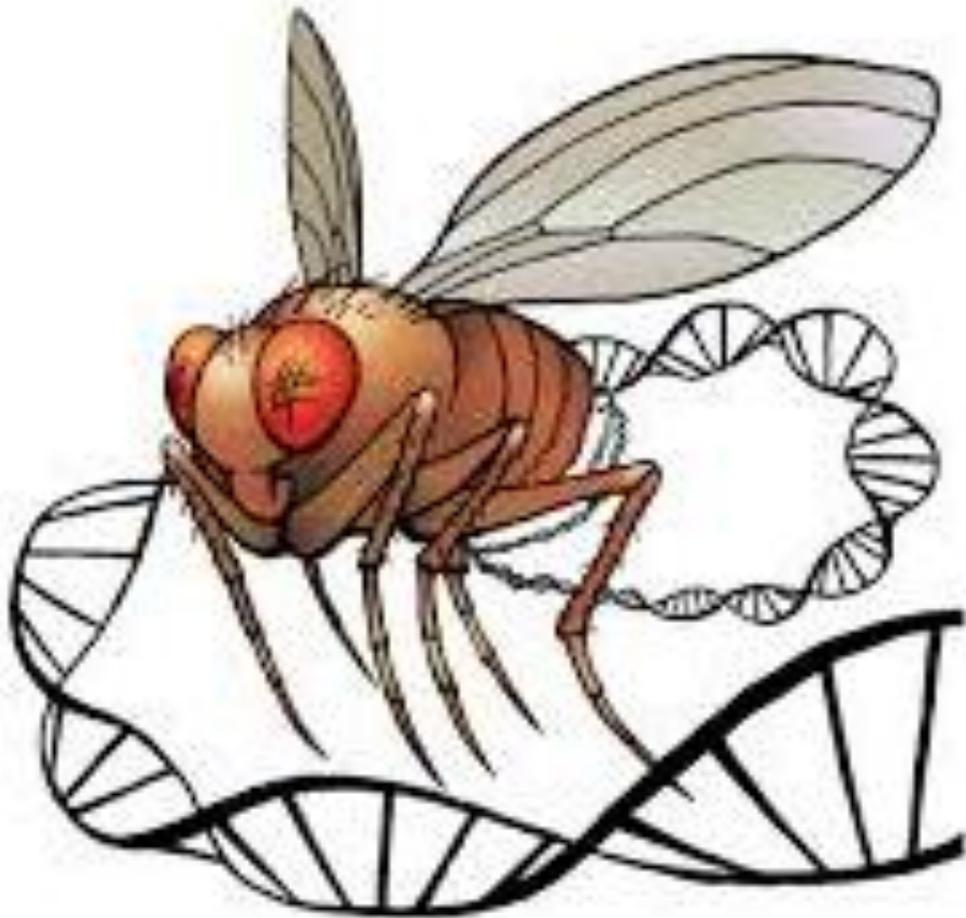


PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA 2014
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis de la Recombinación en Machos
de *Drosophila willistoni*



Bach. Yanina Rosario Leone Gallinares

Orientadora: Dra. Beatriz Goñi

Co-orientadora: Lic. Ana María Soler

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR

AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora Dra. Beatriz Goñi, por abrirme las puertas del laboratorio, proponerme el tema de esta pasantía y guiarme durante el desarrollo de la misma. Por su confianza y apoyo.

A mi co-orientadora Lic. Ana Soler, por su invaluable apoyo y estímulo a continuar. Por brindarme herramientas para poder desarrollar esta tesina y otras actividades académicas.

A las Dras. Gabriela Bedó y Cristina Mazzella por aceptar formar parte del tribunal, y por las correcciones realizadas.

A mis compañeros del Laboratorio de *Drosophila*, por su amistad, apoyo y por generar un cálido ambiente de trabajo. A las Licenciadas Cristina Parada y Ana María Soler por la caracterización y descripción de las cepas empleadas, y a Bachs. Sebastián Mateos y Sebastián Rodríguez por proporcionarme las cepas marcadoras e información no publicada de la posición de los genes mutantes en el mapa genético de *D. willistoni*.

A los integrantes de la sección Genética Evolutiva por el compañerismo y el ambiente generado.

A mis amigos por alentarme a continuar.

A mi familia por preocuparse, apoyarme y animarme a seguir adelante, a mis abuelos, tíos, y primos. A Eduardo por estar siempre presente y alentarme. En especial a mis padres sin quienes esto no hubiese sido posible que me apoyaron y confiaron en mí en todo momento.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cepas.....	9
Síntesis de cepas marcadoras del cromosoma 2 y 3.....	11
Análisis de recombinación en machos.....	12
Cepas marcadoras.....	12
Cruzamientos genéticos.....	13
Análisis genético de la mutación de alas <i>curvi</i>	14
Condiciones de cultivo y experimentación.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Síntesis de nuevas cepas marcadoras.....	17
PARTE I	17
Ocurrencia y frecuencia de recombinación en machos.....	17
Origen de la recombinación en machos de <i>D. willistoni</i>	20
PARTE II	21
Expresión y modo de herencia de <i>curvi</i>	22
Test de independencia de <i>curvi</i>	25
Propuesta de herencia de <i>curvi</i>	25
Aportes al ligamiento y mapeo de <i>curvi</i>	25
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	28
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS	33
Anexo I. Recombinación en machos. Tablas 1-2.....	33
Anexo II. Análisis de <i>curvi</i> . Tablas 3-9.....	36
Anexo III. Test G de independencia. Tablas 10-17.....	39
Anexo IV. Medio de cultivo.....	46

RESUMEN

Drosophila se caracteriza por ser excelente organismo modelo en biología y especialmente en genética.

Un siglo atrás Morgan reportó por primera vez que los machos de *D. melanogaster* no mostraban recombinación. Sin embargo, la recombinación en machos de *Drosophila* ha sido reportada en otras especies, entre ellas, *D. ananassae* y *D. willistoni*.

Drosophila willistoni es una especie de distribución Neotropical y representante del grupo *willistoni* de interés en estudios evolutivos. En 1968, Franca & col. reportaron un 0,4% de recombinación en machos híbridos para inversiones no solapadas en el cromosoma 2. Más recientemente, Dos Santos & col. (2004) reportaron una configuración meiótica en un individuo salvaje en la cual se identifica un bivalente que presenta un puente y un fragmento en forma de "U" el cual fue interpretado como la ocurrencia de un *crossing over* dentro del *loop* de la inversión II L-H, en el extremo del cromosoma 2. Estas observaciones constituyen la hipótesis de trabajo de esta pasantía: investigar la ocurrencia y características del *crossing over* en machos de *D. willistoni* utilizando, por primera vez, el análisis genético utilizando marcas ligadas en los cromosomas 2 y 3. Los datos obtenidos evidencian la existencia de recombinación en el cromosoma 2 y en el cromosoma 3. En general, pocos individuos experimentaron recombinación y en baja frecuencia lo que sugiere una variabilidad existente tanto en los cromosomas marcadores como en los salvajes utilizados en la construcción de los machos híbridos. Considerando la progenie recombinante de los machos analizados, se discute el origen de la recombinación en machos de *D. willistoni*. Este estudio se detalla en la PRIMERA PARTE de esta tesina.

