistoni*, del subgénero *Sophophora*, es una de las especies recientemente secuenciada. Su genoma se organiza en tres grupos de ligamiento, dos pares de autosomas (cromosoma II y III) y un par de cromosomas sexuales heteromórficos, el X y el Y. La homología cromosómica entre *D. willistoni* y *D. melanogaster* propuesta por Sturtevant & Novisky (1941) es la siguiente: el cromosoma X de *D. willistoni* corresponde a los elementos de Müller A y D, el cromosoma II a los elementos B y C, y el cromosoma III a los elementos E-F. El alineamiento de genes ortólogos de *D. melanogaster* con los *scaffolds* de *D. willistoni* ha revelado la necesidad de ampliar el número de marcas genéticas para facilitar el ensamblaje de las secuencias genómicas (Schaeffer *et al.*, 2008).

En esta pasantía se presenta la caracterización fenotípica y genética de mutaciones espontáneas que afectan el fenotipo adulto de *D. willistoni* que, muchas de ellas, representan nuevas marcas genéticas. Se analizaron setenta y ocho alelos mutantes e identificaron un total de cuarenta y un loci; seis ligados al cromosoma X, veintiuno al cromosoma II y catorce al cromosoma III. Esta caracterización se ha basado en (i) la homología fenotípica con mutantes descritos para *D. willistoni* y *D. melanogaster*, (ii) el análisis de alelismo y ligamiento cromosómico, (iii) la interacción génica entre genes mutantes que afectan el color de ojos, y (iv) los datos de sintenia génica (secuencias ortólogas) y cromosómica entre mutantes de *D. willistoni* y *D. melanogaster* obtenida del Flybase (www.flybase.org). Entre las mutaciones estudiadas, se reportan veintiséis genes autosómicos nuevos. Diecinueve mutaciones autosómicas poseen secuencias ortólogas en *D. willistoni*. Estas mutantes constituyen un valioso material de investigación en estudios de mapeo genético (y físico) que se están desarrollando en nuestro laboratorio.

1. INTRODUCCIÓN

Drosophila se caracteriza por ser un excelente organismo modelo dado que posee un sistema genético manipulable, de bajo costo y con una complejidad biológica comparable a la de un mamífero, a pesar de poseer un genoma pequeño. Muchos sistemas de órganos en mamíferos tienen homólogos altamente conservados en *Drosophila*. La investigación en *Drosophila* ha permitido avanzar en el conocimiento sobre el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, el comportamiento, la inmunidad, el envejecimiento, la herencia multigénica, el desarrollo, entre otros.

El género *Drosophila* presenta más de 2000 especies, agrupadas en unos 50 grupos. Dicho género se encuentra dividido en dos subgéneros: *Drosophila* y *Sophophora* (FIGURA 1). El subgénero *Sophophora* abarca siete grupos que contienen aproximadamente unas 300 especies (O'Grady & Kidwell, 2002), siendo uno de ellos el grupo *willistoni*, de distribución Neotropical. Este grupo abarca actualmente 23 especies subdivididas en tres subgrupos principales: *alagitans*, *bocainensis* y *willistoni*. El subgrupo *willistoni* está formado por un conjunto de seis especies crípticas, que incluye subespecies, semiespecies, poblaciones endémicas de islas y continentales. Dichas especies son: *D. willistoni* (Sturtevant, 1916), *D. equinoxialis* (Dobzhansky, 1946), *D. insularis* (Dobzhansky et al., 1957), *D. paulistorum* (Dobzhansky & Pavan en Burla et al., 1949), *D. pavlovskiana* (Kastritsis & Dobzhansky, 1967) y *D. tropicalis* (Burla & Da Cunha en Burla et al., 1949).

Drosophila willistoni es la especie del grupo *willistoni* que posee la distribución geográfica más extensa, encontrándose desde Florida (EEUU), a través de las Bahamas, América Central y las islas del Caribe, hasta el paralelo 40°, 300km al sur de la ciudad de Buenos Aires, Argentina (Ehrman & Powell, 1982; Cordeiro y Winge, 1995). A pesar de ser una especie propia de ambientes naturales, ha sido hallada también en ambientes modificados por el hombre; y es la única especie de este subgrupo, hasta ahora descrita para el Uruguay (Goñi y col., 1998).

El genoma de *D. willistoni* se caracteriza por tener dos pares de autosomas (cromosoma II, y III) y un par de cromosomas sexuales heteromórficos, el cromosoma X y el cromosoma Y. El cromosoma II es metacéntrico mientras que el cromosoma III es acrocéntrico y de cerca de la mitad del tamaño del cromosoma II. El cromosoma X es metacéntrico y algo mayor que el cromosoma II y presenta, al igual que el cromosoma

II, bloques de heterocromatina en las regiones pericentroméricas. El cromosoma Y, por su parte, es de menor tamaño, submetacéntrico y enteramente heterocromático.

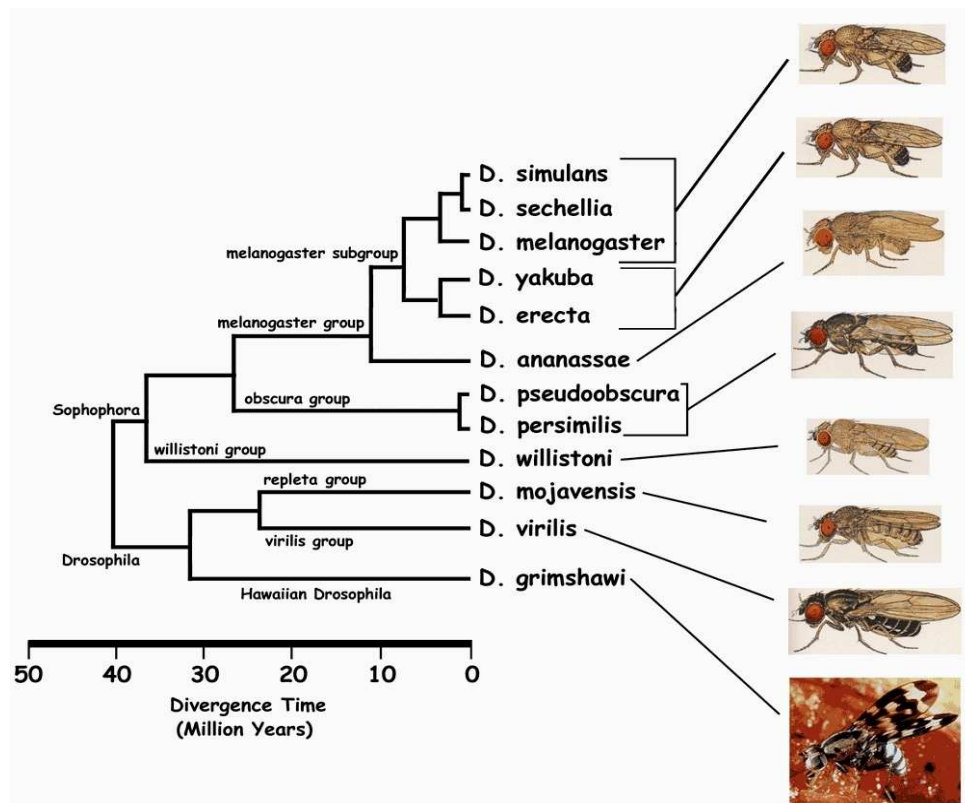


FIGURA 1. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Drosophila*. Se identifican las principales especies de cada grupo y los dos subgéneros de *Drosophila*. Extraída del Flybase (www.flybase.org).

Una de las características genéticas más destacadas de las poblaciones naturales de *D. willistoni* es su alto grado de polimorfismo cromosómico (Da Cunha y col., 1950; Cordeiro & Winge 1995; Valente *et al.*, 2001, 2003), encontrándose más de 60 inversiones paracéntricas que involucran los cinco brazos cromosómicos. Según Da Cunha & Dobzhansky (1954) y Cordeiro & Winge (1995), las poblaciones que habitan el centro de la distribución geográfica de esta especie presentan mayor grado de polimorfismo cromosómico que aquellas ubicadas marginalmente. Sin embargo, estudios citogenéticos realizados por Valente & col. (2001, 2003) en poblaciones naturales de *D. willistoni* del Uruguay y del sur de Brasil, mostraron una alta frecuencia de inversiones paracéntricas que contradice el patrón centro-marginal previamente propuesto por Da Cunha and Dobzhansky (1954).

Müller (1940) propuso que el genoma ancestral de las especies de *Drosophila* estaba compuesto por cinco pares de cromosomas acrocéntricos y un par de cromosomas puntales, entre los cuales han ocurrido eventos de fusión centromérica. Utilizando *D. melanogaster* como referencia, Müller propuso designar con las letras A-F a cada uno de los cinco brazos cromosómico principales y al minicromosoma “dot” (cromosoma IV); y utilizar esa nomenclatura para identificar grupos de ligamiento homólogos dentro de las distintas especies de *Drosophila*. Además, planteó que el contenido de los cromosomas ancestrales permanecería altamente conservado, lo que brinda la posibilidad de identificar grupos de ligamiento equivalentes dentro de las distintas especies de *Drosophila*.

Sturtevant y Novisky (1941) propusieron una homología entre los brazos cromosómicos de *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Según estos autores, el cromosoma X de *D. willistoni* es el resultado de la fusión de los elementos de Müller A y D (cromosomas X y brazo III L de *D. melanogaster*); el cromosoma II es el resultado de la fusión de los elementos B y C (brazos IIR y IIL de *D. melanogaster*) y el cromosoma III está formado por los elementos E y F (brazo IIIR y cromosoma IV de *D. melanogaster*) (FIGURA 2). Esta propuesta ha sido recientemente revisada mediante el estudio comparativo de las secuencias genómicas de 12 especies de *Drosophila* (Schaeffer *et al.* 2008) y mediante técnicas moleculares y/o de hibridación *in situ* (Papaceit & Juan, 1997; Powell *et al.*, 2011).

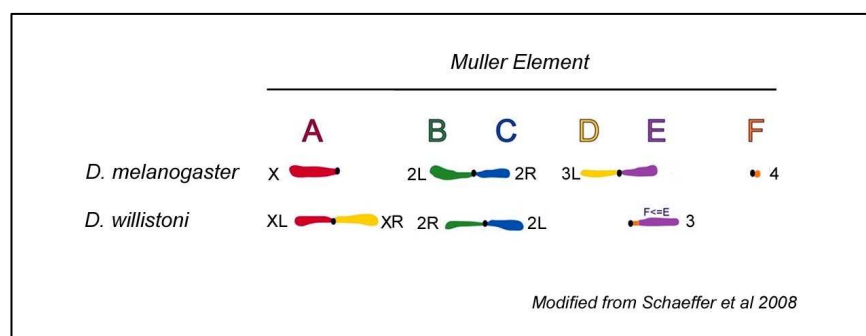


FIGURA 2. Relaciones cariotípicas y sinténicas. Se muestran los brazos cromosómicos, designado por su numeración convencional; separados y alineados como elementos de Müller (A-F). Cada elemento está coloreado diferencialmente. Los puntos negros representan los centrómeros. Modificado de Figura 1 en Schaeffer *et al.* 2008.

Schaeffer *et al.* (2008) presentan los datos de la secuenciación genómica y el

montaje del genoma de 12 especies de *Drosophila* que proporcionan una oportunidad para actualizar, organizar y sintetizar los mapas genéticos y físicos de cada especie y para estandarizar la calidad, presentación, y la nomenclatura de los mapas citogenéticos de cada especie. Las relaciones de sintenia de los elementos de Müller entre las especies estudiadas fueron suficientes para asignar grandes *scaffolds* a los brazos cromosómicos correspondientes, mientras que la hibridización con sondas de ADN marcado a los cromosomas politénicos fue necesaria para confirmar el correcto posicionamiento de la secuencia ensamblada en el cromosoma. Es importante destacar que los *scaffolds* ensamblados fueron alineados a los cromosomas politénicos de las especies recientemente secuenciadas considerando los datos de los mapas tanto existentes como nuevos, así como los datos de la comparación computacional entre especies, especialmente en relación con la organización de los genes en el genoma de *D. melanogaster*. Mientras que la sintenia cromosómica en *Drosophila* está altamente conservada, el orden de los genes todo a lo largo de los brazos cromosómicos se encuentra pobremente conservado debido probablemente a la acumulación de inversiones que provocan un reordenamiento de los genes (Segarra & Aguade, 1992; Ranz *et al.*, 2001). Según Schaeffer *et al.* (2008), mapas con buen apoyo en el ensamblaje de los *scaffolds* permitirán abordar preguntas sobre la organización genómica y estructural de los “elementos de Müller” en el género *Drosophila*.

D. willistoni es una de las especies recientemente secuenciada. En este caso el alineamiento de genes ortólogos de *D. melanogaster* con los *scaffolds* de *D. willistoni* no fue lo suficientemente bueno como para poder asignar un orden y orientación de los mismos, por lo que la orientación propuesta por Schaeffer *et al.* (2008) es tentativa. Por otro lado, existe un número limitado de marcas genéticas y físicas en *D. willistoni* lo cual dificulta el trabajo del ensamblaje de las secuencias genómicas. Es así que la disponibilidad de nuevas marcas genéticas y su mapeo en *D. willistoni* brindarán un mayor soporte y confiabilidad en el ensamblaje de las secuencias del genoma de esta especie.

Los primeros estudios sobre la genética y mapas de ligamiento en *D. willistoni* fueron realizados por Lancefield y Metz (1922) y Ferry y col. (1923). Estos autores describieron un total de cincuenta y tres mutaciones, treinta y cuatro para el cromosoma X, once para el cromosoma II y ocho para el cromosoma III, provenientes del cultivo de cepas de Cuba en 1915, que presentaban fenotipos similares a las mutantes

anteriormente descritas para *D. melanogaster*. En 1950, Spassky y Dobzhansky, retomaron los estudios de la genética de *D. willistoni* y describieron veintiuna mutación para el cromosoma X, veintidós para el cromosoma II y once para el cromosoma III, algunas de origen espontáneo provenientes de Belem, Pará, Brasil y otras inducidas por rayos X. Posteriormente, Poulson y Counce (1960) describieron otros mutantes de *D. willistoni*. Ninguna de estas cepas mutantes existe actualmente.

Desde 1998, el laboratorio de *Drosophila* de la Sección Genética Evolutiva ha estado trabajando en el aislamiento de mutaciones espontáneas visibles en adultos de *D. willistoni*, con el propósito de elaborar grupos de ligamiento y utilizar los mutantes como (nuevas) marcas en estudios evolutivos para investigar, entre otros, el mapa genético y físico de dicha especie. Estudios preliminares fueron reportados por Goñi *et al.*, (2002), Parada & Goñi (2003), y Ludwing *et al.* (2003).

En esta pasantía se presenta una propuesta de grupos de ligamiento genético de mutaciones espontáneas que afectan el fenotipo visible en adultos de *D. willistoni*. Resume y reexamina los datos genéticos (alelismo y ligamiento) de mutantes descritos en forma preliminar por Goñi *et al.* y otros (Goñi, comunicación personal).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar la caracterización genética de mutantes espontáneas en *D. willistoni* disponibles en el laboratorio de *Drosophila*, Sección Genética Evolutiva y proponer un mapa de ligamiento cromosómico de dichas mutantes, considerando la homología fenotípica, los datos del análisis genético y los datos de sintenia génica y/o cromosómica entre *D. willistoni* y *D. melanogaster*.

2.2. Objetivos Específicos

- Describir el fenotipo de nuevas mutaciones espontáneas de *D. willistoni* y reexaminar las mutaciones descritas anteriormente
- Determinar los genes (y sus alelos) mutantes
- Determinar el grupo de ligamiento genético, en especial de las mutaciones autosómicas
- Determinar la existencia de interacción génica entre mutaciones que afectan el color de ojos
- Determinar la variación de la expresión génica y/o penetrancia observada en algunos mutantes que afectan la forma de las alas
- Realizar una búsqueda de información acerca de la sintenia génica y/o cromosómica entre *D. willistoni* y *D. melanogaster*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas Mutantes

Se utilizaron un total de setenta y ocho cepas mutantes (líneas puras) de moscas recolectadas de la naturaleza en diferentes localidades de Argentina, Brasil, y Uruguay; durante los años 1998-2009 (TABLA 1). Todas las mutaciones que se analizaron en este trabajo eran de origen espontáneo.

3.2. Descripción de Mutantes

Para la descripción del fenotipo mutante, se anestesiaron y observaron hembras y machos, y se elaboró una lista de mutantes morfológicos: color de ojos, forma de los ojos, forma de las alas, color del cuerpo, etc. La Figura 3 ilustra algunos de los mutantes analizados, junto con el fenotipo salvaje en *D. willistoni*.

Como referencia, se utilizó la descripción (fotos, figuras) de mutantes reportadas para *D. willistoni* (Ferry et al., 1923; Spassky & Dobzhansky, 1950); y *D. paulistorum* (Malogolowkin & Ehrman, 1960). En caso de no poseer una descripción fenotípica reportada anteriormente en estas especies, se asignó un nombre tentativo a cada gen mutante en base a la similitud fenotípica con *D. melanogaster* (Lindsley & Zimm, 1992; Flybase: www.flybase.com).

En el caso de las mutaciones que afectan el color de ojos, se observaron individuos de diferentes edades puesto que, en muchos casos, el color varía notablemente con la edad. La descripción de estos mutantes se realizó en base a la observación de moscas utilizando dos tipos de iluminación: luz dicróica y luz fría; debido a que el fenotipo salvaje para el color de ojos de *D. willistoni* es más brillante que el de *D. melanogaster*, por lo que, para un mismo gen mutante el fenotipo entre estas dos especies podría no ser idéntico.

TABLA 1. Cepas mutantes de *D. willistoni* utilizadas en esta pasantía. Se detalla la localidad, el año y el código de colecta de los cultivos monohembra.

| CEPAS MUTANTES | | | CEPAS MUTANTES | | |
|--|---------|--|---|---------------|------------|
| Localidad | Año | Cepa | Localidad | Año | Cepa |
| Facultad de Agronomía Montevideo URUGUAY (34° 53' S, 56° 16' O) | 1998 | 98e3.98 | Laguna Negra Rocha URUGUAY (34° 05' S; 53° 44' O) | 2000 | REB1.00** |
| | | D14.99 | | | REM2.00 |
| | 1999 | ES7.99 | | | RLN1.00 |
| | | ES13.99** | | 2002 | TB14.02 |
| | | Ey3.99 | | | TB26.02 |
| | | S46.99 | | | TB28.02 |
| | 2000 | EM1.00* | | | TB37.02 |
| | | Ey10.00 | | | TB38.02 |
| | | SG11.00 | | | TB40.02 |
| | | SG12.00 | | | TB44.02*** |
| | | SG23.00 | | TB46.02** | |
| | | SG24.00 | | TB77.02 | |
| | | SM35.00 | Solis, Maldonado URUGUAY (34° 47' S; 55° 22' O) | 2002 | SB26.02** |
| | | SMV28.00 | | | SB27.02 |
| | | SS48.00 | | | |
| | 2001 | SG1.01 | Sta Lucia Canelones URUGUAY (34° 27' S; 56° 23' O) | 2000 | SGV1.00 |
| | | SG4.01 | | | SGV8.00 |
| | | SL7.01 | | | |
| | | SL13.01 | | | |
| | | ST12.01 | | | |
| | 2002 | EB2.02 | Rivera URUGUAY (30° 54' S; 55° 29' O) | 2003 | Riv1.03 |
| | | SL8.02 | | | Riv9.03 |
| | 2003 | EB1.03 | Buenos Aires ARGENTINA (34° 35' S, 58° 28' O) | 2006 | Q14 F1 |
| | | SG1.03 | | | Q14 F11 |
| | | SG3.03 | | | Q14 F23 |
| | | Sy11.03 | | | Q15 F10 |
| | 2005 | FA1.05 | San Pablo BRASIL (23° 33' S; 46° 43' O) | 2006 | Q02 F7 |
| | FA2.05 | 2007 | | Q46 F9 | |
| | FA7.05 | | | Q46 F32 | |
| | FA8.05 | | | Q46 M6 | |
| | FA11.05 | | | Q46 M8 | |
| | FA22.05 | | | | |
| | FA30.05 | | | | |
| | FA33.05 | | | | |
| 2009 | Q51 F13 | Manaos BRASIL (03° 06' S; 60° 01' O) | | yellow Manaus | |
| | Q51 F14 | | | | |
| | Q52 F51 | | | | |
| | Q52 F56 | | | | |
| | Q52 F63 | | | | |

*Goñi *et al.* (2002). ** Parada & Goñi (2003). *** Ludwing *et al.* (2003) .

3.3. Análisis de Alelismo

Se realizó la prueba de alelismo entre cepas mutantes que presentaban fenotipo similar. Se realizaron un total de 165 cruzamientos diferentes y sus recíprocos. Además, cada cruzamiento se realizó por duplicado. Asimismo, para cada cruzamiento se

realizaron dos réplicas: réplica “1A” al día de emergidas y réplica “2A” a los tres a cinco días de emergidas. Para ello, se cruzaron hembras vírgenes mutantes m_1 (7-8 individuos/cruzamiento), con machos jóvenes mutantes m_2 (4-5 individuos/cruzamiento). Toda la progenie F1 de cada cruzamiento fue anestesiada con vapores de trietilamina y observada bajo una lupa estereoscópica, con el fin de analizar la presencia/ausencia de individuos mutantes (ver ANEXO I).

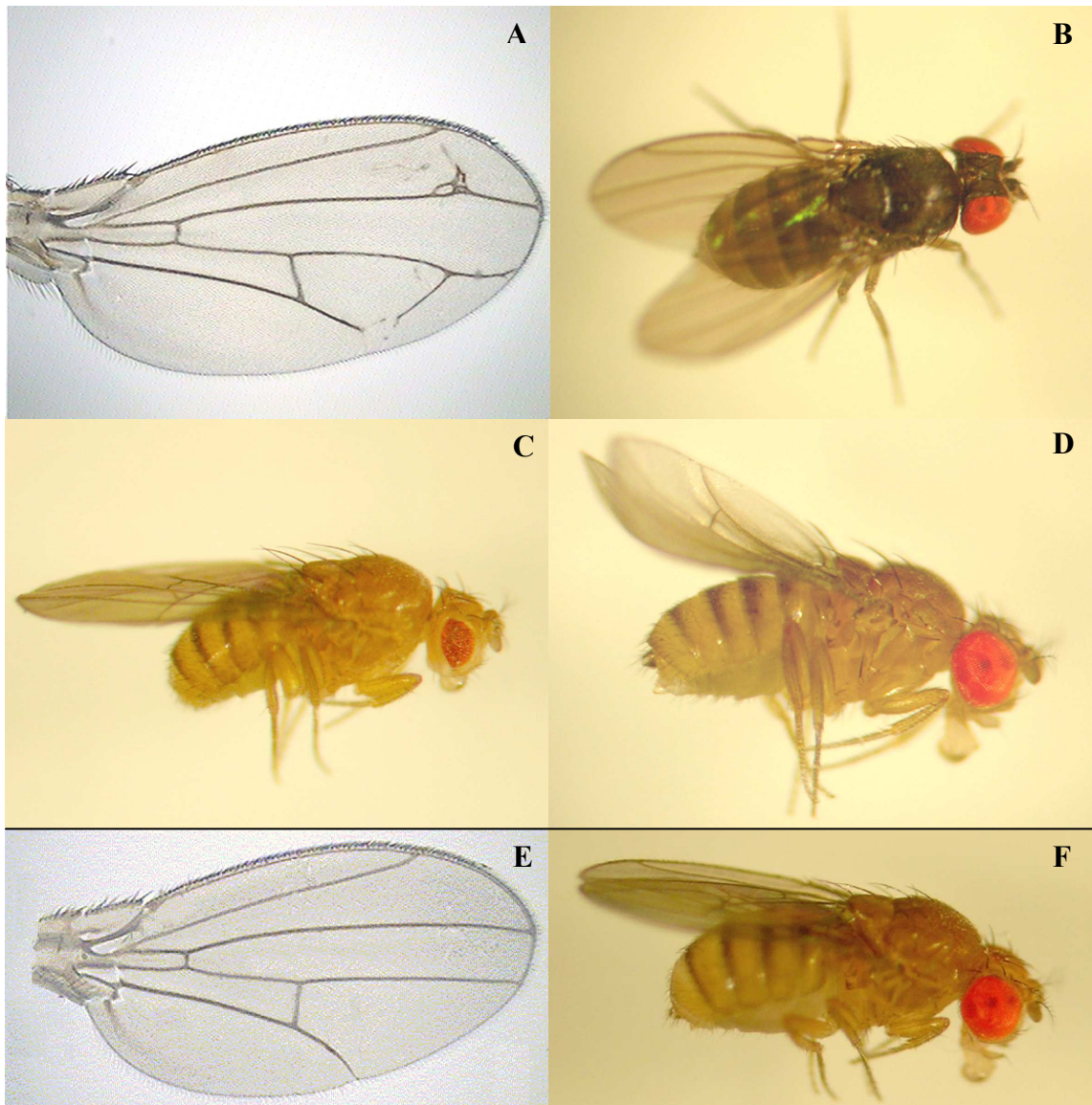


FIGURA 3. Fotos de algunas mutantes utilizadas y del fenotipo salvaje. (A) *plexus*, $px^{SG1.01}$. (B) *ebony*, e^{Q14F23} . (C) *hedgehog*, hh^{Q02F7} . (D) *jaunty*, $j^{TB38.02}$. (E) Ala de fenotipo salvaje. (F) Fenotipo salvaje

3.4. Análisis de Ligamiento Cromosómico

Entre las mutantes autosómicas, algunas presentaban fenotipo fácilmente distinguible, buena fertilidad y viabilidad; y mediante cruzamientos genéticos entre ellas, se identificaron como marcadores de uno u otro grupo de ligamiento autosómico; ejemplo: *brown* ($bw^{SG23.00}$); *cardinal* ($cd^{SG12.00}$); *ebony* (e^{Q14F23}); *hedgehog* (hh^{Q02F7}); *jaunty* ($j^{TB38.02}$); *plexus* ($px^{SG1.01}$). Estos mutantes fueron referidos como “loci de referencia”.

Para el análisis de ligamiento, se realizaron un total de 141 cruzamientos (y sus recíprocos) entre pares de cepas mutantes que presentaban fenotipos claramente distinguibles uno del otro. En la mayoría de estos cruzamientos, una de las mutantes utilizada era un “locus de referencia” (ver ANEXO II). Además, cada cruzamiento se realizó por duplicado. Asimismo, para cada cruzamiento se realizaron tres réplicas: réplica “1A” al día de emergidas; réplica “2A” a los tres a cinco días de emergidas y réplica “3A” a los siete a nueve días de emergidas. Para ello, se cruzaron hembras vírgenes m_1 (7-8 individuos/cruzamiento) con machos jóvenes m_2 (4-5 individuos/cruzamiento). La progenie F1 fue anestesiada y analizada bajo una lupa estereoscópica para descartar cruzamientos en que las hembras parentales no hayan sido vírgenes. Si solo los machos de la progenie F1 eran mutantes, se asumió que la mutación (m_1) estaba ligada al cromosoma X; si toda la F1 era de fenotipo salvaje, se considero que la mutación (m_1) era autosómica, y se procedió a la realización del cruce F1 x F1. Toda la progenie F2 fue anestesiada y analizada, y la presencia de cuatro fenotipos diferentes ([+], [m_1], [m_2] y [m_1, m_2]) fue considerada como evidencia de “segregación independiente” entre el par de genes mutantes analizados, asumiendo que solo las hembras pueden recombinar (Figura 4).

3.5. Interacción Génica

Para determinar la existencia de interacción génica entre mutantes que afectan el color de ojos y que pertenecen a diferentes loci autosómicos, se cruzaron hembras vírgenes m_1 (7-8 individuos/cruzamiento) con machos jóvenes m_2 (4-5 individuos/cruzamiento). Cada cruzamiento se realizó por duplicado. Además, para cada cruzamiento se realizaron dos réplicas: réplica “1A” al día de emergidas y réplica “2A” a los tres a cinco días de emergidas. Las mutaciones que afectan el color de ojos ligadas al cromosoma X no fueron utilizadas para determinar interacción génica. Al

igual que en otros cruzamientos la progenie F1 fue anestesiada y analizada para descartar cruzamientos en los que las hembras parentales no hayan sido vírgenes. Si la F1 era de fenotipo salvaje, se procedió a la realización del cruce F1 x F1. La presencia de un nuevo color de ojos en la progenie F2 ($[m_1, m_2]$) fue considerada como evidencia de “interacción génica” entre las dos mutaciones estudiadas.

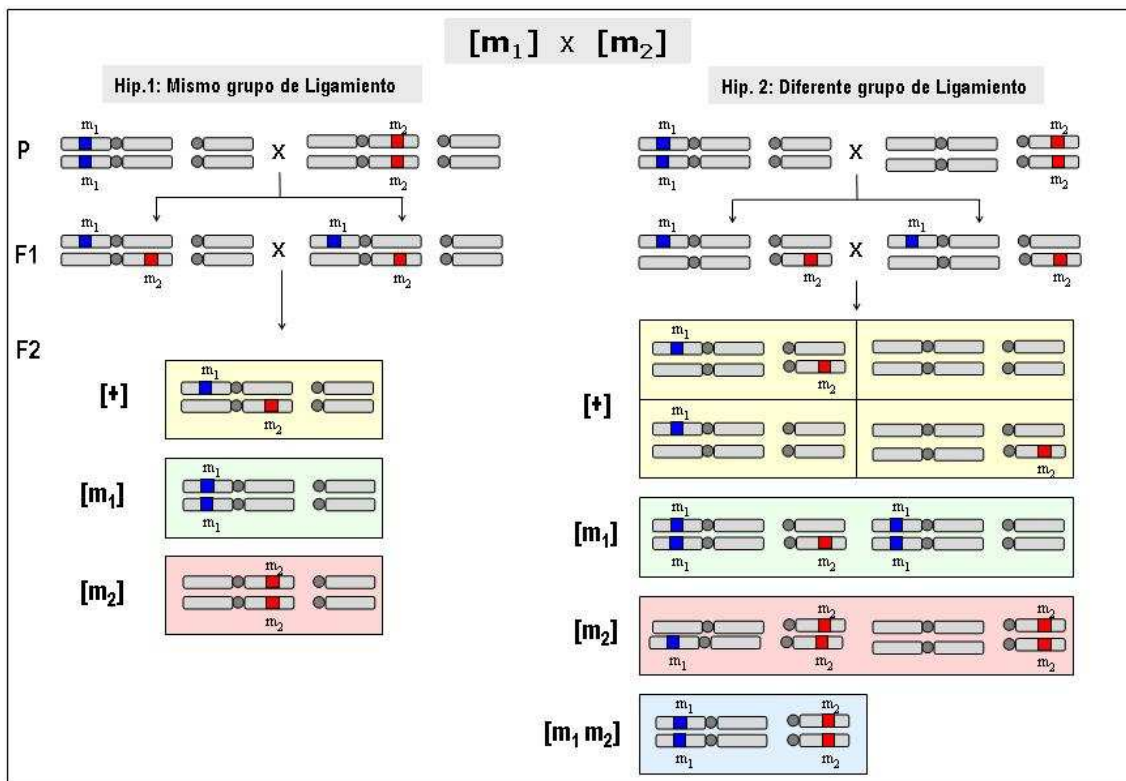


FIGURA 4. Esquema de los cruzamientos genéticos realizados para el análisis de Ligamiento Cromosómico. Se detalla los genotipos y fenotipos de los parentales y de la descendencia F1 y F2 esperada según que el par de loci estudiado pertenezca (izq.) ó no (der.) al mismo grupo de ligamiento.