En la SEGUNDA PARTE de esta tesina, se analiza el modo de herencia de la mutación que afecta la forma de las alas, *curvi* (*cui*), en una cepa marcadora múltiple mutante del cromosoma 2 (*bw cui cn*) de *D. willistoni* sintetizada en nuestro laboratorio. La mutación *cui* fue anteriormente descrita como recesiva y ligada al cromosoma 2, presentando expresión variable dependiente de la temperatura y del sexo (Soler & Goñi 1012). Los resultados obtenidos de la cepa *bw cui cn* cultivada a diferente temperatura avalan, en parte, la descripción de *curvi* anteriormente citada. Sin embargo, datos de la expresión de *curvi* en individuos híbridos presentados en esta tesina indican que *curvi* se expresa como dominante y dependiente de la temperatura y del sexo. Considerando las características observadas de esta mutación que afecta las alas, se evalúa propuesta de su posible correspondencia génica.

INTRODUCCIÓN

Drosophila es un modelo animal que presenta varias características de gran utilidad en el estudio de la genética, destacándose entre ellas: fácil mantenimiento en el laboratorio y bajo costo, ciclo de vida corto, elevado número de prole, número cromosómico pequeño y gran complejidad biológica similar a la de mamíferos. Muchos sistemas de órganos en mamíferos tienen homólogos altamente conservados en *Drosophila*. Este modelo animal se ha utilizado en investigaciones desde 1910 cuando Morgan comenzó los estudios en *Drosophila*. Actualmente está ampliamente extendido, lo que ha permitido avanzar en investigaciones sobre diversos temas como: cáncer, enfermedades neurodegenerativas, comportamiento, inmunidad, envejecimiento, herencia multigénica, desarrollo, entre otros.

Drosophila es un díptero perteneciente a la familia *Drosophilidae*. El género *Drosophila* está compuesto por los subgéneros *Drosophila* y *Sophosphora*. Este último consta de unas 3000 especies distribuidas en siete grupos. Entre los grupos de distribución Neotropical se halla el grupo *willistoni* (O'Grady & Kidwell 2002).

La especie *Drosophila willistoni*, perteneciente al grupo *willistoni*, presenta una extensa distribución geográfica, siendo citada desde Florida (EEUU) hasta el sur de la ciudad de Buenos Aires (Argentina), incluyendo Bahamas, América Central e Islas del Caribe (Ehrman & Powell 1982; Cordeiro & Winge 1995). Esta especie se encuentra tanto en ambientes naturales como en ambientes modificados por el hombre. En nuestro país, *D. willistoni* es una de las dos especies representantes del grupo *willistoni*; siendo la otra especie *D. nebulosa*, que se diferencia de la primera por presentar alas oscuras (Goñi & col. 1998).

El genoma de *D. willistoni* se organiza en tres pares de cromosomas, dos de los cuales son autosomas (par 2 y 3), y el par sexual. Este último, es heteromórfico y está constituido por los cromosomas X e Y. En cuanto a la morfología cromosómica, presenta dos cromosomas metacéntricos (los cromosomas 2 y X), uno acrocéntrico (el cromosoma 3), y uno submetacéntrico (el cromosoma Y). En cuanto al tamaño, el cromosoma 2 es casi el doble que el cromosoma 3. El cromosoma Y es enteramente heterocromático, y tanto el cromosoma X como el cromosoma 2 presentan bloques de heterocromatina en las regiones pericentroméricas (Dobzhansky 1950).

En 1940, Müller propuso que el genoma ancestral de las especies de *Drosophila* se componía de cinco pares de cromosomas acrocéntricos y un par de cromosomas puntuales, entre los cuales han ocurrido eventos de fusión centromérica. Müller utilizó a *Drosophila melanogaster* como referencia, y designó con las letras A-E a cada uno de los cinco brazos cromosómicos principales y denominó elemento F al cromosoma puntual o "dot". Además, planteó que el contenido de los cromosomas ancestrales permanecería altamente conservado,

lo que permita identificar grupos de ligamiento equivalentes entre 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 3L de *D. melanogaster*); el cromosoma 2 es el resultado de la fusión de los elementos B y C (brazos 2R y 2L de *D. melanogaster*), y el cromosoma 3 está formado por los elementos E y F (el brazo 3R y el cromosoma 4 "dot" de *D. melanogaster*) (FIGURA 1). Esta propuesta ha sido recientemente revisada mediante el estudio comparativo de secuencias genómicas de 12 especies de *Drosophila* (Schaeffer & col. 2008) y mediante técnicas moleculares y/o de hibridación *in situ* (Papaceit & Juan 1998; Powell & col. 2011; Pita & col. 2014).

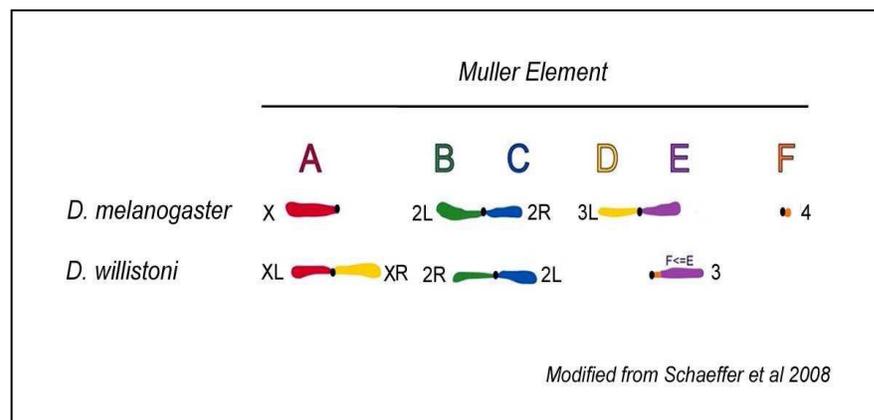


FIGURA 1. Relaciones cariotípicas entre *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Se muestran los brazos cromosómicos designados por su numeración convencional; separados y alineados como elementos de Müller (A-F). Cada elemento está coloreado diferencialmente. Los puntos negros representan los centrómeros. Modificado de FIGURA 1 en Schaeffer & col. (2008).

En contraposición con la escasa incidencia de otros tipos de cambios estructurales, el género *Drosophila* presenta un sorprendente grado de polimorfismo cromosómico debido a inversiones paracéntricas. Las inversiones son un tipo de alteración estructural por la cual un segmento cromosómico cambia de orientación dentro del propio cromosoma. Se denominan paracéntricas cuando el centrómero no está incluido dentro del segmento invertido y pericéntricas cuando el centrómero está incluido en la inversión. La existencia de inversiones en *Drosophila* como posible explicación a la ausencia de recombinación que se producía en determinadas regiones, fue propuesta por primera vez por Sturtevant (1917) cuando realizaba

cruzamientos entre ciertas cepas de *D. melanogaster* conocidas como “cepas supresoras del entrecruzamiento”. Más tarde, la elaboración de mapas genéticos permitió demostrar la existencia de una inversión en el orden de los marcadores en los cromosomas de estas cepas (Sturtevant 1926). Finalmente, el descubrimiento de los cromosomas politénicos en las glándulas salivares de *Drosophila* (Painter 1933) hizo posible la observación citológica de inversiones naturales en *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* (Tan 1935). Este tipo de cromosomas son típicos de las células de tejidos con una alta actividad metabólica, como las glándulas salivares de muchas especies de dípteros. Los cromosomas politénicos presentan un patrón constante de bandas oscuras e interbandas claras, fácilmente distinguibles al microscopio óptico, lo cual representa una importante herramienta genética de análisis en la caracterización y detección de reordenamientos cromosómicos, entre ellos las inversiones.