3.6. Análisis de Expresividad y Penetrancia

Muchos alelos mutantes en *Drosophila* presentan expresión variable del fenotipo en relación a factores físicos, ej. Temperatura. Durante el curso de los experimentos de aislamiento de mutantes y del análisis genético de alelismo, se identificaron cinco alelos mutantes que afectaban la forma de las alas; *blistered* ($bs^{D14.99}$), *blistery* (by^{Q52F56}), *curvi* (cui^{Q46M6}), *jaunty* ($j^{TB38.02}$) y, *wrinkle* ($wr^{TB46.02}$); en los que los individuos de las cepas puras presentaban una expresión menor al 100%. Para determinar si dicha expresión estaba influida por la temperatura y/o por el sexo, los individuos adultos jóvenes de cada mutante se cultivaron a 17°C y 24°C. La progenie

resultante fue anestesiada y clasificada respecto a la presencia del fenotipo mutante o salvaje en cada sexo bajo una lupa estereoscópica. Los datos obtenidos para cada mutante fueron organizados en tres grupos: Fenotipo vs Sexo a 17°C y a 24°C; y Fenotipo vs Temperatura. Posteriormente, estos datos fueron analizados estadísticamente aplicando el test G de independencia, para determinar si los datos obtenidos en cada caso eran independientes o estaban asociados (ANEXO III). Para valores de $G < \chi^2_{0.5[1]} = 3,841$ se aceptó la hipótesis nula, es decir, que los datos de las variables analizadas eran independientes (Sokal & Rohlf, 1981).

3.7. Simbología, Sintonía Génica y Cromosómica

Se adoptó la simbología usada en *D. melanogaster*, en la cual el símbolo asignado a cada locus es una abreviatura del nombre que únicamente designa al locus en cuestión. Los alelos de un mismo locus fueron designados con el mismo nombre y símbolo del locus en cuestión, y diferenciados únicamente por superíndices. En nuestro caso, los superíndices corresponden al código de colecta de las poblaciones naturales analizadas, a excepción de la cepa y^{Manaus}, que fue cedida por Valente (comunicación personal).

Si el gen mutante propuesto presentaba una característica fenotípica muy similar a la de un gen anteriormente reportado, pero su ligamiento no coincidía, se le asignó un nombre tentativo compuesto por: nombre del gen anteriormente reportado seguido de un guion y el número del cromosoma al cual está ligado (ej. delta-2).

De acuerdo a los resultados genéticos obtenidos (análisis de ligamiento e interacción génica), los datos de sintonía génica y cromosómica entre los genes ortólogos de *D. willistoni* y de *D. melanogaster*, y otros datos reportados en la publicación de Lindsley & Zimm (1992) y/o en la base de datos del FlyBase (www.flybase.com), se elaboró una propuesta de ligamiento cromosómico de mutaciones espontáneas en *D. willistoni*.

3.8. Condiciones de Cultivo

Las cepas y cruzamientos experimentales fueron mantenidos a 23±1°C, en tubos de vidrio de aproximadamente 25ml, con medio de cultivo estándar compuesto por levadura, agar, maíz, glucosa, agentes bactericidas y agentes antifúngicos (ANEXO IV);

evitando el exceso de humedad o desecamiento del mismo y la presencia de hongos y bacterias. El cuidado básico de los cultivos se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la tesina de grado de Parada (2004). Las hembras vírgenes fueron colectadas con la ayuda de un aspirador dentro de las tres horas de emergidas, evitando el uso de sustancias químicas anestésicas (trietilamina) que reducen la fertilidad de los individuos (Fresia y col. 2002) y aumenta la proliferación de hongos y bacterias en el medio de cultivo (Tesina de grado Parada, 2004).

4. RESULTADOS

4.1. Lista de Mutantes

En el RECUADRO 1 se presenta la lista de los genes mutantes en *D. willistoni* propuestos en esta pasantía. En ella se especifica el símbolo, nombre y una descripción detallada del fenotipo observado para cada gen mutante, ordenados alfabéticamente de acuerdo al grupo de ligamiento al que fueron asignados.

RECUADRO 1. Descripción de las características fenotípicas de los genes mutantes en *D. willistoni*.

Cromosoma X:

cm, carmine: Color de ojos casi salvaje. En moscas recién emergidas y en moscas viejas, color de ojos carmín opaco. Pseudopupila menos evidente que en el fenotipo salvaje.

cv, crossveinless: Vena transversal anterior y posterior ausentes o solo algunas trazas presentes. Similar a *crossveinless* de *D. melanogaster*.

g, garnet: Color de ojos marrón translucido, oscureciendo con la edad. Pseudopupila no evidente.

l-1, lobe-1: Tamaño de los ojos reducido en forma variable. Ojos ligeramente más pequeños que en el fenotipo salvaje y con una muesca en el borde anterior. La mitad inferior del ojo se encuentra más reducida que la mitad superior. Se solapa con el fenotipo salvaje. Similar a *Lobe* de *D. melanogaster*.

w, white:

w: Color de ojos blanco. Ocelos incoloros. Similar a *white* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950).

w^a: Color de ojos amarillo-naranja. Ocelos con color pálido. Similar a *white apricot* de *D. melanogaster*.

w^{cf}: Color de ojos rojo- rosáceo, luego sepia. Similar a *white coffee* de *D. melanogaster*.

y, yellow: Cutícula amarilla. Color de la pupa más clara que en el fenotipo salvaje. Similar a *yellow* de *D. melanogaster*.

Cromosoma II:

amy, amethyst: Color de ojos purpura claro y opaco en moscas jóvenes,

oscureciendo a púrpura con la edad. Pseudopupila menos evidente que en el fenotipo salvaje. Similar a *amethyst* de *D. melanogaster*.

bs, blistered: Alas con ampollas y vesículas infladas con hemolinfa. Venas más finas que el fenotipo salvaje. La textura del ala parece descolorida y turbia. A baja temperatura, escasa viabilidad. Similar a *balloon* de *D. willistoni* (Ferry et al., 1923) y *blistered* de *D. melanogaster*.

bur, burgundy: Color de ojos rojo amarronado opaco tanto en moscas jóvenes como en moscas viejas. Pseudopupila menos evidente que en el fenotipo salvaje. Similar a *burgundy* de *D. melanogaster*.

bw, brown: Color de ojos amarronado claro en moscas jóvenes, cambiando a marrón rojizo claro en moscas viejas. Pseudopupila no evidente. Similar a *brown* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950) y *brown* de *D. melanogaster*.

Cl, Clipped: Márgenes de las alas con muescas de tamaño variable, más a menudo a lo largo de la vena marginal. Similar a *Clipped* de *D. willistoni* (Ferry et al., 1923).

cn, cinnabar: Color de ojos rojo brillante en moscas jóvenes, cambiando a color de ojos salvaje con la edad. Ocelos incoloros. Similar a *orange* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950), *orange* de *D. paulistorum* (Malogolowkin & Ehrman, 1960) y *cinnabar* de *D. melanogaster*.

cp-2, clipped-2: Márgenes de las alas con muescas, más a menudo a lo largo de la vena marginal. Similar a *clipped* de *D. melanogaster*.

cui, curvi: Mitad distal de las alas curvadas hacia arriba. La curvatura es más acentuada en individuos cultivados a 24°C, pero es poco pronunciada o incluso se solapa con el fenotipo salvaje a 17°C. A baja temperatura, el fenotipo mutante en hembras se solapa con el fenotipo salvaje más que en machos. Muy buena viabilidad. Similar a *curvi* de *D. melanogaster*.

dke, dark eye: Color de ojos rojo oscuro opaco en moscas jóvenes, cambiando a rojo amarronado oscuro con la edad. Pseudopupila menos evidente que en el fenotipo salvaje. Similar a *dark eye* de *D. melanogaster*.

dl-2, delta-2: Segunda vena del ala ensanchada en su unión con el margen, más notorio en hembras que en machos. Similar a *Delta* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950) y *Delta* de *D. melanogaster*.

dre, dark red: Color de ojos rojo oscuro en moscas jóvenes, oscureciendo con la edad. Color más claro que *dke*. Similar a *dark red* de *D. melanogaster*.

eya, eyes absent: Tamaño de los ojos reducido en forma variable, desde ojos sin omatidios hasta ojos con pocos omatidios en una o ambas regiones oculares. La arista de la antena es más corta y delgada que en el fenotipo salvaje. Similar a *eye absent* de *D. melanogaster*.

j, jaunty: Alas curvadas hacia arriba en toda su longitud, pero no enrolladas como en

Cy. Las alas son gruesas y con una textura opaca. En muchos casos, las alas no se despliegan completamente. El grado de curvatura no varía con la temperatura. Expresión variable. Similar a *jaunty* de *D. willistoni* (Ferry et al., 1923) y *jaunty* de *D. melanogaster*.

or, orange: Color de ojos naranja amarillento brillante, virando al marrón con la edad. Pseudopupila no evidente. Ocelos incoloros. Similar a *orange* de *D. melanogaster*.

pab, pale body: Color del cuerpo blancuzco. Similar a *Pale body* de *D. melanogaster*.

po, pale ocelli: Ocelos incoloros. Similar a *pale ocelli* de *D. melanogaster*

pr, purple: Color de ojos purpura al emerger, oscureciendo a rubí morado con la edad. Pseudopupila no evidente. Similar a *purple* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950) y *purple* de *D. melanogaster*.

pu, punch: Color de ojos morado translucido al emerger, oscureciendo con la edad. Similar a *Punch* de *D. melanogaster*.

px, plexus: Alas con venas extras en forma de red. La primera celda posterior entre la vena L3 y L4, se ensancha hacia la punta. Similar a *plexus* de *D. melanogaster*.

sp, speck: Axilas de las alas oscuras, más evidente con la edad. Similar a *speck* de *D. melanogaster*.

wr, wrinkle: Alas arrugadas, con ampollas y curvadas hacia arriba. Expresión variable. Se solapa con el fenotipo salvaje. A baja temperatura, escasa viabilidad. Similar a *Wrinkle* de *D. melanogaster*.

Cromosoma III:

by, blistry: Alas ampolladas en la región proximal y media. Superficie del ala oscura. Expresión variable. Se solapa con el fenotipo salvaje tanto a 17°C como a 24°C. Muy buena viabilidad. Similar a *blistry* de *D. melanogaster*.

ca, claret: Color de ojos escarlata amarronado brillante en moscas jóvenes, cambiando a sepia con la edad. Pseudopupila no evidente. Similar a *claret* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950) y *claret* de *D. melanogaster*.

ca-l, claret-like: Color de ojos similar a *claret* pero más claro y transparente en moscas recién emergidas.

cd, cardinal: Color de ojos bermellón amarillento brillante al emerger, cambiando a rojo opaco en moscas viejas. Pseudopupila no evidente. Ocelos incoloros. Similar a *cardinal* de *D. melanogaster*.

e, ebony: Color del cuerpo negro grisáceo. Color de la pupa más clara que en el fenotipo salvaje. Similar a *ebony* de *D. paulistorum* (Malogolowkin &

Ehrman, 1960) y *ebony* de *D. melanogaster*

gl, glass: Ojos con fenotipo vidrioso y liso, con parches rojos formados por omatidios fusionados y parches de color blanco cremoso. Presenta algunas setas negras en los omatidios. Se observa una muesca sutil de expresión variable en la parte anterior. Tamaño de los ojos variable en ambos sexos. Ocelos incoloros. Fertilidad reducida. Similar a *glass* de *D. paulistorum* (Malogolowkin & Ehrman, 1960) y *glass* de *D. melanogaster*.

hh, hedgehog: Tamaño de los ojos reducido y áspero, con facetas irregulares. Omatidios desordenados. Las setas de los omatidios están ausentes, salvo en el borde posterior. Pseudopupila fragmentada. Expresión variable en ambos sexos. Similar a *hh[bar3]* de *D. melanogaster*.

kay, kayak: El mesotórax presenta una hendidura antero-posterior dorsal. Expresión sensible a la temperatura. Buena viabilidad y fertilidad. Similar a *kayak* de *D. melanogaster*.

ma, maroon: Color de ojos rubí opaco, cambiando al fenotipo salvaje con la edad. Similar a *maroon* de *D. melanogaster*.

p, pink: Color de ojos similar al fenotipo salvaje en moscas jóvenes, cambiando a rubí opaco con tonos morados en moscas viejas. Pseudopupila no evidente. Similar a *pink* de *D. melanogaster*.

ro, rough: Ojos ásperos con facetas irregulares y puntos negros. Similar a *rough* de *D. melanogaster*.

ry, rosy: Color de ojos marrón morado rojizo en moscas jóvenes, oscureciendo con la edad. Similar a *rosy* de *D. melanogaster*.

sh-5, short-5: Venas L5 y L2 cortas, no llegando al margen de las alas. Expresión variable; L2 se superpone con el fenotipo salvaje. Buena viabilidad. Similar a *short-5* de *D. melanogaster*.

ss, spineless: Las moscas presentan pérdida total o disminución en el número de setas escutelares, dorso-centrales, coxales, ocelares, orbitales, notopleurales, posverticales, de los tergitos y del esternón. Expresión variable. Buena Viabilidad. Similar a *aristapedia (ss^a)* de *D. willistoni* (Spassky & Dobzhansky, 1950) y *ss^l* de *D. melanogaster*.

4.2. Análisis de Alelismo

Los datos obtenidos del análisis de alelismo realizado mediante cruzamientos recíprocos entre hembras vírgenes **m₁** con machos jóvenes **m₂** (ANEXO I) de las setenta

y ocho cepas mutantes, se resume en la TABLA 2. Se han identificado un total de cuarenta y un genes diferentes.

Según su fenotipo mutante, la mayor parte de estos genes (diecinueve) afectan el color de ojos (con cuarenta y seis alelos); cinco afectan la forma de los ojos (con seis alelos), once afectan la forma de las alas (con catorce alelos en total), tres influyen en el color del cuerpo (con ocho alelos) y, tres genes afectan la forma del cuerpo (con cuatro alelos).

TABLA 2. Resultado del análisis de alelismo. Los genes mutantes y sus alelos se agrupan según su característica fenotípica, ordenados alfabéticamente según el símbolo de cada gen.

| Loci | Alelos | Loci | Alelos |
|--|--|--|------------------------------|
| Color Ojos (19 loci, 46 alelos) | | Alas (11 loci, 14 alelos) | |
| <i>amy: amethyst</i> | RLN1.00 SG3.03 | <i>bs: blistered</i> | D14.99 |
| <i>bur: burgundy</i> | SMV28.00 | <i>by: blistery</i> | EB1.03 Q52.F56 |
| <i>bw: brown</i> | SG23.00 Sy11.03 Q51.F13 | <i>Cl: Clipped</i> | ES13.99 |
| <i>ca: claret</i> | 98e3.98 ES13.99 | <i>cp-2: clipped-2</i> | TB46.02 |
| <i>ca-l: claret like</i> | Q15.F10 Q52.F51 Q52.F63 | <i>cui: curvi</i> | Q46.M6 |
| <i>cd: cardinal</i> | SG12.00 SG4.01 TB40.02 | <i>cv: crossveinless</i> | EM1.00 |
| <i>cm: carmine</i> | FA30.05 | <i>dl-2: delta-2</i> | Q46.F9 |
| <i>cn: cinnabar</i> | REB1.00 SM35.00 SL7.01 TB26.02 FA2.05 FA22.05 Q46.F32 Q51.F13 | <i>j: jaunty</i> | ST12.01 TB38.02 |
| <i>dke: dark eye</i> | SL13.01 TB28.02 | <i>px: plexus</i> | SGV1.00 SG1.01 |
| <i>dre: dark red</i> | SGV8.00 SL8.02 | <i>sh-5: short-5</i> | SG11.00 |
| <i>g: garnet</i> | EM1.00 | <i>wr: wrinkle</i> | TB46.02 |
| <i>ma: maroon</i> | SB27.02 TB40.02 TB77.02 Riv9.03 FA1.05 | Color Cuerpo (3 loci, 8 alelos) | |
| <i>or: orange</i> | FA7.05 | <i>e: ebony</i> | REB1.00 SB26.02 Q14.F23 |
| <i>p: pink</i> | FA33.05 | <i>pab: pale body</i> | S46.99 |
| <i>po: pale ocelli</i> | Riv1.03 | <i>y: yellow</i> | EM1.00 TB46.02 Manaus Q14.F1 |
| <i>pr: purple</i> | Ey3.99 | Forma Cuerpo (3 loci, 4 alelos) | |
| <i>pu: punch</i> | REM2.00 | <i>kay: kayak</i> | EB2.02 Q51.F14 |
| <i>ry: rosy</i> | ES7.99 SG24.00 SS48.00 SG1.03 FA8.05 | <i>sp: speck</i> | 98e3.98 |
| <i>w: white</i> | EM1.00 Ey10.00 Q14.F11 | <i>ss: spineless</i> | TB37.02 |
| Forma Ojos (5 loci, 6 alelos) | | | |
| <i>eya: eyes absent</i> | TB44.02 | | |
| <i>gl: glass</i> | TB14.02 | | |
| <i>hh: hedgehog</i> | Q02.F7 Q46M8 | | |
| <i>l-1: lobe-1</i> | EM1.00 | | |
| <i>ro: rough</i> | FA11.05 | | |

4.3. Análisis de Ligamiento Cromosómico

Los datos de ligamiento cromosómico obtenidos mediante la realización de cruzamientos recíprocos entre pares de cepas mutantes que presentaran fenotipos claramente distinguibles uno del otro (ANEXO II), permitieron asignar cuarenta y un loci en tres grupos de ligamiento (X, II, y III). Estos datos se resumen en la Figura 5 donde se incluyen datos anteriormente reportados por Goñi *et al.*, 2002; Parada & Goñi, 2003; Ludwing *et al.*, 2003; o no publicados (Goñi, comunicación personal).

Seis loci fueron asignados al cromosoma X de los cuales tres genes afectan el color de ojos, uno la forma de los ojos, otro afecta las alas y uno el color del cuerpo.

| X | II | III |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>cm: carmine</i> | <i>amy: amethyst</i> | <i>by: blistery</i> |
| <i>cv: crossveinless</i> | <i>bs: blistered</i> | <i>ca: claret</i> |
| <i>g: garnet</i> | <i>bur: burgundy</i> | <i>ca-l: claret-like</i> |
| <i>l-1: lobe-1</i> | <i>bw: brown</i> | <i>cd: cardinal</i> |
| <i>w: white</i> | <i>Cl: Clipped</i> | <i>e: ebony</i> |
| <i>y: yellow</i> | <i>cn: cinnabar</i> | <i>gl: glass</i> |
| | <i>cp-2: clipped-2</i> | <i>hh: hedgehog</i> |
| | <i>cui: curvi</i> | <i>kay: kayak</i> |
| | <i>dke: dark eye</i> | <i>ma: maroon</i> |
| | <i>dl-2: delta-2</i> | <i>p: pink</i> |
| | <i>dre: dark red</i> | <i>ro: rough</i> |
| | <i>eya: eyes absent</i> | <i>ry: rosy</i> |
| | <i>j: jaunty</i> | <i>sh-5: short-5</i> |
| | <i>or: orange</i> | <i>ss: spineless</i> |
| | <i>pab: pale body</i> | |
| | <i>po: pale ocelli</i> | |
| | <i>pr: purple</i> | |
| | <i>pu: punch</i> | |
| | <i>px: plexus</i> | |
| | <i>sp: speck</i> | |
| | <i>wr: wrinkle</i> | |

FIGURA 5. Ligamiento cromosómico de cuarenta y un loci en *D. willistoni*. Los genes se encuentran ordenados alfabéticamente según el símbolo de cada gen.

Veintiún loci fueron asignados al grupo de ligamiento II de los cuales diez genes afectan el color de los ojos (y/u ocelos), uno la forma de los ojos, ocho afectan las alas (morfología y venas), uno está involucrado en el color del cuerpo y uno afecta la forma del cuerpo.

Catorce loci fueron asignados al grupo de ligamiento III de los cuales seis genes afectan el color de los ojos, tres la forma de los ojos, dos afectan las alas, uno está involucrado en el color del cuerpo y dos en la forma del cuerpo.

4.4. Interacción Génica

La TABLA 3 resume los datos obtenidos de los cruzamientos genéticos realizados entre mutantes que afectan el color de ojos. Se detectaron ocho interacciones, siete entre genes mutantes ligados a distintos cromosomas (II y III), y una entre genes mutantes ligados al mismo cromosoma (II).

TABLA 3. Resultado de la Interacción Génica observada entre mutantes que afectan el color de ojos en *D. willistoni*.

| Cruzamiento * | Color de los ojos de la F2 |
|--|---|
| Cr. II x Cr. II | |
| <i>bw</i> ^{SG23.00} x <i>cn</i> ^{SM35.00} | Blanco |
| <i>bw</i> ^{Q51.F13} x <i>cn</i> ^{Q51.F13} | Blanco |
| Cr. II x Cr. III | |
| <i>amy</i> ^{RLN1.00} x <i>cd</i> ^{SG12.00} | Rojizo claro en moscas jóvenes |
| <i>bw</i> ^{SG23.00} x <i>cd</i> ^{SG12.00} | Blanco en moscas jóvenes, amarronado c/manchas en moscas viejas |
| <i>cn</i> ^{FA2.02} x <i>ca</i> ^{98e3.98} | Damasco |
| <i>cn</i> ^{SM35.00} x <i>ca</i> ^{98e3.98} | Damasco |
| <i>cn</i> ^{FA2.05} x <i>ma</i> ^{FA1.05} | Damasco claro |
| <i>cn</i> ^{SM35.00} x <i>ma</i> ^{FA1.05} | Damasco claro |
| <i>cn</i> ^{FA22.05} x <i>ry</i> ^{SS48.00} | Damasco claro cremoso |
| <i>dke</i> ^{TB28.02} x <i>cd</i> ^{SG12.00} | Rojizo brillante en moscas recién emergidas |
| <i>or</i> ^{FA7.05} x <i>ca</i> ^{98e3.98} | Damasco opaco, ocelos incoloros |
| <i>or</i> ^{FA7.05} x <i>ca</i> ^{ES13.99} | Damasco opaco, ocelos incoloros |
| ♂ <i>or</i> ^{FA07.05} x ♀ <i>p</i> ^{FA33.05} | Damasco amarillento |

* Salvo que se indique, las hembras están del lado izquierdo de la columna.

4.5. Análisis de Mutantes con Expresividad y Penetrancia Variable

Los datos obtenidos del análisis de penetrancia respecto al sexo y la temperatura, para cinco cepas mutantes *blistered* ($bs^{D14.99}$); *blistery* (by^{Q52F56}); *curvi* (cui^{Q46M6}); *jaunty* ($j^{TB38.02}$); y *wrinkle* ($wr^{TB46.02}$); y el valor G calculado en cada caso, se muestran en la TABLA 4.

Para la mutante $j^{TB38.02}$, los valores de G obtenidos sugieren que las variables “fenotipo vs sexo” para ambas temperaturas, y “fenotipo vs temperatura”, son independientes.

Para la mutante cui^{Q46M6} , el valor G obtenido en el experimento realizados a 24°C, sugiere que el fenotipo observado es independiente del sexo. Sin embargo, los valores de G obtenidos en los otros dos análisis, sugieren que a 17°C el fenotipo no es independiente del sexo y que, además, depende de la temperatura de cultivo. La expresión del fenotipo mutante fue más extrema (curvatura del ala bien acentuada) en machos que en hembras. De la misma manera aquellos individuos que se cultivaron a 24°C presentaron una mayor curvatura en el ala respecto a los cultivados a 17°C.

Para las mutantes by^{Q52F56} y $wr^{TB46.02}$, los valores de G obtenidos para cada caso sugieren que, el fenotipo observado depende tanto del sexo como de la temperatura de cultivo. La expresión del fenotipo mutante en la cepa by^{Q52F56} fue más marcada en hembras que en machos. En general, las hembras presentaron ampollas de tamaño medio en ambas alas, mientras que los machos presentaron ampollas más pequeñas y generalmente en una sola de las alas.

Las moscas de la mutante $bs^{D14.99}$ cultivadas a 17°C no dieron progenie. La relación entre el fenotipo y el sexo a 24°C, presentó un valor G que sugiere independencia entre esas variables.

En las mutantes by^{Q52F56} , cui^{Q46M6} y $wr^{TB46.02}$, que presentaron un efecto de la temperatura sobre el fenotipo, se observó una menor penetrancia a 17°C respecto a 24°C, excepto en $wr^{TB46.02}$, que presentó un efecto contrario.

TABLA 4. Datos fenotípicos observados a 17°C y 24°C para las cepas mutantes *blistered* (*bs*^{D14.99}); *blistry* (*by*^{Q52F56}); *curvi* (*cui*^{Q46M6}); *jaunty* (*j*^{TB38.02}); y *wrinkle* (*wr*^{TB46.02}), y los valores G calculados en cada caso.

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|-----|-------|-----------------------|------|------|-------|-------------------------|-------------|------|-------|--|
| <i>bs</i> ^{D14.99} | | | | | | | | | | | | |
| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | | Fenotipo vs Sexo 24°C | | | | Fenotipo vs Temperatura | | | | |
| Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Temperatura | | Total | |
| | ♀ | ♂ | | | ♀ | ♂ | | 17°C | 24°C | | | |
| [m] | 0 | 0 | 0 | [m] | 625 | 537 | 1162 | [m] | 0 | 1162 | 1162 | |
| [+] | 0 | 0 | 0 | [+] | 9 | 4 | 13 | [+] | 0 | 13 | 13 | |
| Total | 0 | 0 | 0 | Total | 634 | 541 | 1175 | Total | 0 | 1175 | 1175 | |
| G = 1,276 | | | | | | | | | | | | |
| <i>by</i> ^{Q52F56} | | | | | | | | | | | | |
| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | | Fenotipo vs Sexo 24°C | | | | Fenotipo vs Temperatura | | | | |
| Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Temperatura | | Total | |
| | ♀ | ♂ | | | ♀ | ♂ | | 17°C | 24°C | | | |
| [m] | 493 | 289 | 782 | [m] | 1236 | 999 | 2235 | [m] | 782 | 2235 | 3017 | |
| [+] | 205 | 323 | 528 | [+] | 149 | 249 | 398 | [+] | 528 | 398 | 926 | |
| Total | 698 | 612 | 1310 | Total | 1385 | 1248 | 2633 | Total | 1310 | 2633 | 3943 | |
| G = 74,784 | | | | G = 43,446 | | | | G = 295,372 | | | | |
| <i>cui</i> ^{Q46M6} | | | | | | | | | | | | |
| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | | Fenotipo vs Sexo 24°C | | | | Fenotipo vs Temperatura | | | | |
| Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Temperatura | | Total | |
| | ♀ | ♂ | | | ♀ | ♂ | | 17°C | 24°C | | | |
| [m] | 109 | 402 | 511 | [m] | 1259 | 1248 | 2507 | [m] | 511 | 2507 | 3018 | |
| [+] | 402 | 103 | 505 | [+] | 15 | 10 | 25 | [+] | 505 | 25 | 530 | |
| Total | 511 | 505 | 1016 | Total | 1274 | 1258 | 2532 | Total | 1016 | 2532 | 3548 | |
| G = 367,818 | | | | G = 0,954 | | | | G = 1302,816 | | | | |
| <i>j</i> ^{TB38.02} | | | | | | | | | | | | |
| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | | Fenotipo vs Sexo 24°C | | | | Fenotipo vs Temperatura | | | | |
| Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Temperatura | | Total | |
| | ♀ | ♂ | | | ♀ | ♂ | | 17°C | 24°C | | | |
| [m] | 471 | 395 | 866 | [m] | 1281 | 1139 | 2420 | [m] | 866 | 2420 | 3286 | |
| [+] | 1 | 1 | 2 | [+] | 3 | 7 | 10 | [+] | 2 | 10 | 12 | |
| Total | 472 | 396 | 868 | Total | 1284 | 1146 | 2430 | Total | 868 | 2430 | 3298 | |
| G = 0,016 | | | | G = 2,142 | | | | G = 0,636 | | | | |
| <i>wr</i> ^{TB46.02} | | | | | | | | | | | | |
| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | | Fenotipo vs Sexo 24°C | | | | Fenotipo vs Temperatura | | | | |
| Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Sexo | | Total | Fenotipo | Temperatura | | Total | |
| | ♀ | ♂ | | | ♀ | ♂ | | 17°C | 24°C | | | |
| [m] | 78 | 47 | 125 | [m] | 327 | 165 | 492 | [m] | 125 | 492 | 617 | |
| [+] | 2 | 23 | 25 | [+] | 28 | 156 | 184 | [+] | 25 | 184 | 209 | |
| Total | 80 | 70 | 150 | Total | 355 | 321 | 676 | Total | 150 | 676 | 826 | |
| G = 27,818 | | | | G = 150,778 | | | | G = 7,768 | | | | |

4.6. Sintenía Génica y Cromosómica

La TABLA 5 resume los datos de sintenía génica y cromosómica entre los genes descritos para *D. melanogaster* y los genes (ortólogos) propuestos para *D. willistoni*, para los mutantes de interés. Se observa que solamente el 47% (10 de 21) de los genes propuestos para el cromosoma II, presentan genes ortólogos en *D. willistoni*, el resto (11 genes) poseen homologías únicamente con respecto al ligamiento cromosómico. En el caso del cromosoma III, la mayoría de los genes propuestos presentan genes ortólogos en *D. willistoni*. La mayoría estos mutantes son nuevas marcas genéticas, salvo algunos previamente reportados en *D. willistoni* (ver columna “Referencias”).