Hasta el momento, se ha visto que aproximadamente dos tercios de las especies de *Drosophila* estudiadas presentan inversiones en sus cromosomas (Sperlich & Pfriem 1986; Powell 1997). Además, las inversiones paracéntricas constituyen el cambio cromosómico más frecuente que se ha fijado en la evolución entre especies de *Drosophila*. Dentro de las especies que acumulan un mayor número de inversiones se destacan las pertenecientes al grupo *willistoni*, en particular en *D. willistoni* y *D. paulistorum*, encontrándose más de 60 inversiones paracéntricas que involucran los 5 brazos cromosómicos (revisado por Cordeiro & Winge 1995). En *D. willistoni*, las inversiones parecen distribuirse en forma aleatoria y se observa un elevado grado de polimorfismo en todos los cromosomas, aún cuando el número de inversiones concreto en cada cromosoma pueda variar (Sperlich & Pfriem 1986). Estudios citogenéticos realizados en poblaciones naturales de *D. willistoni* de Uruguay y del Sur de Brasil, mostraron una alta frecuencia de inversiones paracéntricas en estas poblaciones, las cuales son consideradas geográficamente como marginales (Valente & col. 2001, 2003).

Desde el comienzo de los estudios de *Drosophila*, se ha intentado establecer si los machos de las diferentes especies presentan o no recombinación, puesto que dicha información sería de suma importancia, en el análisis de segregación de cromosomas en machos heterocigotas. La ocurrencia de *crossing over* en machos de poblaciones naturales es importante para entender el rol de los factores genéticos gobernantes del *crossing over* en la naturaleza.

Se ha reportado la ausencia de *crossing over* en machos de varias especies de *Drosophila*. En *D. melanogaster*, la ausencia de recombinación espontánea en machos fue descrita por Morgan en 1914. Más tarde, Hiraizumi (1971) reportó la ocurrencia de recombinación espontánea en el brazo 2L de *D. melanogaster* utilizando el cromosoma T-007 aislado de poblaciones de Texas. Utilizando *cinnabar* (*cn*) y *brown* (*bw*) como marcas ligadas para detectar recombinación, dicho autor detectó una frecuencia total de recombinación de 0,45% en el cromosoma 2 de machos heterocigotos T-007/ *cn bw*, en un total de 48419

cromosomas analizados. Por otro lado, la proporción de los fenotipos recombinantes sugería un origen de recombinación meiótica, dado que las clases recombinantes aparecían en cantidades similares; aunque la posibilidad de un origen pre-meiótico no fue descartada por dicho autor. Con el propósito de re-examinar el origen de recombinación en machos de *D. melanogaster* en la cepa T-007 y determinar si la recombinación podía ocurrir en el cromosoma 3, Hiraizumi & col. (1973) continuaron con los experimentos, encontrando una frecuencia total de recombinación igual a 0.69%, en 1311 cromosomas 3 analizados. Además, halló nuevamente un 0,45% de recombinación en el cromosoma 2, analizando en esta oportunidad 1645 cromosomas, ratificando así sus primeros hallazgos. Por lo tanto, resulta claro que el *crossing over* puede ocurrir tanto en el segundo como en el tercer cromosoma. Hiraizumi & col. (1973) propusieron en esta oportunidad un origen mitótico (pre- meiótico) de recombinación en machos, debido a que aparecían diferencias en las clases de fenotipos recombinantes complementarias.

D. ananassae es la única especie caracterizada de *Drosophila* con una frecuencia considerable de *crossing over* espontáneo en machos. Kikkawa (1938) y Moriwaki (1937) detectaron *crossing over* espontáneo en machos de *D. ananassae*, y establecieron que dicha recombinación era controlada por genes potenciadores dominantes. En el primer caso, se postuló que el potenciador responsable del control del *crossing over* en machos estaba localizado en el tercer cromosoma; mientras que en el segundo caso, un gen dominante (*En-2*) localizado en el segundo cromosoma fue postulado como el responsable de inducir *crossing over* en machos y de aumentar el *crossing over* en hembras. Estudios posteriores revelaron que el *crossing over* en machos era de origen meiótico (Kale 1969), y que los elementos genéticos que controlan el *crossing over* en machos de *D. ananassae* mapeaban tanto en el cromosoma 2 como en el 3 (Hinton 1970; Matsuda & Tobarí 1983). Estudios de la meiosis en machos de *D. ananassae* (Matsuda & col. 1983; Goñi & col. 2006), demostraron que existe una relación entre los quiasmas y roturas cromosómicas observadas en espermatocitos primarios y los altos niveles de recombinación genética y, a su vez, que estos eventos son inducidos con alta frecuencia en machos heterocigotos para potenciadores del *crossing over*. Además, la observación de la meiosis en machos heterocigotos para inversiones permitió relacionar configuraciones particulares en los bivalentes con el apareamiento cromosómico y la ocurrencia de *crossing over* dentro un *loop* de inversión, tal como se presenta en la FIGURA 2(izq.) (Goñi & col. 2006; Goñi com. pers.).

En machos *D. willistoni* dos observaciones independientes sugieren la existencia de *crossing over*. La primera, Franca & col. (1968) reportaron 0.4% de recombinación en machos híbridos para inversiones no solapantes en el cromosoma 2; y la segunda, Dos Santos-Colares & col. (2004) observaron en la meiosis cierta configuración de un bivalente, la cual se interpretó como la ocurrencia de un *crossing over* dentro un *loop* de la inversión 2L-H en machos de *D.*

willistoni. Por su relevancia en esta pasantía la Figura 4 en Dos Santos-Colares & col. (2004) se presenta en la FIGURA 2(der.). Estas observaciones han estimulado la investigación presentada en la PRIMERA parte de esta pasantía. La estrategia incluye utilizar (y sintetizar) cepas marcadoras con múltiples mutaciones, y cepas salvajes de distinto origen.

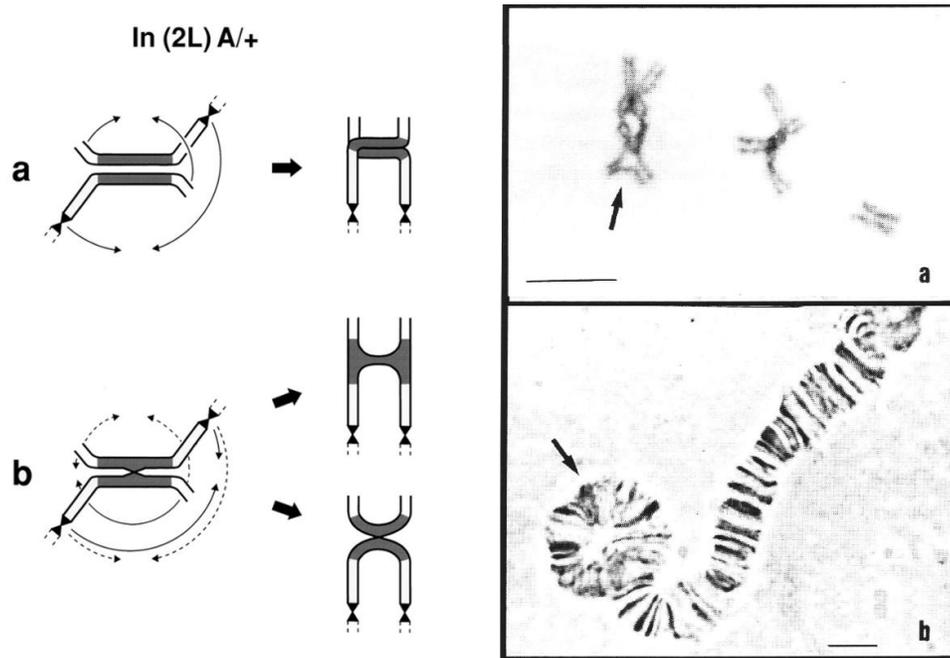


FIGURA 2. Izq. Representación esquemática del efecto de una inversión heterocigota en la meiosis de machos de *Drosophila*. Apareamiento cromosómico y resolución **(a)** sin crossing over, y **(b)** con un crossing over dentro del loop de inversión (adaptado de Goñi & col. 2006). Der. Espermatocito de macho de *D. willistoni* mostrando cromosomas en diploteno. **(a)** La flecha señala posible consecuencia de un quiasma dentro del segmento invertido en el bivalente correspondiente al cromosoma 2. **(b)** Detalle del extremo de un cromosoma politénicos de glándula salival del mismo macho heterocigota para la inversión III-L-H (flecha) en la porción terminal del cromosoma 2. (adaptado de Dos-Santos Colares & col. 2004).