TABLA 5. Sintenía génica y cromosómica entre los genes de *D. melanogaster* y *D. willistoni* analizados en esta pasantía, según datos del Flybase (www.flybase.org)

| <i>Genes ligados al cromosoma II</i> | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| <i>D. melanogaster</i> | | <i>D. willistoni</i> | | |
| Genes | Mapa Citogenético | Anotación Genómica | Ubicación Cromosómica | Referencias |
| <i>amy, amethyst</i> | 2 | ---- | | |
| <i>bs, blistered</i> | 2R: 60C6-60C7 | Dwil\GK22205 | Müller C | |
| <i>bur, burgundy</i> | 2L: 39A7-39B1 | Dwil\GK21111 | Müller B | |
| <i>bw, brown</i> | 2R: 59E2-59E3 | Dwil\GK23049 | Müller C | <i>bw</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>cn, cinnabar</i> | 2R: 43E16-43E16 | ---- | | <i>or</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>cui, curvi</i> | 2 | ---- | | |
| <i>dke, dark eye</i> | 2 | ---- | | |
| <i>dre, dark red</i> | 2 | ---- | | |
| <i>eya, eyes absent</i> | 2L: 26E1-26E2 | Dwil\GK14797 | Müller B | |
| <i>j, jaunty (nimA)</i> | 2L: 34E5-34E5 | Dwil\GK15022 | Müller B | |
| <i>or, orange</i> | 2R: 60A14-60A14 | Dwil\GK15725 | Müller C | |
| <i>Pab, Pale body</i> | 2 | ---- | | |
| <i>po, pale ocelli</i> | 2 | ---- | | |
| <i>pr, purple</i> | 2L: 38B3-38B3 | Dwil\GK18684 | Müller B | <i>pr</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>Pu, Punch</i> | 2R: 57C7-57C8 | Dwil\GK21906 | Müller C | |
| <i>px, plexus</i> | 2R: 58E4-58E8 | Dwil\GK22138 | Müller C | <i>px</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>sp, speck</i> | 2: 60C1-60C2 | ---- | | |
| <i>Wr, Wrinkle</i> | 2 | ---- | | |

TABLA 5. (Continuación)

| <i>Genes ligados al cromosoma III</i> | | | | |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| <i>D. melanogaster</i> | | <i>D. willistoni</i> | | |
| Genes | Mapa Citogenético | Anotación Genómica | Ubicación Cromosómica | Referencias |
| <i>by, blistery</i> | 3R: 85D19-85D22 | Dwil\GK13836 | Müller E-F | |
| <i>ca, claret</i> | 3R: 99C2-99C2 | Dwil\GK22629 | Müller E-F | <i>ca</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>cd, cardinal</i> | 3: 94A1-94E2 | ---- | | |
| <i>cp, clipped</i> | 3: 75D4-76B9 | ---- | | |
| <i>DI, Delta</i> | 3R: 92A1-92A2 | Dwil\GK13480 | Müller E-F | <i>DI</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |
| <i>e, ebony</i> | 3R: 93C7-93D1 | Dwil\GK12773 | Müller E-F | |
| <i>gl, glass</i> | 3R: 91A3-91A3 | Dwil\GK11495 | Müller E-F | |
| <i>hh, hedgehog</i> | 3R: 94E1-94E1 | Dwil\GK12833 | Müller E-F | |
| <i>kay, kayak</i> | 3R: 99B10-99C1 | Dwil\GK11924 | Müller E-F | <i>kay</i> , Hudson et al. 2007 |
| <i>ma, maroon</i> | 3: 84B-84B | ---- | | |
| <i>p, pink</i> | 3R: 85A6-85A6 | ---- | | |
| <i>ro, rough</i> | 3R: 97D4-97D5 | Dwil\GK13741 | Müller E-F | |
| <i>ry, rosy</i> | 3R: 87D9-87D9 | Dwil\GK12225 | Müller E-F | <i>ry</i> , Tarrio et al. 2003 |
| <i>sh-5, short-5</i> | 3 | ---- | | |
| <i>ss, spineless</i> | 3R: 89B14-89B15 | Dwil\GK13504 | Müller E-F | <i>ss</i> , Spassky & Dobzhansky 1950 |

4.7. Propuesta de Ligamiento Cromosómico de Mutantes en *D. willistoni*

La Figura 6 presenta en forma gráfica el resumen de los datos genéticos de los genes mutantes de *D. willistoni* propuestos en esta pasantía.

Los datos del análisis de alelismo y del análisis de ligamiento entre mutantes, junto con los datos obtenidos de interacción génica entre mutantes de color de ojos, la descripción detallada de cada cepa mutante, y los datos obtenidos de la búsqueda de posible sintenia génica entre algunos genes ortólogos de *D. melanogaster* y *D. willistoni* publicados en Flybase, permitieron asignar cada grupo de ligamiento a un cromosoma determinado.

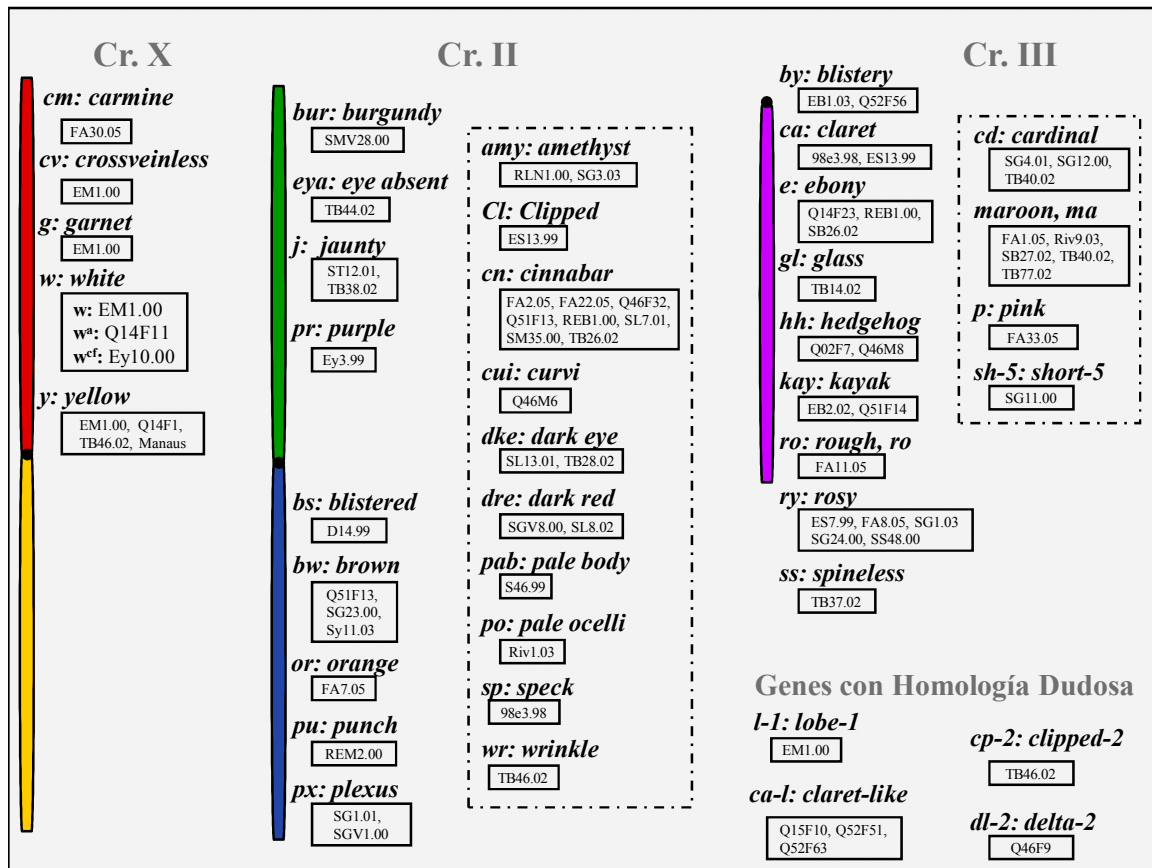


FIGURA 6. Propuesta de Ligamiento cromosómica de los genes mutantes de *D. willistoni*. Para cada cromosoma se muestra los genes con secuencias ortólogas (izq.) y los genes que solo poseen información del ligamiento cromosómico (der., recuadro punteado).

5. DISCUSIÓN

Basándonos en las propuestas de sintenia génica de los elementos de Müller en *Drosophila*, esta pasantía presenta el ligamiento genético de mutaciones espontaneas que afectan el fenotipo visible en adultos de *D. willistoni* (FIGURA 6). Se identificaron un total de cuarenta y un loci diferentes; seis ligados al cromosoma X, veintiuno al cromosoma II y catorce al cromosoma III. La designación de los genes mutantes y su ligamiento cromosómico se ha basado en los siguientes argumentos:

- A) Homología fenotípica con los mutantes previamente descritos para *D. willistoni* por otros autores (Lancefied & Metz, 1922; Ferry & col., 1923; Spassky & Dobzhansky, 1950; Poulson & Counce, 1960) y con mutantes descritas para *D. melanogaster* (Lindsley & Zimm, 1992; Flybase: www.flybase.org)
- B) Datos genéticos de los análisis de alelismo, ligamiento genético y detección de interacción génica.
- C) Datos genéticos y de ligamiento reportados anteriormente por otros autores, en especial Spassky & Dobzhansky (1950) y datos de sintenia génica (ortólogos) y cromosómica entre *D. willistoni* y *D. melanogaster* obtenida del Flybase (www.flybase.org).

El mapa de ligamiento presentado aquí incluye la revisión de mutantes en *D. willistoni* descritas anteriormente de forma preliminar en Parada & Goñi (2003). Algunas mutantes han retenido su designación original: *ca*^{ES13.99}; *Cl*^{ES13.99}; *cv*^{EM1.00}; *w*^{EM1.00}; *y*^{EM1.00}; *y*^{TB46.02}; otras han sido renombradas: *cp-2*^{TB46.02} (designada previamente como *Clipped*); *e*^{SB26.02} y *e*^{REB1.00} (designadas como *black*); *g*^{EM1.00} (designada como *pink*); y *wr*^{TB46.02} (designada como *balloon*), y otra han sido reasignada a un nuevo grupo de ligamiento: *eya*^{TB44.02}, designada originalmente como *eyeless* ligada al cromosoma III (Ludwing *et al.*, 2003). Asimismo, se asignaron nombres a otras mutantes descritas previamente en Parada & Goñi (2003).

Entre las mutantes de *D. willistoni* aquí descritas (ver RECUADRO 1), 46% (19 genes) son genes que afectan el color de ojos. Salvo aquellas mutantes notoriamente conocidas (ej. *brown*, *purple*, *white*), el análisis fenotípico fue engorroso, en especial por contar solo con la descripción de algunas mutantes en *D. willistoni* (Lancefied &

Metz, 1922; Ferry & col., 1923; Spassky & Dobzhansky, 1950; Poulson & Counce, 1960) y/o aquellas mutantes descritas para *D. melanogaster* (Lindsley & Zimm, 1992; Flybase: www.flybase.org). A pesar de ello, los datos genéticos de alelismo y ligamiento nos permitieron asignar estos genes a un determinado grupo de ligamiento y posteriormente, los datos de interacción génica aquí presentados fueron relevantes para asignar cada grupo de ligamiento a un determinado cromosoma. El ejemplo más emblemático es el caso de la mutación *brown*. Al igual que *brown* de *D. melanogaster* (Flybase: www.flybase.org), los alelos mutantes *brown* de *D. willistoni* ($bw^{SG23.00}$ y bw^{Q51F13}), interaccionan con *cinnabar* ($cn^{SM35.00}$ y cn^{Q51F13}) perteneciente al mismo grupo de ligamiento, el cromosoma II de *D. willistoni*.

Algunas mutantes autosómicas cuyo fenotipo es fácilmente distinguible, y que poseen buena viabilidad y homología fenotípica con *D. melanogaster*, fueron considerados como loci de referencia del cromosoma II: *brown*, *jaunty* y *plexus*; y del cromosoma III; *ebony* y *hedgehog*. A pesar de que *ebony* no presenta tan buena viabilidad, dicha mutante ha sido utilizada como una excelente marca genética en los análisis de ligamiento por ser la única mutante autosómica que afecta el color del cuerpo.

A continuación se discute cada grupo de ligamiento en relación a las marcas genéticas propuestas en esta pasantía.

Cromosoma X:

Seis loci fueron asignados al cromosoma X, todos ellos asignados al elemento A de Müller. Entre ellos se encuentran tres loci notoriamente conocidos, *crossveinless*, *white* y *yellow* y dos loci, *carmine* y *garnet*, cuyo mapeo genético deberá ser analizado. Por último, denominamos *lobe-1* a un mutante que presenta buena homología fenotípica con *Lobe* (cromosoma II) descrito para *D. melanogaster*, pero con homología incierta. Dicha cepa mutante se ha perdido, lo cual imposibilita todo futuro análisis genético.

No se ha identificado ninguna mutación homóloga a genes que mapean en el elemento de Müller D. Ello no es sorprendente, puesto que en otras especies de *Drosophila* como *D. pseudoobscura* y *D. persimilis*, donde el elemento A se halla fusionado con el elemento D, no se han encontrados muchas marcas fenotípicas en este último elemento (Schaeffer et al., 2008).

Cromosoma II:

Veintiún loci fueron asignados al cromosoma II, cinco de ellos (*brown*, *orange*, *Delta*, *purple* y *plexus*) han sido reportados previamente para *D. willistoni* por otros autores (Spassky & Dobzhansky, 1950).

Este cromosoma está formado por la fusión de los elementos de Müller B y C. El 47% (10 de 21) de los genes mutantes propuestos para el cromosoma II presentan secuencia ortóloga en *D. willistoni*, lo cual facilitará significativamente su utilización en futuros análisis de mapeo genético (y físico), y cuya información podría ser relevante en el ensamblaje de los *scaffolds* para este cromosoma. Según Schaeffer *et al.* (2008), en uno de los *scaffolds* (181009) del elemento C (2L), se detectó un error en el ensamblaje; en el cual doscientos treinta y un genes ortólogos correspondieron al elemento C y ochenta al elemento D. Solo dos marcas distales del 2L, *brown* y *plexus*, fueron utilizadas como marcas genéticas en la orientación de los *scaffolds*, por lo cual es deseable ampliar el número de marcas en el cromosoma II de *D. willistoni*.

Otros mutantes propuestos para este cromosoma, presentan homología con genes de *D. melanogaster* de los que solo se tiene información del mapa físico (cromosomas politénicos). En otros casos (*amethyst*, *curvi*, *dark eye*, *dark red*, *Pale body*, *pale ocelli* y *Wrinkle*), la información reportada para *D. melanogaster* (Lindsley & Zimm, 1992; Flybase: www.flybase.org) es muy escasa y solo se conoce el ligamiento cromosómico, lo cual dificulta en gran medida su mapeo físico a futuro, pero no su mapeo genético en el cromosoma II de *D. willistoni*.

Cabe destacar, que dos loci que afectan el color de ojos (*cinnabar* y *orange*), presentaron interacción génica con otros mutantes de color de ojos. Al igual que la interacción génica reportada para *cinnabar* y *orange* de *D. melanogaster* (Flybase: www.flybase.org), los alelos mutantes *cinnabar* ($cn^{FA2.05}$ y $cn^{SM35.00}$) y *orange* ($or^{FA7.05}$) de *D. willistoni*, interaccionan respectivamente con *claret* ($ca^{98e3.983}$) y *pink* ($p^{FA33.05}$), ambos genes ligados al cromosoma III. Ello apoya la homología génica entre nuestros mutantes y aquellos reportados para *D. melanogaster*.

Finalmente, dos loci, designados como *delta-2* ($dl-2^{Q46F9}$) y *clipped-2* ($cp-2^{TB46.02}$), presentan similitud fenotípica pero no homología cromosómica con *D. melanogaster*. Futuros estudios genéticos serán necesarios para determinar la homología génica de *delta-2* y *clipped-2* con *Delta* y *Clipped* de *D. melanogaster*, e investigar la

ocurrencia de complejos reordenamientos cromosómicos entre los genomas de estas dos especies.

Cromosoma III:

Catorce loci fueron asignados al cromosoma III, cuatro de ellos (*claret*, *kayak*, *rosy* y *spineless*) han sido reportados previamente para *D. willistoni* por otros autores (Spassky & Dobzhansky, 1950; Tarrío *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 2007). Un aspecto que llama la atención es que, 42% (6 de 14) de los loci asignados a este cromosoma corresponden a genes que afectan el color de ojos.

La mayoría de los genes mutantes propuestos presentan secuencia ortóloga en *D. willistoni*, aunque ninguno de ellos fue utilizado como marcas genéticas en la orientación de los *scaffolds*. Esto brinda una gran oportunidad para reexaminar la región media y distal del cromosoma III, puesto que en la región proximal, donde se encuentra la fusión entre los elementos E y F, existen tres genes del minicromosoma “dot” fusionado que han permitido posicionar la base del *scaffold* 1 (Papaceit & Juan, 1998; Schaeffer *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2011). Dicha región está siendo reexaminada por Panzera y col. de la Sección Genética Evolutiva, mediante técnicas de hibridación *in situ*.

Un aspecto a destacar, es la diferencia entre la cantidad de genes mutantes encontrados para el cromosoma II y III. Mientras que el cromosoma III, formado únicamente por los elementos de Müller E-F, presentó catorce marcas fenotípicas; el cromosoma II, formado por dos elementos de Müller (B y C), presentó solo veintiuna marcas. Esta diferencia coincide con lo reportado por Schaeffer *et al.* (2008), donde se destaca la falta de marcas fenotípicas para el cromosoma II de *D. willistoni*

En todos los casos, asumimos, pero no demostramos homología génica entre los mutantes de *D. willistoni* con los reportados para *D. melanogaster*.

Expresividad y penetrancia genética

Los resultados del análisis de expresividad y penetrancia realizado en mutantes que afectaban la forma de las alas (*bs*^{D14.99}; *by*^{Q52F56}; *cui*^{Q46M6}; *j*^{TB38.02}; *wr*^{TB46.02}) indican la influencia del sexo y la temperatura sobre el fenotipo mutante.

En cuanto a la influencia del sexo, las mutantes *blistery* y *wrinkle* presentaron una menor penetrancia en machos que en hembras para las temperaturas estudiadas, mientras que las moscas *curvi* presentaron una menor penetrancia en hembras (a 17°C) o no presentaron diferencias (a 24°C). En cuanto a la influencia de la temperatura, las mutantes *blistery* y *curvi* presentaron una menor penetrancia a 17°C, mientras que *wrinkle* mostró una menor penetrancia a 24°C. La mutante *jaunty* no presentó cambios significativos en la penetrancia respecto al sexo y la temperatura. Para el caso de *bs*^{D14.99}, no tenemos datos suficientes que nos permitan determinar el efecto del sexo y de la temperatura sobre la expresividad y penetrancia.

Asombrosamente, no hemos encontrado un efecto de la temperatura y/o del sexo en la expresión y penetrancia para los genes homólogos anteriormente descritos en *D. melanogaster*. Ello nos permite plantear dos posibles hipótesis: los genes en *D. willistoni* presentan un comportamiento diferente en cuanto a su expresión y penetrancia a los genes homólogos en *D. melanogaster*; ó la hipótesis menos plausible, que se trata de distintos genes a los designados aquí.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se ha logrado resumir toda la información genética de los mutantes de *D. willistoni* actualizados hasta el presente, incluyendo datos publicados y datos no reportados hasta el presente.

Se ha presentado una propuesta de ligamiento cromosómico y confeccionado una lista de genes mutantes, basada en un exhaustivo análisis genético.

Se logró identificar, entre los mutantes analizados, aquellos que representan loci de referencia para los cromosomas II y III.

Se presentan nuevas marcas genéticas en todos los grupos de ligamiento de *D. willistoni*, con la respectiva información actualizada de la sintenia génica (ortólogos) y cromosómica con respecto a *D. melanogaster*.

La disponibilidad de cepas mutantes en *D. willistoni* y su información genética constituyen una herramienta valiosa para los análisis de la genética evolutiva en *Drosophila*, entre ellos: analizar el mapeo genético para las cepas estudiadas, investigar la naturaleza molecular de los alelos mutantes, investigar el papel de los elementos transponibles y su relación con inversiones cromosómicas, y detectar la ocurrencia de crossing-over en machos, entre otros.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ashburner, M. 1989. *Drosophila*. A laboratory handbook. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ayala, F.J.; Tracey, M.L.; Hedgecock, D. & Richmond, R.C. 1974. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution*, 28: 576-592.
- Burla, H.; Da Cunha, A.B.; Cordeiro, A.R.; Dobzhansky, T.; Malagolowkin, C. & Pavan, C. 1949. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 3: 300-314.
- Cordeiro, A. R. & Winge, H. 1995. Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levine, L. (ed) *Genetics of natural populations. The continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 262-280.
- Da Cunha, A.B.; Dobzhansky, T.; Pavlovsky, O.; & Spassky, B. 1959. Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution*, 13: 389-404.
- Da Cunha, A.B. & Dobzhansky, T. 1954. A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution*, 8: 119-134.
- Da Cunha, A.B.; Burla, H. & Dobzhansky, T. 1950. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 4: 212-235.
- Dobzhansky, T. & Powell, J.R. 1975. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Handbook of Genetics*. (R.C. King, ed.) n° 3: 589-622.
- Dobzhansky, T. 1957. Genetics of natural populations. XXVI Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution*, 11: 280-293.
- Dobzhansky, T.; Ehrman, L. & Pavlovsky, O. 1957. *Drosophila insularis*, a new sibling species of the *willistoni* group. *Univ Texas Publ*, 5721: 39-47
- Dobzhansky, T. 1950. The chromosomes of *Drosophila willistoni*. *Journal of Heredity*, 41: 156-158.
- Dobzhansky, T. 1946. Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. *Ecology*, 27: 205-211.
- Ehrman, L. & Powell, J.R. 1982. The Genetics and Biology of *Drosophila*, 3b (Ashburner, M., H. L. Carson and J.N. Thompson, jr., eds), pp: 193-225. London Academic Press.
- Ferry, R M.; Lancefield, R. C. & Metz, C. W. 1923. Additional mutant characters in *Drosophila willistoni*. *J. Heredity*, 14: 372-384.
- FlyBase Consortium. 2009. <http://flybase.org/>
- Fresia, P.; Graneri, J. & Goñi, B. 2002. Anesthetic effects of two chemicals on the fertility of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service*, Norman, Oklahoma (USA), 84: 141-142.

- Garcia, A.C.L.; Rohde, C.; Audino, G.F.; Valente, V.L.S. & Valiati, V.H. 2006. Identification of the sibling species of *the Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretical mobility of acid phosphatase-1. *J Zool Syst Evol Res*, 44: 212-216.
- Gleason, J.M.; Griffith, E.C. & Powell, J.R. 1998. A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concepts? *Evolution*, 52: 1093-1103.
- Goñi, B.; Parada, C.; Rohde, C. & Valente, V.L.S. 2002. Genetic characterization of spontaneous mutations in *Drosophila willistoni*. I. Exchange and non-disjunction of the X chromosome. *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)*, 85: 80-84.
- Goñi, B.; Martínez, M.E.; Techera, G. & Fresia, P. 2002. Increased frequencies of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Uruguay. *Drosophila Information Service, Norman, Oklahoma (USA)*, 85: 75-80.
- Goñi, B.; Fresia, P.; Calviño, M.; Ferreiro, M.J.; Valente, V.L.S. & Basso da Silva, L. 2001. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in southern localities of Uruguay. *Drosophila Information Service, Norman, Oklahoma (USA)*, 84: 61-65.
- Goñi, B.; Martínez, M. E; Valente, V. L. S. & Vilela, C. R. 1998. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Revta. Bras. Ent.* 42: 131-140.
- Goñi, B.; Martínez, M.E. & Daguer, P. 1997. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. *Revta. Bras. Ent.*, 41: 89-93.
- Lancefield, R.C. & Metz, C.W. 1922. The sex-linked group of mutant characters in *Drosophila willistoni*. *American Naturalist*, 56: 211-241.
- Lindsley, D.L. & Zimm, G.G. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc, San Diego.
- Ludwig, A.; Parada, C.; Goñi, B. & Loreto, E.L.S. 2003. Genetics and molecular analysis of a *Drosophila willistoni* spontaneous mutation similar to eyeless. *Drosophila Information Service, Norman, Oklahoma (USA)*, 86: 138-143.
- Malogolowkin, C. & Ehrman, L. 1960. Mutant genes and linkage relationships in *Drosophila paulistorum*. *Evolution*, 14: 266-270.
- Metz, C.W.; Moses, M.S. & Mason, E.D. 1923. Genetic studies on *Drosophila virilis* with consideration on the genetics of other species of *Drosophila*. *Publs Carnegie Institute*, 328: 1-94.
- O'Grady, P.M. & Kidwell, M.G. 2002. Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 22: 442-453.
- Papaceit, M. & Juan, E. 1998. Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by in situ hybridization. *Chromosome Res.* 6(1): 49-54.
- Parada, C. 2004. Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.

- Parada, C. & Goñi, B. 2003. Hypermutable strains isolated from Uruguayan populations of *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae). *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)*, 86: 143-146.
- Poulson, D.F. & Counce, S.J. 1960. *Drosophila willistoni*. New mutants report. *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)*, 34: 69.
- Poulson, D.F. & Counce, S.J. 1960. 'Non-mendelizing' phenotypes in *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)*, 34: 101-102.
- Powell, J.R.; Dion, K.; Papaceit, M.; Aguadé, M.; Vicario, S.; Garrick, R.C. 2011. Nonrecombining genes in a recombination environment: the *Drosophila* "dot" chromosome. *Mol. Biol. Evol.* 28(1): 825-833.
- Robe, L.J.; Cordeiro, J.; Loreto, E.L.S. & Valente, V.L.S. 2010. Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Genetica*. 138(6): 601-617.
- Rohde, C.; Garcia, A.C.L.; Valiati, V.H. & Valente, V.L.S. 2006. Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). *Genetica*, 126: 77-88.
- Schaeffer, S.W.; Bhutkar, A.; McAllister, B.F.; Matsuda, M.; Matzkin, L.M.; O'Grady, P.M.; Rohde, C.; Valente, V.L.S.; Aguadé, M.; Anderson, W.W.; Edwards, K.; Garcia, A.C.L.; Goodman, J.; Hartigan, J.; Kataoka, E.; Lapoint, R.T.; Lozovsky, E.R.; Machado, C.A.; Noor, M.A.F.; Papaceit, M.; Reed, L.K.; Richards, S.; Rieger, T.T.; Russo, S.M.; Sato, H.; Segarra, C.; Smith, D.R.; Smith, T.F.; Strelets, V.; Tobarí, Y.N.; Tomimura, Y.; Wasserman, M.; Watts, T.; Wilson, R.; Yoshida, K.; Therese, A.; Markow, Gelbart, W.M. & Kaufman, T.C. 2008. Polytene Chromosomal Maps of 11 *Drosophila* Species: The Order of Genomic Scaffolds Inferred From Genetic and Physical Maps. *Genetics*, 179: 1601-1655.
- Sokal, R.R & Rohlf, J. 1981. *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*. 2nd ed. W.H. Freeman and Co. New York.
- Spassky, B.; Richmond, R. C.; Pérez-Salas, S.; Pavlovsky, O.; Mourão, C. A.; Hunter, A. S.; Hoenigsberg, H.; Dobzhansky, T. & Ayala, F. J. 1971. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni* and the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution*, 25: 129-143.
- Spassky, B. 1957. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *University of Texas Publ.* 5721: 48-61.
- Spassky, B. & Dobzhansky, T. 1950. Comparative genetics of *Drosophila willistoni*. *Heredity*, 4: 201-215.
- Sturtevant, A.H. & Novitski, E. 1941. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics*, 26: 517-541.
- Sturtevant, A.H. 1916. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. *Ann Entomol Soc Am*, 9: 323-343.
- Tarrío, R.; Rodríguez-Trelles, F. & Ayala, F.J. 2000. Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: the *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. *Mol Phylogenet Evol*, 16: 344-349.

Valente, V.L.S.; Goñi, B.; Valiati, V.H.; Rohde, C. & Morales, N.B. 2003. Chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* populations from Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (2): 163-173.

Valente, V.L.S.; Rohde, C.; Valiati, V.H.; Morales, N.B. & Goñi, B. 2001. Chromosome inversions occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* Norman, Oklahoma (USA), 84: 55-59.

ANEXO I

Cruzamientos Genéticos Realizados para el análisis de Alelismo

(No se detallan los cruces recíprocos)