La mutación *curvi* (*cui*) fue descrita originalmente en *D. melanogaster* por Nicoletti en 1957. Según la descripción de las mutaciones de *D. melanogaster* en el famoso “Libro Rojo” de Lindsley & Zimm (1968), *curvi* es una mutación recesiva que mapea en 2-23.4 y cuyos individuos presentan alas con la mitad distal curvada hacia arriba; mostrando además, una muy buena expresividad y viabilidad. Estos autores citan un único alelo de *curvi* encontrado por Nicoletti (1957), aunque dicho autor describe originalmente esta mutación como *curved*. En el Libro Rojo, Lindsley & Zimm (1968) describen la mutación *curved* (*c*), posición en el mapa 2-75, con

un fenotipo notoriamente diferente de *curvi*: “alas de textura fina, divergente, levantada en la base, y curvada hacia abajo en toda su longitud”.

Por otra parte, la mutación *Curly (Cy)* fue descrita en *D. melanogaster* como dominante, letal en homocigosis y ligada al cromosoma 2 en la posición 6.1 (extraído de FlyBase). El fenotipo de esta mutación consiste en alas curvadas hacia arriba, que raramente se solapa con el fenotipo salvaje a 25°C, pero que sí lo hace frecuentemente a 19°C. La curvatura es causada por una contracción desigual de los epitelios inferior y superior durante el período siguiente a la emergencia de la pupa (Waddington 1940). Su expresión se ve disminuida en cultivos con hacinamiento larval e incrementada con el aumento de la temperatura durante el desarrollo de la pupa (Nozawa 1956).

En nuestro laboratorio se aisló de la isolínea Q46M6 de *D. willistoni*, una mutación que produce un fenotipo de alas curvadas hacia arriba; la cual fue denominada como *curvi*, debido a su homología fenotípica con *curvi* de *D. melanogaster*. Según Soler & Goñi (2012), la mutación *curvi* de *D. willistoni* es recesiva, está ligada al cromosoma 2 y se expresa en el adulto de la siguiente manera: “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*.”

Powell & col (2010) realizaron un estudio sobre el efecto de la temperatura en el tamaño de las alas de cepas salvajes de 6 especies de *Drosophila*, incluidas *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Estos autores encontraron que todas las especies presentaron el mismo comportamiento; es decir, un aumento promedio del tamaño de las alas del 11% en hembras y del 14% en machos a 19°C respecto a 25°C.

Asimismo, Matta & Bitner (2004) estudiaron los efectos del sexo y la temperatura en el fenotipo de las alas en *D. simulans*. Se observó, a excepción de alguna de las variantes analizadas, una expresión dependiente del sexo y de la temperatura para la mayoría de los rasgos analizados en las alas; como por ejemplo el largo de las venas. Esto sugiere que los machos y las hembras presentan diferentes respuestas a la variación de temperatura en la que se desarrollaron.

Debido a que la mutación *cui* aislada en nuestro laboratorio presenta actualmente un fenotipo levemente distinto (presenta una curvatura mucho más pronunciada que comprende todo el largo del ala y no solo la mitad distal) al descrito por Soler & Goñi (2012); en la SEGUNDA parte de esta tesina, se re-examina el modo de herencia y características de esta mutante, utilizando una cepa triple mutante entre cuyos genes ligados se encuentra la mutación *cui*.

OBJETIVOS

GENERAL

Investigar la ocurrencia y características de la recombinación espontánea en machos de *Drosophila willistoni* mediante cruzamientos genéticos. (PARTE I)

Analizar la expresión de la mutación *curvi* (alas curvas) presente en una cepa marcadora múltiple de recombinación. (PARTE II).

ESPECIFICOS

Sintetizar nuevas cepas marcadoras de *D. willistoni* portadoras de mutaciones visibles en el fenotipo adulto, ligadas a los cromosomas 2 y 3.

Examinar la ocurrencia de recombinación en el cromosoma 2 y 3 de machos F1 mediante el análisis genético utilizando cepas marcadoras portadoras de mutaciones de posición conocida y cepas salvajes de poblaciones naturales y una cepa salvaje monomórfica endocriada en laboratorio.

Examinar la expresión de la mutación *curvi* en la cepa *bw cui cn*, a 17°C y 25°C; y determinar si existe variación de expresión entre sexos y a diferentes temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS

Cepas salvajes. Se utilizaron un total de ocho cepas salvajes, siete aisladas, denominadas “*isofemale lines*” en *Drosophila* (David & col. 2005) por ser establecidas a partir de una sola hembra colectada de la naturaleza. Dichas cepas (TABLA 1) han sido, desde su establecimiento, mantenidas en el Laboratorio de *Drosophila* de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias. La cepa salvaje GDH es la cepa de referencia de *D. willistoni* utilizada en el Proyecto de Anotación del Genoma de esta especie, la cual es monomórfica para arreglos cromosómicos (inversiones) (Schaeffer & col. 2008).

TABLA 1. Cepas salvajes. Se indica el nombre (o código) de cada cepa, origen y año.

Cepas salvajes		
Nombre	Origen	Año
Isolíneas		
SY3.01	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2001
SG2.02	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2002
SG22.02	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2002
SB6.03	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2003
TB10.02	Laguna Negra, Rocha, Uruguay.	2002
TB37.02	Laguna Negra, Rocha, Uruguay.	2002
SB8.02	Solís Grande, Maldonado, Uruguay.	2002
Cepa de Referencia		
GDH		

Cepas mutantes. Se utilizaron ocho cepas marcadoras que portan mutaciones que afectan el fenotipo adulto y cuyos genes se hallan ligados a los cromosomas 2 o 3 (TABLA 2). Todas las mutaciones utilizadas son recesivas (Soler y Goñi 2012).

El ligamiento genético y descripción de las mutaciones aquí utilizadas fueron reportadas por Soler (2012) y Soler & Goñi (2012). Las mutaciones que se hallan ligadas al cromosoma 2 son: *bw* (*brown*, color de ojos), *cn* (*cinnabar*, color de ojos), *cui* (*curvi*, alas curvadas hacia arriba), *px* (*plexus*, alas con venas extras), *pr* (*purple*, color de ojos). Las mutaciones que se encuentran ligadas al cromosoma 3 son: *e* (*ebony*, color del cuerpo), *ro* (*rough*, aspecto de los

ojos), *hh* (*hedgehog*, aspecto y tamaño de los ojos), *ss* (*spinless*, el número de setas escutelares variable), y *kay* (*kayak*, presenta una hendidura antero-posterior del mesotórax). Estas mutaciones fueron aisladas en el laboratorio a partir de hembras colectadas en la naturaleza (TABLA 2).

TABLA 2. Alelos de las mutaciones utilizadas. Se detallan las mutaciones, el código del alelo, el origen y el año en que fueron colectadas; agrupadas según el cromosoma al que pertenecen.

Alelos mutantes usados en cepas marcadoras			
Mutante	Alelo	Origen	Año
<u>Cromosoma 2*</u>			
<i>bw</i>	Q51.F13	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2009
<i>cn</i>	Q51.F13	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2009
<i>cn</i>	FA2.05	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2005
<i>cui</i>	Q46.M6	San Pablo, Brasil.	2007
<i>px</i>	SB61.01	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2001
<i>kay</i>	Q51.F14	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2009
<i>pr</i>	EY3.99	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	1999
* En el caso de la mutación <i>cn</i> , se especificará solo el alelo <i>cn</i> FA2.05.			
<u>Cromosoma 3</u>			
<i>e</i>	SB26.02	Solís Grande, Maldonado, Uruguay.	2002
<i>ro</i>	FA11.05	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.	2005
<i>hh</i>	Q02.F7	San Pablo, Brasil.	2006
<i>ss</i>	TB37.02	Laguna Negra, Rocha, Uruguay.	2002

Todas las cepas marcadoras (cepas múltiple mutantes) utilizadas en esta pasantía fueron establecidas en el laboratorio por Bach. S. Mateos y Bach. S. Rodríguez (Pasantías de Grado en curso, com. pers.). Muchas de estas cepas fueron utilizadas en análisis de mapeo de *D. willistoni*, utilizando la cepa salvaje GDH.

Síntesis de cepas marcadoras del cromosoma 2 y 3

Con el objetivo de sintetizar nuevas cepas marcadoras de recombinación, se realizaron cruzamientos genéticos (FIGURA 3) entre individuos con fenotipo mutante, de cepas que portaran al menos dos marcas. Para ello, se utilizaron las siguientes cepas (el supra índice indica el código del alelo):

Cromosoma 2

$cn^{FA2.05} pr^{EY.399}$

$bw^{Q51.F13} cn^{Q51.F13}$

Cromosoma 3

$kay^{Q51.F14} e^{SB2602}$

$kay^{Q51.F14} hh^{Q02.F7}$

$kay^{Q51.F14} ss^{TB37.02}$

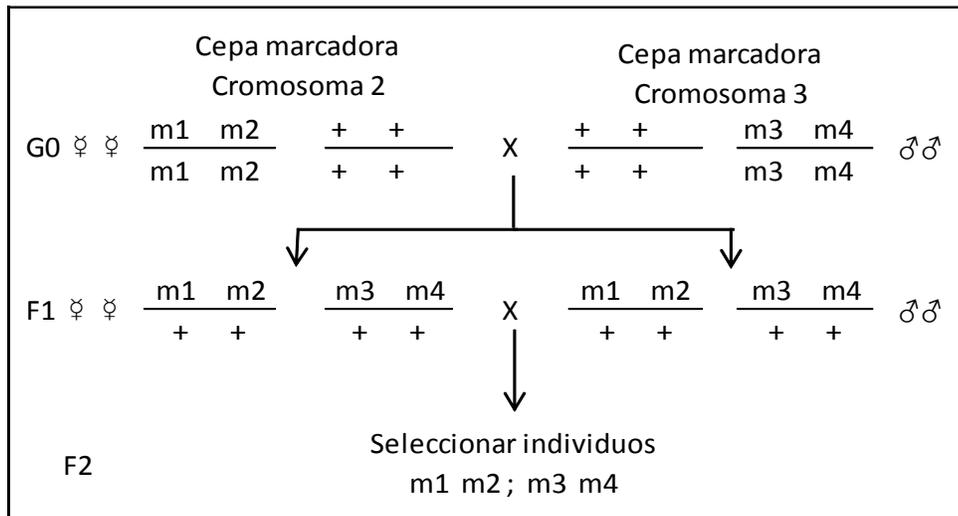


FIGURA 3. Esquema de los cruzamientos genéticos realizados en la síntesis de nuevas cepas marcadoras en *D. willistoni*.

Se realizaron los siguientes cruzamientos:

$cn^{Q51.F13} bw^{Q51.F13} \times kay^{Q51.F14} e^{SB2602}$

$cn^{Q51.F13} bw^{Q51.F13} \times kay^{Q51.F14} hh^{Q02.F7}$

$cn^{FA2.05} pr^{EY3.99} \times kay^{Q51.F14} ss^{TB37.0}$

Análisis de recombinación en machos

Cepas marcadoras. A continuación se presenta las cepas utilizadas en los análisis de recombinación en machos, y su fenotipo se muestra en la FIGURA 4.

Cromosoma 2

$bw^{Q51.F13} cui^{Q46.M6} cn^{Q51.F13}$
 $bw^{Q51.F13} px^{SB61.01} cn^{Q51.F13}$

Cromosoma 3

$Kay^{Q51.F14} e^{SB26.02} ro^{FA11.05}$

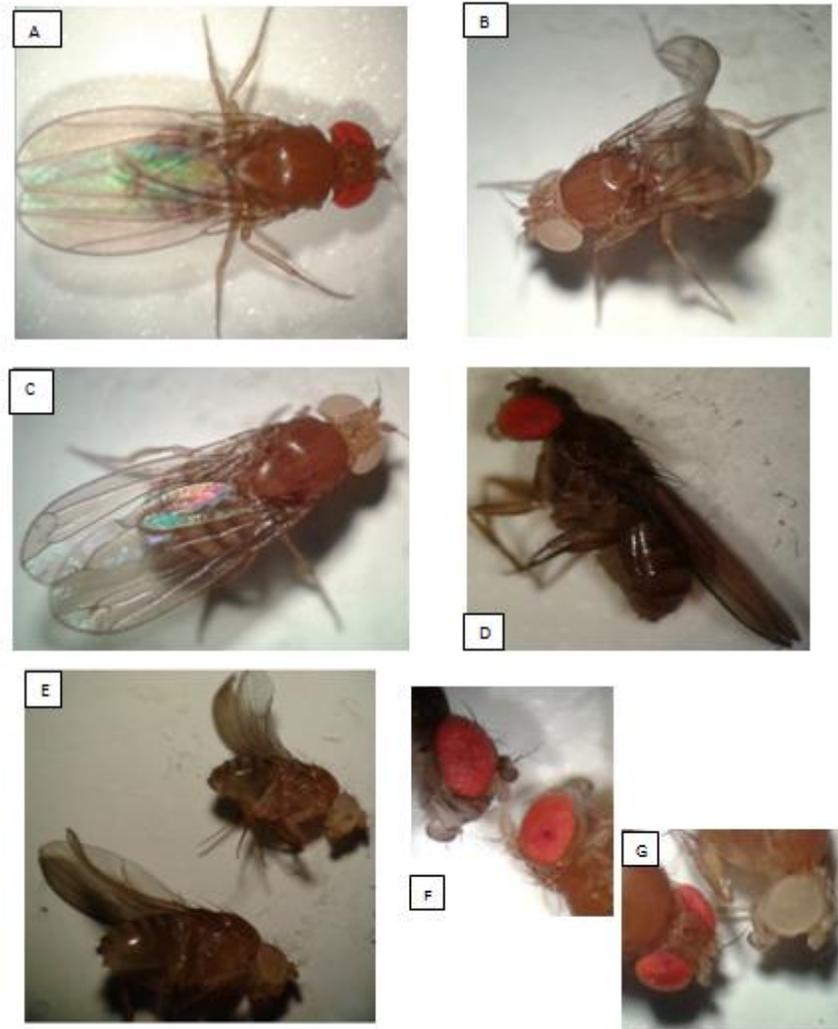


FIGURA 4. Cepas marcadoras de recombinación. A) salvaje. B) *bw cui cn*. C) *bw px cn*. D) *kay e ro*. E) macho (arriba) y hembra (abajo) de la cepa *bw cui cn*. F) Detalles de mutante de ojos *ro* (izq.) vs salvaje (der.). G) Detalle de color de ojos salvaje (izq.) vs *bw cn* (der.)