| Color de Ojos | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-----|-------------------------------|-------------------------------|-----|------------------------------|--------------------------------|-----|
| m1 | m2 | F1 | m1 | m2 | F1 | m1 | m2 | F1 |
| <i>amy</i> ^{RLN1.00} | <i>amy</i> ^{SG3.03} | [m] | | <i>dke</i> ^{SL13.01} | [+] | <i>cd</i> ^{SG12.00} | <i>cd</i> ^{TB40.02} | [m] |
| | <i>bur</i> ^{SMV28.00} | [+] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [+] |
| | <i>bw</i> ^{SG23.00} | [+] | | <i>pu</i> ^{REM2.00} | [+] | | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [+] |
| | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [+] | | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] | | <i>dke</i> ^{TB28.02} | [+] |
| | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [+] | <i>bw</i> ^{Sy11.03} | <i>cn</i> ^{FA2.05} | [+] | | <i>ma</i> ^{FA1.05} | [+] |
| | <i>dre</i> ^{SGV8.00} | [+] | <i>ca</i> ^{98e3.98} | <i>ca</i> ^{ES13.99} | [m] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] |
| | <i>dre</i> ^{SL8.02} | [+] | | <i>ca-l</i> ^{Q15F10} | [+] | | <i>p</i> ^{FA33.05} | [+] |
| | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>ca-l</i> ^{Q52F51} | [+] | | <i>ry</i> ^{ES7.99} | [+] |
| | <i>pu</i> ^{REM2.02} | [+] | | <i>cd</i> ^{SG12.00} | [+] | | <i>ry</i> ^{FA8.05} | [+] |
| | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] | | <i>cd</i> ^{TB40.02} | [+] | | <i>ry</i> ^{SS48.00} | [+] |
| | <i>ry</i> ^{SS48.00} | [+] | | <i>cn</i> ^{FA2.05} | [+] | <i>cd</i> ^{TB40.02} | <i>ma</i> ^{FA1.05} | [+] |
| <i>amy</i> ^{SG3.03} | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [+] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] |
| | <i>dke</i> ^{SL13.01} | [+] | | <i>ma</i> ^{FA1.05} | [+] | | <i>p</i> ^{FA33.05} | [+] |
| | <i>dke</i> ^{TB28.02} | [+] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | <i>cm</i> ^{FA30.05} | <i>ma</i> ^{TB40.02} | [+] |
| | <i>ma</i> ^{TB77.02} | [+] | | <i>p</i> ^{FA33.05} | [+] | | <i>w</i> ^{EM1.00} | [+] |
| | <i>ry</i> ^{SG1.03} | [+] | | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] | | <i>w</i> ^{cf Ey10.00} | [+] |
| <i>bur</i> ^{SMV28.00} | <i>bw</i> ^{SG23.00} | [+] | | <i>ry</i> ^{ES7.99} | [+] | <i>cn</i> ^{FA2.05} | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [m] |
| | <i>cd</i> ^{SG12.00} | [+] | | <i>ry</i> ^{FA8.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{Q46F32} | [m] |
| | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [+] | <i>ca</i> ^{ES13.99} | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |
| | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [+] | | <i>p</i> ^{FA33.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{TB26.02} | [m] |
| | <i>dke</i> ^{SL13.01} | [+] | | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] | | <i>ma</i> ^{FA1.05} | [+] |
| | <i>dre</i> ^{SGV8.00} | [+] | | <i>ca-l</i> ^{Q15F10} | [m] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] |
| | <i>dre</i> ^{SL8.02} | [+] | | <i>ca-l</i> ^{Q52F51} | [m] | | <i>p</i> ^{FA33.05} | [+] |
| | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>ca-l</i> ^{Q52F63} | [m] | | <i>po</i> ^{Riv1.03} | [+] |
| | <i>pu</i> ^{REM2.00} | [+] | | <i>cd</i> ^{SG12.00} | [+] | | <i>cn</i> ^{FA22.05} | [m] |
| | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] | | <i>ma</i> ^{TB40.02} | [+] | | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |
| | <i>ry</i> ^{FA8.05} | [+] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] |
| <i>bw</i> ^{Q51F13} | <i>bw</i> ^{SG23.00} | [m] | <i>ca-l</i> ^{Q52F51} | <i>ca-l</i> ^{Q52F63} | [m] | | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | [+] |
| | <i>bw</i> ^{Sy11.03} | [m] | | <i>or</i> ^{FA7.05} | [+] | | <i>ry</i> ^{SS48.00} | [+] |
| <i>bw</i> ^{SG23.00} | <i>bw</i> ^{Sy11.00} | [m] | <i>ca-l</i> ^{Q52F63} | <i>pu</i> ^{REM2.00} | [+] | <i>cn</i> ^{FA22.05} | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |
| | <i>cd</i> ^{SG12.00} | [+] | <i>cd</i> ^{SG4.01} | <i>cd</i> ^{SG12.00} | [m] | | <i>cn</i> ^{SL7.01} | [m] |
| | <i>cd</i> ^{TB40.02} | [+] | | <i>cd</i> ^{TB40.02} | [m] | <i>cn</i> ^{Q46F32} | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |
| | <i>cn</i> ^{FA2.05} | [+] | | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [+] | <i>cn</i> ^{Q51F13} | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |
| | | | | | | <i>cn</i> ^{REB1.00} | <i>cn</i> ^{SM35.00} | [m] |

| Color de ojos (Cont.) | | | | | | Forma de Ojos | | |
|-----------------------|--------------------|-----|-------------------|-------------------|-----|--------------------|-------------------|-----------|
| m1 | m2 | F1 | m1 | m2 | F1 | m1 | m2 | F1 |
| <i>cn</i> SL7.01 | <i>cn</i> SM35.00 | [m] | <i>p</i> FA33.05 | <i>pr</i> Ey3.99 | [+] | <i>eya</i> TB44.02 | <i>gl</i> TB14.02 | [+] |
| | <i>dre</i> SL8.02 | [+] | | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | | <i>l-l</i> EM1.00 | [+] |
| <i>cn</i> SM35.00 | <i>dke</i> SL13.01 | [+] | | <i>ry</i> ES7.99 | [+] | | <i>ro</i> FA11.05 | [+] |
| | <i>dke</i> TB28.02 | [+] | | <i>ry</i> FA8.05 | [+] | <i>gl</i> TB14.02 | <i>ro</i> FA11.05 | [+] |
| | <i>ma</i> FA1.05 | [+] | <i>pr</i> Ey3.99 | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | <i>hh</i> Q02F7 | <i>hh</i> Q46M8 | [m] |
| | <i>po</i> Riv1.03 | [+] | | <i>ry</i> FA8.05 | [+] | <i>l-l</i> EM1.00 | <i>ro</i> FA11.05 | [+] |
| | <i>pr</i> Ey3.99 | [+] | <i>ry</i> ES7.99 | <i>ry</i> FA8.05 | [m] | | | |
| | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | | <i>ry</i> SG24.00 | [m] | | | |
| <i>dke</i> SL13.01 | <i>dke</i> TB28.02 | [m] | <i>ry</i> FA8.05 | <i>ry</i> SG1.03 | [m] | Forma de Alas | | |
| | <i>dre</i> SGV8.00 | [+] | <i>ry</i> SG1.03 | <i>ry</i> SS48.00 | [m] | <i>m1</i> | <i>m2</i> | <i>F1</i> |
| | <i>dre</i> SL8.02 | [+] | <i>ry</i> SG24.00 | <i>ry</i> SS48.00 | [m] | <i>bs</i> D14.99 | <i>by</i> EB1.03 | [+] |
| | <i>or</i> FA7.05 | [+] | | | | | <i>by</i> Q52F56 | [+] |
| | <i>pr</i> Ey3.99 | [+] | | | | | <i>wr</i> TB46.02 | [+] |
| | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | | | | <i>by</i> EB1.03 | <i>by</i> Q52F56 | [m] |
| <i>dke</i> TB28.02 | <i>ry</i> FA8.05 | [+] | | | | | <i>wr</i> TB46.02 | [+] |
| | <i>ry</i> SS48.00 | [+] | | | | <i>by</i> Q52F56 | <i>wr</i> TB46.02 | [+] |
| <i>dre</i> SGV8.00 | <i>dre</i> SL8.02 | [m] | | | | <i>cui</i> Q46M6 | <i>j</i> TB38.02 | [+] |
| | <i>ry</i> SG1.03 | [+] | | | | <i>j</i> TB38.02 | <i>j</i> ST12.01 | [m] |
| <i>dre</i> SL8.02 | <i>or</i> FA7.05 | [+] | | | | <i>px</i> SG1.01 | <i>px</i> SGV1.01 | [m] |
| | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | | | | | | |
| <i>ma</i> FA1.05 | <i>ma</i> SB27.02 | [m] | | | | | | |
| | <i>ma</i> TB77.02 | [m] | | | | | | |
| | <i>p</i> FA33.05 | [+] | | | | | | |
| | <i>po</i> Riv1.03 | [+] | | | | | | |
| | <i>ry</i> FA8.05 | [+] | | | | | | |
| <i>ma</i> Riv9.03 | <i>ma</i> SB27.02 | [m] | | | | | | |
| | <i>ma</i> TB77.02 | [m] | | | | | | |
| | <i>ry</i> SS48.00 | [+] | | | | | | |
| <i>ma</i> SB27.02 | <i>ma</i> TB40.02 | [m] | | | | | | |
| | <i>ry</i> SS48.00 | [+] | | | | | | |
| <i>ma</i> TB40.02 | <i>p</i> FA33.05 | [+] | | | | | | |
| <i>or</i> FA7.05 | <i>p</i> FA33.05 | [+] | | | | | | |
| | <i>po</i> Riv1.03 | [+] | | | | | | |
| | <i>pr</i> Ey3.99 | [+] | | | | | | |
| | <i>pu</i> REM2.00 | [+] | | | | | | |
| | <i>ry</i> ES7.99 | [+] | | | | | | |

| Color del Cuerpo | | |
|------------------|------------------|-----|
| m1 | m2 | F1 |
| <i>e</i> Q14F23 | <i>e</i> REB1.00 | [m] |
| | <i>e</i> SB26.02 | [m] |
| <i>e</i> REB1.00 | <i>e</i> SB26.02 | [m] |
| <i>y</i> Q14F1 | <i>y</i> Manaus | [m] |

| Forma del Cuerpo | | |
|-------------------|-------------------|-----|
| m1 | m2 | F1 |
| <i>cv</i> EM1.00 | <i>ss</i> TB37.02 | [+] |
| <i>kay</i> EB2.02 | <i>kay</i> Q51F14 | [m] |

ANEXO II

Cruzamientos Realizados para el análisis de Ligamiento Cromosómico

(No se detallan aquí los cruces recíprocos)

| Cr. II x Cr. III | | | | | |
|--------------------------------|--|-------------------------------|--|------------------------------|--|
| m1 | m2 | m1 | m2 | m1 | m2 |
| <i>amy</i> ^{RLN1.00} | <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>e</i> ^{REB1.00} | <i>dke</i> ^{SL13.01} | <i>kay</i> ^{EB2.02} | <i>pr</i> ^{Ey3.99} | <i>by</i> ^{EB1.03} <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>kay</i> ^{EB2.02} |
| <i>amy</i> ^{SG3.03} | <i>ry</i> ^{SG1.03} | <i>dke</i> ^{TB28.02} | <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ry</i> ^{FA8.05} | <i>pu</i> ^{REM2.02} | <i>e</i> ^{SB26.02} <i>sh-5</i> ^{SG11.00} |
| <i>bs</i> ^{D14.99} | <i>ca-l</i> ^{Q52F63} <i>kay</i> ^{EB2.02} | <i>dl-2</i> ^{Q46F9} | <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>ro</i> ^{FA11.05} | <i>px</i> ^{SG1.01} | <i>ca-l</i> ^{Q15F10} <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>hh</i> ^{Q46M8} <i>kay</i> ^{EB2.02} <i>ma</i> ^{FA1.05} <i>ma</i> ^{TB40.02} <i>p</i> ^{FA33.05} <i>ro</i> ^{FA11.05} <i>ry</i> ^{FA8.05} <i>ry</i> ^{SS48.00} |
| <i>bur</i> ^{SMV28.00} | <i>e</i> ^{SB26.02} <i>hh</i> ^{Q02F7} | <i>dre</i> ^{SGV8.00} | <i>hh</i> ^{Q02F7} | <i>wr</i> ^{TB46.02} | <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ma</i> ^{FA1.05} |
| <i>bw</i> ^{SG23.00} | <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>cd</i> ^{TB40.02} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ro</i> ^{FA11.05} <i>sh-5</i> ^{SG11.00} <i>ss</i> ^{TB37.02} | <i>dre</i> ^{SL8.02} | <i>sh-5</i> ^{SG11.00} | | |
| <i>cn</i> ^{FA2.05} | <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>kay</i> ^{EB2.02} <i>ma</i> ^{FA1.05} <i>p</i> ^{FA33.05} <i>ro</i> ^{FA11.05} | <i>eya</i> ^{TB44.02} | <i>by</i> ^{EB1.03} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>kay</i> ^{EB2.02} | | |
| <i>cn</i> ^{FA22.05} | <i>ry</i> ^{SS48.00} | <i>j</i> ^{TB38.02} | <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>ca-l</i> ^{Q15F10} <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>gl</i> ^{TB14.02} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ma</i> ^{FA1.05} <i>ma</i> ^{TB40.02} <i>p</i> ^{FA33.05} <i>ro</i> ^{FA11.05} <i>ry</i> ^{FA8.05} | | |
| <i>cn</i> ^{SM35.00} | <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>e</i> ^{Q14F23} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ma</i> ^{FA1.05} <i>ro</i> ^{FA11.05} <i>sh-5</i> ^{SG11.00} | <i>or</i> ^{FA7.05} | <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>ca</i> ^{ES13.99} <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>p</i> ^{FA33.05} <i>ro</i> ^{FA11.05} | | |
| <i>cp-2</i> ^{TB46.02} | <i>cd</i> ^{SG12.00} | <i>pab</i> ^{S46.99} | <i>hh</i> ^{Q02F7} | | |
| <i>cui</i> ^{Q46M6} | <i>ca</i> ^{98e3.98} <i>cd</i> ^{SG12.00} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ro</i> ^{FA11.05} | <i>po</i> ^{Riv1.03} | <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>kay</i> ^{EB2.02} <i>ma</i> ^{FA1.05} | | |

| Cr. II x Cr. II | |
|--------------------------------|---|
| m1 | m2 |
| <i>amy</i> ^{RLN1.00} | <i>j</i> ^{TB38.02} <i>px</i> ^{SG1.01} |
| <i>bs</i> ^{D14.99} | <i>bw</i> ^{SG23.00} <i>cn</i> ^{Q46F32} <i>or</i> ^{FA7.05} |
| <i>bur</i> ^{SMV28.00} | <i>cui</i> ^{Q46M6} <i>px</i> ^{SG1.01} |
| <i>bw</i> ^{SG23.00} | <i>cui</i> ^{Q46M6} <i>dl-2</i> ^{Q46F9} <i>j</i> ^{TB38.02} <i>px</i> ^{SG1.01} <i>wr</i> ^{TB46.02} |
| <i>cn</i> ^{FA2.05} | <i>cui</i> ^{Q46M6} <i>dl-2</i> ^{Q46F9} <i>j</i> ^{TB38.02} |
| <i>cn</i> ^{Q46F32} | <i>j</i> ^{TB38.02} |
| <i>cn</i> ^{SM35.00} | <i>cui</i> ^{Q46M6} <i>j</i> ^{ST12.01} <i>pab</i> ^{S46.99} <i>wr</i> ^{TB46.02} |
| <i>cui</i> ^{Q46M6} | <i>or</i> ^{FA7.05} |
| <i>dke</i> ^{SL13.01} | <i>wr</i> ^{TB46.02} |
| <i>dke</i> ^{TB28.02} | <i>j</i> ^{TB38.02} <i>pab</i> ^{S46.99} <i>px</i> ^{SG1.01} |
| <i>dl-2</i> ^{Q46F9} | <i>pr</i> ^{Ey3.99} |
| <i>dre</i> ^{SGV8.00} | <i>j</i> ^{TB38.02} <i>px</i> ^{SGV1.00} |
| <i>dre</i> ^{SL8.02} | <i>j</i> ^{TB38.02} |
| <i>eya</i> ^{TB44.02} | <i>px</i> ^{SG1.01} |
| <i>j</i> ^{TB38.02} | <i>or</i> ^{FA7.05} <i>po</i> ^{Riv1.03} <i>pu</i> ^{REM2.02} |
| <i>or</i> ^{FA7.05} | <i>px</i> ^{SG1.01} |
| <i>pr</i> ^{Ey3.99} | <i>px</i> ^{SG1.01} <i>wr</i> ^{TB46.02} |
| <i>pu</i> ^{REM2.02} | <i>px</i> ^{SG1.01} |

| Cr. III x Cr. III | |
|-------------------------------|--|
| m1 | m2 |
| <i>by</i> ^{EB1.03} | <i>e</i> ^{Q14F23} <i>hh</i> ^{Q02F7} |
| <i>by</i> ^{Q52F56} | <i>ca-l</i> ^{Q52F63} |
| <i>ca</i> ^{98e3.98} | <i>e</i> ^{REB1.00} |
| <i>ca</i> ^{ES13.99} | <i>ro</i> ^{FA11.05} |
| <i>ca-l</i> ^{Q15F10} | <i>hh</i> ^{Q02F7} |
| <i>cd</i> ^{SG12.00} | <i>e</i> ^{Q14F23} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>ss</i> ^{TB37.02} |
| <i>cd</i> ^{TB40.02} | <i>e</i> ^{REB1.00} |
| <i>e</i> ^{Q14F23} | <i>gl</i> ^{TB14.02} <i>hh</i> ^{Q02F7} <i>kay</i> ^{EB2.02} <i>ma</i> ^{TB40.02} <i>ro</i> ^{FA11.05} |
| <i>gl</i> ^{TB14.02} | <i>kay</i> ^{EB2.02} <i>ro</i> ^{FA11.05} |
| <i>hh</i> ^{Q02F7} | <i>kay</i> ^{EB2.02} |
| <i>kay</i> ^{EB2.02} | <i>ro</i> ^{FA11.05} |
| <i>p</i> ^{FA33.05} | <i>sh-5</i> ^{SG11.00} |