Mapa genético de *D. willistoni*. La FIGURA 5 muestra la posición y distancias relativas de los genes mutantes utilizados en esta pasantía, según comunicación personal de S. Mateos y S. Rodríguez (pasantía de grado en curso), y la posición de la mutación *bw* en el cromosoma 2, según C. Flores (com. pers.)

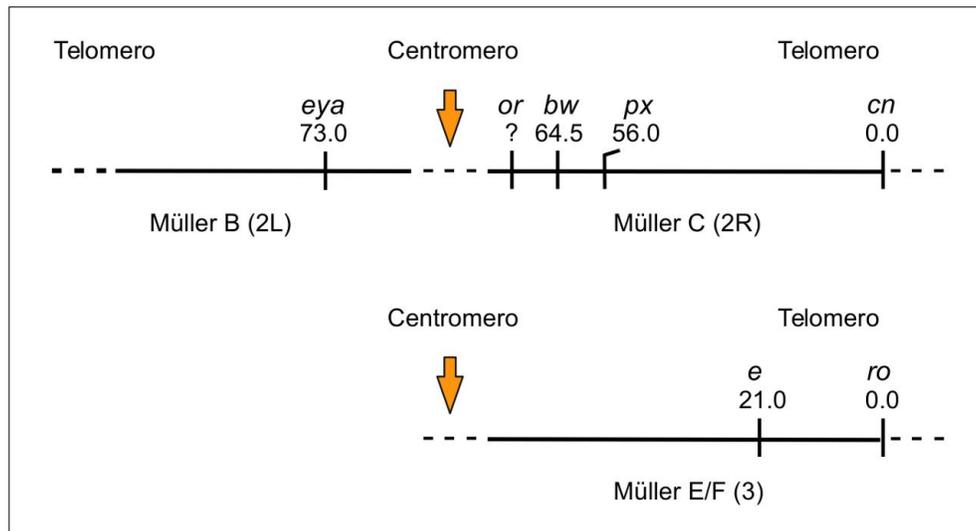


FIGURA 5. Mapa genético de los cromosomas 2 y 3 de *D. willistoni*. Se detallan las distancias génicas según S. Mateos y S. Rodríguez (com. pers.), y posición del locus *bw* según C. Flores (com. pers.). Distancias expresadas en cM.

Cruzamientos genéticos. Para detectar la ocurrencia de recombinación en machos se realizaron dos tipos de cruzamientos. El primer tipo involucra cruzamientos entre cepas marcadoras del cromosoma 2 o 3 y cepas salvajes (FIGURA 6), incluyendo la cepa de referencia (GDH). El segundo tipo involucra solo cruzamientos entre cepas marcadoras (FIGURA 7 A-C).

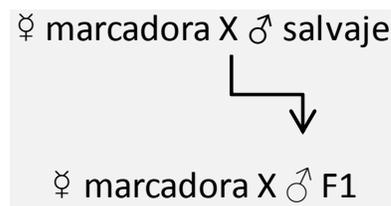


FIGURA 6. Cruzamiento genético entre cepas marcadoras y cepas salvajes, para analizar la recombinación en machos.

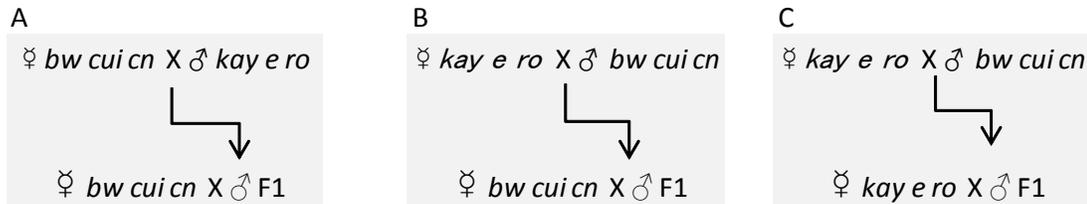


FIGURA 7. Cruzamientos genéticos entre cepas marcadoras, para detectar recombinación en machos.

En todos los cruzamientos, las hembras vírgenes fueron seleccionadas dentro de las 2 horas de emergidas mediante aspirador y cruzadas con machos jóvenes (cruzamiento en masa). Se seleccionaron varios machos híbridos F1 de cada cruzamiento, los cuales fueron cruzados individualmente con 3 hembras vírgenes de una cepa marcadora. Se realizaron varios cruces de cada tipo para poder analizar varios machos del mismo tipo en cada cruzamiento. Se hicieron un total de 4 réplicas por cada cruzamiento espaciados entre 3 y 5 días. La progenie F2 fue contabilizada hasta 11 días después de haber retirado los parentales (para no sobreponer con la generación F3). La progenie (F2) de cada macho F1 fue anestesiada con trietilamina, contabilizada y clasificada por sexo de acuerdo a las clases fenotípicas esperadas.

Estimación de los valores de recombinación en machos. Para calcular las frecuencias de recombinación a partir de segregación fenotípicas (en la progenie F2), se plantea la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de Recombinación} = \frac{\text{Número de progenie de recombinante}}{\text{Número total de progenie}} \times 100$$

Análisis genético de la mutación de alas *curvi*

En el curso de los cruzamientos genéticos entre la cepa *bw cui cn* y cepas salvajes (FIGURA 8 A-E) se detectaron, en la progenie F1, individuos con alas *curvi* e individuos con alas salvajes. Dicha observación no era esperada según la descripción de *curvi* reportada Soler & Goñi (2012): mutación recesiva y ligada cromosoma 2. De acuerdo a estos resultados, se procedió a investigar si los individuos de la progenie F1 de fenotipo *curvi* y salvaje eran heterocigotas. Para ello, se seleccionaron machos F1 de fenotipo salvaje y de fenotipo *curvi*, y se

retrocruzaron individualmente con hembras salvajes del genotipo parental (FIGURA 8 A y B), así como también con hembras de las cepas marcadoras parentales (FIGURA 8C, D y E). La progenie F2 de cada cruzamiento fue anestesiada con trietilamina, clasificada por sexo y clase fenotípica, y contabilizada hasta 15 días después de la fecha en que se realizó el cruce. Estos cruzamientos permitieron examinar el modo de herencia de *curvi*.