ANEXO III

Tablas de contingencia y cálculos del test G de independencia realizados para el análisis de penetrancia

Modelo estadístico aplicado:

| Variable A vs Variable B | | | |
|--------------------------|------------|-----|---------|
| Variable B | Variable B | | Total |
| | B1 | B2 | |
| A1 | a | b | a+b |
| A2 | c | d | c+d |
| Total | a+c | b+d | a+b+c+d |

$Q1 = \sum f_{cel} \ln f_{cel} = a \ln a + b \ln b + c \ln c + d \ln d$
 $Q2 = \sum f_{tot} \ln f_{tot} = (a+b) \ln (a+b) + (c+d) \ln (c+d) + (a+c) \ln (a+c) + (b+d) \ln (b+d)$
 $Q3 = n \ln n$, siendo $n = a+b+c+d$

$G = 2 (Q1 - Q2 + Q3)$

Si $G < 3,841$ » la variable A es independiente de la variable B (Sokal & Rohlf, 1981)

bs D14.99

| Fenotipo vs Sexo 24°C | | | |
|-----------------------|------|-----|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 625 | 537 | 1162 |
| [+] | 9 | 4 | 13 |
| Total | 634 | 541 | 1175 |

$Q1 = 625 \ln 625 + 537 \ln 537 + 9 \ln 9 + 4 \ln 4$
 $Q1 = 4023,595 + 3375,581 + 19,775 + 5,545$
 $Q1 = 7424,496$
 $Q2 = 1162 \ln 1162 + 13 \ln 13 + 634 \ln 634 + 541 \ln 541$
 $Q2 = 8201,277 + 33,344 + 4090,599 + 3404,740$
 $Q2 = 15729,960$
 $Q3 = 1175 \ln 1175$
 $Q3 = 8306,102$

$G = 2 (7424,496 - 15729,960 + 8306,102)$ » **$G = 1,276$**

by Q52F56

| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | |
|-----------------------|------|-----|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 493 | 289 | 782 |
| [+] | 205 | 323 | 528 |
| Total | 698 | 612 | 1310 |

$Q1 = 493 \ln 493 + 289 \ln 289 + 205 \ln 205 + 323 \ln 323$
 $Q1 = 3056,851 + 1637,597 + 1091,217 + 1866,182$
 $Q1 = 7651,847$
 $Q2 = 782 \ln 782 + 528 \ln 528 + 698 \ln 698 + 612 \ln 612$
 $Q2 = 5209,570 + 3310,083 + 4570,657 + 3927,040$
 $Q2 = 17017,350$
 $Q3 = 1310 \ln 1310$
 $Q3 = 9402,895$

$G = 2 (7651,847 - 17017,350 + 9402,895)$ » **$G = 74,784$**

Fenotipo vs Sexo 24°C

| Fenotipo | Sexo | | Total | Q1= 1236 ln 1236 + 999 ln 999 + 149 ln 149 + 249 ln 249 Q1 = 8799,870 + 6899,848 + 745,588 + 1373,846 Q1 = 17819,152 |
|----------|------|------|-------|--|
| | ♀ | ♂ | | |
| [m] | 1236 | 999 | 2235 | Q2 = 2235 ln 2235 + 398 ln 398 + 1385 ln 1385 + 1248 ln 1248 Q2 = 17236,312 + 2382,608 + 10018,336 + 8897,363 Q2 = 38534,619 |
| [+] | 149 | 249 | 398 | Q3 = 2633 ln 2633 Q3 = 20737,190 |
| Total | 1385 | 1248 | 2633 | |

$$G = 2 (17819,152 - 38534,619 + 20737,190) \gg \boxed{G = 43,446}$$

Fenotipo vs Temperatura

| Fenotipo | Temperatura | | Total | Q1= 782 ln 782 + 2235 ln 2235 + 528 ln 528 + 398 ln 398 Q1 = 5209,570 + 17236,312 + 3310,083 + 2382,608 Q1 = 28138,573 |
|----------|-------------|------|-------|--|
| | 17°C | 24°C | | |
| [m] | 782 | 2235 | 3017 | Q2 = 3017 ln 3017 + 926 ln 926 + 1310 ln 1310 + 2633 ln 2633 Q2 = 24172,259 + 6325,389 + 9402,895 + 20737,190 Q2 = 60637,733 |
| [+] | 528 | 398 | 926 | Q3 = 3943 ln 3943 Q3 = 32646,846 |
| Total | 1310 | 2633 | 3943 | |

$$G = 2 (28138,573 - 60637,733 + 32646,846) \gg \boxed{G = 295,372}$$

cui Q46M6

Fenotipo vs Sexo 17°C

| Fenotipo | Sexo | | Total | Q1= 109 ln 109 + 402 ln 402 + 402 ln 402 + 103 ln 103 Q1 = 511,357 + 2410,574 + 2410,574 + 477,377 Q1 = 5809,882 |
|----------|------|-----|-------|--|
| | ♀ | ♂ | | |
| [m] | 109 | 402 | 511 | Q2 = 511 ln 511 + 505 ln 505 + 511 ln 511 + 505 ln 505 Q2 = 3186,785 + 3143,402 + 3186,785 + 3143,402 Q2 = 12660,374 |
| [+] | 402 | 103 | 505 | Q3 = 1016 ln 1016 Q3 = 7034,401 |
| Total | 511 | 505 | 1016 | |

$$G = 2 (5809,882 - 12660,374 + 7034,401) \gg \boxed{G = 367,818}$$

Fenotipo vs Sexo 24°C

| Fenotipo | Sexo | | Total | Q1= 1259 ln 1259 + 1248 ln 1248 + 15 ln 15 + 10 ln 10 Q1 = 8986,834 + 8897,363 + 40,621 + 23,026 Q1 = 17947,844 |
|----------|------|------|-------|---|
| | ♀ | ♂ | | |
| [m] | 1259 | 1248 | 2507 | Q2 = 2507 ln 2507 + 25 ln 25 + 1274 ln 1274 + 1258 ln 1258 Q2 = 19621,893 + 80,472 + 9108,994 + 8978,696 Q2 = 37790,055 |
| [+] | 15 | 10 | 25 | Q3 = 2532 ln 2532 Q3 = 19842,688 |
| Total | 1274 | 1258 | 2532 | |

$$G = 2 (17947,844 - 37790,055 + 19842,688) \gg \boxed{G = 0,954}$$

| Fenotipo vs Temperatura | | | |
|-------------------------|-------------|------|-------|
| Fenotipo | Temperatura | | Total |
| | 17°C | 24°C | |
| [m] | 511 | 2507 | 3018 |
| [+] | 505 | 25 | 530 |
| Total | 1016 | 2532 | 3548 |

$Q1 = 511 \ln 511 + 2507 \ln 2507 + 505 \ln 505 + 25 \ln 25$
 $Q1 = 3186,785 + 19621,893 + 3143,402 + 80,472$
 $Q1 = 26032,552$
 $Q2 = 3018 \ln 3018 + 530 \ln 530 + 1016 \ln 1016 + 2532 \ln 2532$
 $Q2 = 24181,271 + 3324,625 + 7034,406 + 19842,688$
 $Q2 = 54382,990$
 $Q3 = 3548 \ln 3548$
 $Q3 = 29001,846$

$G = 2 (26032,552 - 54382,990 + 29001,846) \gg \mathbf{G = 1302,816}$

j TB38.02

| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | |
|-----------------------|------|-----|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 471 | 395 | 866 |
| [+] | 1 | 1 | 2 |
| Total | 472 | 396 | 868 |

$Q1 = 471 \ln 471 + 395 \ln 395 + 1 \ln 1 + 1 \ln 1$
 $Q1 = 2898,938 + 2361,660 + 0 + 0$
 $Q1 = 5260,598$
 $Q2 = 866 \ln 866 + 2 \ln 2 + 472 \ln 472 + 396 \ln 396$
 $Q2 = 5857,524 + 1,386 + 2906,094 + 2368,640$
 $Q2 = 11133,644$
 $Q3 = 868 \ln 868$
 $Q3 = 5873,054$

$G = 2 (5260,598 - 11133,644 + 5873,054) \gg \mathbf{G = 0,016}$

| Fenotipo vs Sexo 24°C | | | |
|-----------------------|------|------|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 1281 | 1139 | 2420 |
| [+] | 3 | 7 | 10 |
| Total | 1284 | 1146 | 2430 |

$Q1 = 1281 \ln 1281 + 1139 \ln 1139 + 3 \ln 3 + 7 \ln 7$
 $Q1 = 9166,063 + 8016,175 + 3,296 + 13,621$
 $Q1 = 17199,155$
 $Q2 = 2420 \ln 2420 + 10 \ln 10 + 1284 \ln 1284 + 1146 \ln 1146$
 $Q2 = 18855,485 + 23,026 + 9190,532 + 8072,462$
 $Q2 = 36141,505$
 $Q3 = 2430 \ln 2430$
 $Q3 = 18943,421$

$G = 2 (17199,155 - 36141,505 + 18943,421) \gg \mathbf{G = 2,142}$

| Fenotipo vs Temperatura | | | |
|-------------------------|-------------|------|-------|
| Fenotipo | Temperatura | | Total |
| | 17°C | 24°C | |
| [m] | 866 | 2420 | 3286 |
| [+] | 2 | 10 | 12 |
| Total | 868 | 2430 | 3298 |

$Q1 = 866 \ln 866 + 2420 \ln 2420 + 2 \ln 2 + 10 \ln 10$
 $Q1 = 5857,524 + 18855,485 + 1,386 + 23,026$
 $Q1 = 24737,421$
 $Q2 = 3286 \ln 3286 + 12 \ln 12 + 868 \ln 868 + 2430 \ln 2430$
 $Q2 = 26608,143 + 29,819 + 5873,054 + 18943,421$
 $Q2 = 51454,437$
 $Q3 = 3298 \ln 3298$
 $Q3 = 26717,334$

$G = 2 (24737,421 - 51454,437 + 26717,334) \gg \mathbf{G = 0,636}$

wr TB46.02

| Fenotipo vs Sexo 17°C | | | |
|-----------------------|------|----|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 78 | 47 | 125 |
| [+] | 2 | 23 | 25 |
| Total | 80 | 70 | 150 |

$Q1 = 78 \ln 78 + 47 \ln 47 + 2 \ln 2 + 23 \ln 23$
 $Q1 = 339,823 + 180,957 + 1,386 + 72,116$
 $Q1 = 594,282$
 $Q2 = 125 \ln 125 + 25 \ln 25 + 80 \ln 80 + 70 \ln 70$
 $Q2 = 603,539 + 80,472 + 350,562 + 297,395$
 $Q2 = 1331,968$
 $Q3 = 150 \ln 150$
 $Q3 = 751,595$

$$G = 2 (594,282 - 1331,968 + 751,595) \gg \mathbf{G = 27,818}$$

| Fenotipo vs Sexo 24°C | | | |
|-----------------------|------|-----|-------|
| Fenotipo | Sexo | | Total |
| | ♀ | ♂ | |
| [m] | 327 | 165 | 492 |
| [+] | 28 | 156 | 184 |
| Total | 355 | 321 | 676 |

$Q1 = 327 \ln 327 + 165 \ln 165 + 28 \ln 28 + 156 \ln 156$
 $Q1 = 1893,317 + 842,481 + 93,302 + 787,777$
 $Q1 = 3616,877$
 $Q2 = 492 \ln 492 + 184 \ln 184 + 355 \ln 355 + 321 \ln 321$
 $Q2 = 3049,651 + 959,548 + 2084,602 + 1852,633$
 $Q2 = 7946,434$
 $Q3 = 676 \ln 676$
 $Q3 = 4404,946$

$$G = 2 (3616,877 - 7946,434 + 4404,946) \gg \mathbf{G = 150,778}$$

| Fenotipo vs Temperatura | | | |
|-------------------------|-------------|------|-------|
| Fenotipo | Temperatura | | Total |
| | 17°C | 24°C | |
| [m] | 125 | 492 | 617 |
| [+] | 25 | 184 | 209 |
| Total | 150 | 676 | 826 |

$Q1 = 125 \ln 125 + 492 \ln 492 + 25 \ln 25 + 184 \ln 184$
 $Q1 = 603,539 + 3049,651 + 80,472 + 959,548$
 $Q1 = 4693,210$
 $Q2 = 617 \ln 617 + 209 \ln 209 + 150 \ln 150 + 676 \ln 676$
 $Q2 = 3964,144 + 1116,548 + 751,595 + 4404,946$
 $Q2 = 10237,233$
 $Q3 = 826 \ln 826$
 $Q3 = 5547,907$

$$G = 2 (4693,210 - 10237,233 + 5547,907) \gg \mathbf{G = 7,768}$$

ANEXO IV

Medio de cultivo

Beatriz Goñi

Lab. Drosophila, Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias, 2009

Medio de cultivo:

| Materiales | 500ml | 1lt | 2lt |
|-----------------------------|--------------|-------------|---------------|
| Agar | 4 | 8 gr/lt | 16 |
| Levadura seca | 20 | 40gr/lt | 80 |
| Harina de maíz | 40 | 80gr/lt | 160 |
| Glucosa en polvo (Dextrosa) | 50 | 100gr/lt | 200 |
| Ácido Propiónico | 1.5 | 3ml/lt | 6 |
| Nipagin (sol.concen. 10%) | 3.5 (4.5) ml | 7 (9) ml/lt | 14 (18) ml/lt |

Preparación:

- 1) 2/3 del Agua fría, agregar Agar + Levadura. Cocer a fuego fuerte revolviendo constantemente hasta que rompa el hervor.
- 2) Aparte, mezclar 1/3 del Agua fría + Maíz. Agregar a la preparación primera una vez que ésta haya hervido. Revolver bien y cocinar hasta que rompa el hervor.
- 3) Luego bajar el fuego y agregar la glucosa. Revolver bien y cocinar hasta que rompa el hervor.
- 4) Apagar el fuego. Agregar ác. propiónico y nipagin al mismo tiempo. Revolver bien. Luego que el medio de cultivo se enfríe un poco, dosificar en tubos limpios.

Agar: Se utiliza para solidificar el medio de cultivo. Usar “AGAR-AGAR 900” comercial.

Levadura: Fuente de proteínas. Usar levadura seca ó levadura fresca de los panaderos (en este último caso utilizar 25gr/litro).

Harina de Maíz: Material de sostén, relleno. Otros materiales de relleno son: harina de soya y la malta. La harina de soya es utilizada también como material proteico. La malta se usa también para inducir ovoposición en varias especies de *Drosophila*.

Glucosa (=Dextrosa): Fuente de energía. Usar glucosa en polvo comercial, puede ser reemplazada por melaza ó azúcar morena pero no usar azúcar (sucrosa) pues estimula el crecimiento de la levaduras.

Agentes antibacterianos y fungicidas: Se usan productos químicos que se emplean en la conservación de los alimentos en la industria. Ellos son: Acido propiónico y n-Butyl (ó methyl)-p-hydroxybenzoate= "Nipagin".