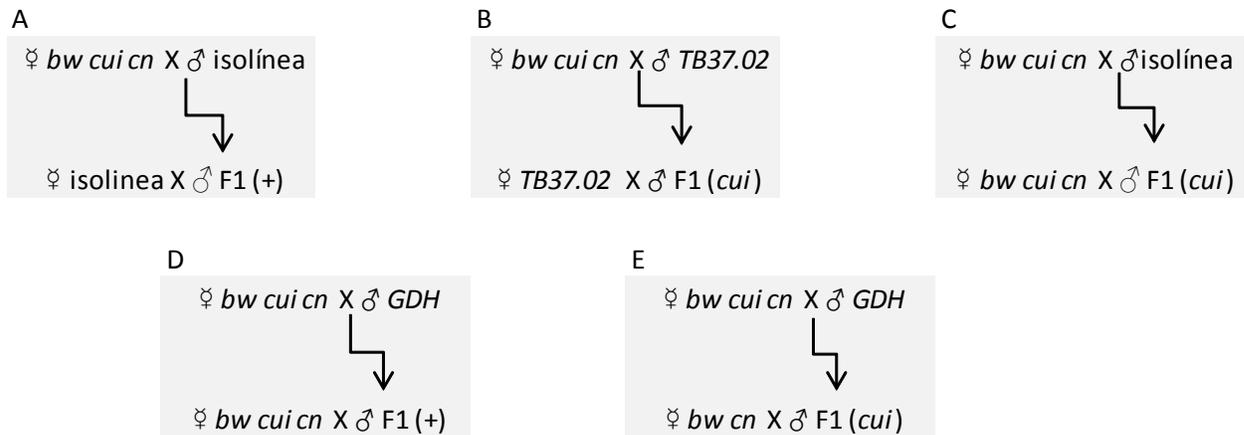


FIGURA 8. Esquema de los cruzamientos genéticos realizados para el análisis del modo de herencia del *curvi*. Se detallan las cepas utilizadas en cada tipo de cruzamiento.

Debido a que la mutación *curvi* se expresa diferencialmente dependiendo de la temperatura y del sexo (Soler 2012) (el fenotipo *curvi* se solapa con el fenotipo salvaje a bajas temperaturas y se expresa en mayor frecuencia en machos que en hembras), se cultivaron individuos de la cepa *bw cui cn* a 17°C y 25°C, para determinar si *curvi* presentaba el mismo patrón de expresión en esta cepa marcadora múltiple.

Todos los datos fenotípicos de la cepa marcadora múltiple cultivada a distintas temperaturas y de la progenie de cruzamientos usando *bw cui cn* fueron analizados estadísticamente aplicando el test G de independencia (siguiendo la metodología empleada por Soler 2012). Para valores de $G < \chi^2_{0,5[1]} = 3,841$ se aceptó la hipótesis nula, es decir, que las variables analizadas son independientes entre ellas (Sokal & Rohlf 1981).

Condiciones de cultivo y de experimentación

Todas las cepas y los cruzamientos fueron mantenidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (salvo se especifique), en tubos de vidrio de aproximadamente 25ml con medio de cultivo estándar a base a levadura, agar, maíz, glucosa, agentes antibacterianos y fungicidas (ANEXO IV), controlando la presencia de hongos y bacterias. El cuidado básico de los cultivos de *D. willistoni* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Parada (2004). Las hembras vírgenes utilizadas en los cruzamientos fueron colectadas con la ayuda de un aspirador dentro de las dos 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 (Parada 2004).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Síntesis de nuevas cepas marcadoras

Los cruzamientos realizados para la síntesis de nuevas cepas marcadoras del cromosoma 2 y 3, descritos en la FIGURA 3, no proporcionaron una cantidad suficiente de individuos en la progenie F2 que expresaran las marcas deseadas, obstaculizando establecer una nueva cepa marcadora.

Al momento de diseñar los cruces para la síntesis de nuevas cepas marcadoras, se intentó emplear diferentes mutaciones marcadoras de recombinación. Sin embargo, la gran mayoría de las cepas marcadoras del cromosoma 3 portaban la marca *kayak* (*kay*). En la progenie F2 de estos tres cruces se observó un patrón similar, se encontraron individuos a lo sumo con tres de las cuatro marcas utilizadas, pero ninguna incluía la marca *kay*. Según datos de S. Rodríguez (com. pers.) la expresión de *kay* se ve disminuida al incrementar el número de otros genes mutantes (efecto de carga genética), por lo que piensa que ello dificultó la detección de individuos con el genotipo deseado en estos cruzamientos. Además, la mutación *kay* fue anteriormente descrita como ligada al cromosoma 3 (Soler & Goñi 2012). Sin embargo, estudios recientes de S. Rodríguez (com. pers.) han puesto en duda el ligamiento de dicha mutación al cromosoma 3. Por lo tanto, se concluye que a futuro, habría que realizar nuevos cruzamientos para la síntesis de cepas marcadoras del cromosoma 2 y 3 que no incluyeran a la mutación *kayak*.

PARTE I

Ocurrencia y frecuencia de recombinación en machos

A continuación se presentan los resultados del análisis recombinación en machos híbridos F1 producidos del cruzamiento entre cepas marcadoras y cepas salvajes (Machos Tipo 1) y a partir de cruzamientos entre cepas marcadoras (Machos Tipo 2)

Recombinación en Machos Tipo 1. La TABLA 3 presenta el resumen de los resultados de los análisis de recombinación en los machos F1 híbrido entre cromosomas salvajes y cromosomas marcadores (según se mostró en la FIGURA 6). El detalle de la progenie de cada macho analizado se presenta en el ANEXO I, TABLA 1. No se observó recombinación espontánea en los machos híbridos para el cromosoma marcador *bw px cn* (cromosoma 2).

TABLA 3. Recombinación en machos F1 obtenida por cruzamiento entre cepas salvajes y cepas marcadoras.

Cepa Salvaje	Machos (N)	Progenie Total	No. machos que produjeron Recombinación	Rango de recombinación
<i>Intervalo bw ~ px ~ cn</i>				
SG2.02	4	595	0	
SG22.02	5	364	0	
SY3.01	4	363	0	
SB6.03	5	653	0	
TB10.02	5	430	0	
TB37.02	4	623	0	
SB8.02	5	964	0	
GDH	17	826	0	
<i>Intervalo bw ~ (cui) cn</i>				
SG2.02	12	1079	1 (8.3%)	0-0.47
SG22.02	4	426	0	
SY3.01	13	1298	0	
SB6.03	3	224	0	
TB10.02	11	1000	0	
TB37.02	6	157	0	
SB8.02	5	552	0	
GDH	17	1828	3 (17.6%)	0-5.26
<i>Intervalo (kay) e ~ ro</i>				
SG2.02	12	2449	2 (16.7%)	0-1.61
SG22.02	12	4430	1(8.3%)	0-0.18
SY3.01	10	1147	0	
SB6.03	10	3566	1(10.0%)	0-0.18
TB10.02	9	2423	1(11.1%)	0-0.67
TB37.02	9	1487	0	
SB8.02	14	2650	0	

Todos los individuos F2 analizados presentaron fenotipos igual a uno de los parentales, es decir fenotipo salvaje o expresaban las tres mutaciones. Es importante destacar que la progenie F1 de los cruzamientos anteriormente citados fue, como se esperaba, de fenotipo salvaje. Asimismo, se observó una proporción azarosa de los sexos en la progenie F2 (datos no presentados). Por este motivo, la progenie fue clasificada de acuerdo a su fenotipo (TABLA 3). Sin embargo, algunos machos híbridos provenientes del

cruzamiento que involucra el cromosoma marcador *bw cui cn* (cromosoma 2) presentaron una baja frecuencia de recombinación. El detalle de la progenie de cada macho se presenta en ANEXO I, TABLA 1. En este caso, se observó una proporción variable de machos híbridos F1 con alas *curvi*. Por este motivo, se consideró únicamente el intervalo genético *bw-cn* en el análisis de la recombinación. Nuestros datos muestran que tres individuos F1 híbridos con GDH (17,6%) presentaron recombinación, con una frecuencia máxima de 5,36%. Todos los recombinantes obtenidos fueron del fenotipo *bw* (ANEXO I, TABLA 1). Adicionalmente, se detectó recombinación en un macho F1 híbrido para SG2.02 (TABLA 3).

Cabe destacar que solamente machos F1 híbridos para la cepa *bw cui cn* presentaron recombinación, con un rango entre 0 y 5.26%. Estos datos indicarían la existencia de variabilidad genética en las cepas marcadoras y/o las cepas salvajes utilizadas. No se descarta que pueda ocurrir recombinación en machos F1 híbridos para la cepa marcadora *bw px cn*, puesto que el porcentaje de ocurrencia de *crossing over* observado es muy pequeño. En *D. ananassae*, se ha detectado también una gran variabilidad en la recombinación espontánea de machos híbridos entre cromosomas salvajes (e isolíneas) de distinto origen geográfico y distintos cromosomas marcadores (Hinton 1970; Moriwaki & col. 1970; Moriwaki & Tobarí 1973; Goñi com.pers.)

Asimismo, cuando se analizó la recombinación en los machos F1 híbridos entre el marcador *kay e ro* y cromosomas salvajes de las isolíneas, se detectó una baja frecuencia de recombinación en el intervalo *e - ro* del cromosoma 3 con un rango de 0 a 1.61%. Los resultados se presentan en la TABLA 3, y el detalle de la progenie de cada macho se presenta en el ANEXO I, TABLA 1. En este caso, se detectó recombinación en machos en 4 de las 7 isolíneas utilizadas, siendo que 3 de estas isolíneas pertenecientes a la misma localidad (TABLA 1).

Recombinación en Machos Tipo 2. La TABLA 4 presenta el resumen de los resultados del análisis de recombinación en los machos F1 híbridos entre cromosomas marcadores del cromosoma 2 y del cromosoma 3 (FIGURA 7 A-C). Se analizó recombinación en los intervalos *bw-cn* (cromosoma 2, TABLA 4, cruces 1 y 2) y *e - ro* (cromosoma 3, TABLA 4, cruce 3) no detectándose recombinación en ninguno de éstos intervalos. Los detalles de la progenie de cada macho se muestran en el ANEXO I, TABLA 2. Estos cruzamientos se realizaron para examinar si, al igual que *D. ananassae*, la recombinación se debía a potenciadores presentes en las cepas marcadoras.

TABLA 4. Datos recombinación en machos F1 del cruzamiento entre la cepa marcadora del cromosoma 2 (*bw cui cn*) y la cepa marcadora del cromosoma 3 (*kay e ro*). Cruces 1, 2 indican cruzamientos recíprocos para detectar recombinación en el intervalo *bw – cn* y el cruce 3, para detectar recombinación entre *e – ro*.

Cruzamiento	Machos analizados	Parentales		Recombinantes		Progenie Total
		<i>bw cn</i>	++	<i>bw</i>	<i>cn</i>	
1) ♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ F1 (♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ <i>kay e ro</i>)	15	584	794	0	0	1378
2) ♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ F1 (♀ <i>kay e ro</i> X ♂ <i>bw cui cn</i>)	17	486	646	0	0	1132
		<i>e ro</i>	++	<i>e</i>	<i>ro</i>	
3) ♀ <i>kay e ro</i> X ♂ F1 (♀ <i>kay e ro</i> X ♂ <i>bw cui cn</i>)	16	1040	1654	0	0	2694

Los resultados presentados en esta pasantía evidencian ocurrencia de recombinación espontánea en machos de *D. willistoni*. A su vez, se observó diferencias en la frecuencia de recombinación entre machos híbridos para cepas marcadoras y cepas salvajes. Dado que no todos los machos recombinaron, los individuos que presentaron *crossing over* tendrían genotipos particulares que representarían una variabilidad presente tanto en cromosomas salvajes como en las cepas marcadoras empleadas.

Un ejemplo a destacar es el resultado de la recombinación en machos empleando cromosomas salvajes de isolíneas provenientes de la misma localidad y año (ejemplo SG2.02 y SG22.02, aisladas de Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, año 2002), los cuales presentaron una proporción variable de individuos con recombinación y en baja frecuencia. Otro caso similar, son las isolíneas TB10.02 y TB37.02 colectadas en Rocha, Uruguay, en el año 2002. Solo machos híbridos para una de estas (TB37. 02) presentó recombinación. En general, los machos híbridos para el cromosoma salvaje GDH presentaron recombinación en una frecuencia variable (ANEXOS I, TABLA 1)

Origen de la recombinación en machos de *D. willistoni*

En base a los resultados obtenidos, nos interesa discutir el posible origen de la recombinación observada en la progenie de los machos F1 híbridos.

Según Hirazumi (1973) son varias las características de la recombinación en machos que sugieren un origen mitótico o pre-meiótico: (1) la ocurrencia de “clusters” (o agrupamientos) de recombinantes en la progenie F2, (2) un número desigual de las clases recombinantes complementarias, también relacionadas a la ocurrencia de *clusters*, y (3) una mayor frecuencia de recombinación entorno a la región centromérica y telomérica. Por el contrario, la recombinación meiótica produciría clases complementarias equivalentes, la

ausencia de *clusters* de recombinantes y una disminución en la frecuencia de recombinación en la región próxima al centrómero y/o telómero (Ashburner 1989).

Si la ocurrencia de *clusters* o agrupamientos de recombinantes es relevante para asociarlo con un origen mitótico de recombinación en machos, también lo sería el número de recombinantes de dicho “*cluster*”. Es decir, ¿podemos considerar un “*cluster*” cuando se tienen solo 3 recombinantes? ¿O serían necesario un número mayor? Si consideramos que 3 o más recombinantes de una misma clase fenotípica representan un “*cluster*” de recombinación en machos, son pocos los casos de posibles “*clusters*” observados en machos de *D. willistoni*: 2 individuos del genotipo *bw cui cn*/GDH y 1 individuo del genotipo *kay e ro*/TB10.02 (ANEXO I, TABLA 1). En este caso, estaríamos ante un posible origen mitótico o pre-meiótico de recombinación en machos de *D. willistoni*. De todas formas, debido al bajo porcentaje de *crossing over* observado en otros individuos, no podemos afirmar que la recombinación en machos de *D. willistoni* sea únicamente de origen mitótico o pre-meiótico, como el propuesto en *D. melanogaster*.

Además de los resultados mostrados en esta pasantía, el grupo de trabajo del Laboratorio *Drosophila* ha obtenido resultados preliminares de recombinación en machos de *D. willistoni* que sugieren la ocurrencia de este fenómeno. Se ha observado un rango de recombinación de 0-10% en el intervalo *eya-px* (*eya* = *eyes absent*) y de 0-4,76% en el intervalo *eya-or* (*or* = *orange*) en machos híbridos para cepas marcadoras cromosoma 2 y GDH (S. Mateos com. pers.). Estas marcas también son recesivas. Las marcas *bw-cn* utilizadas en los experimentos detallados en esta pasantía, están a una distancia al menos de 50cM, mientras que las marcas *eya-or* están separadas por 12.9cM posiblemente ubicadas a los lados de los centrómeros (S. Mateos com. pers.). Si consideramos estos datos en su conjunto y teniendo en cuenta la observación de Dos-Santos Colares & col. (2004) sobre la meiosis en macho salvaje (portando un quiasma de inversión, interpretado como la consecuencia de un *crossing over* dentro de un *loop* de inversión 2LH) (FIGURA 2, der), no podemos descartar el origen meiótico de la recombinación en machos de *D. willistoni*.

PARTE II

La mutante *curvi* fue originalmente caracterizada por Soler & Goñi (2012) como recesiva y ligada al cromosoma 2. Según estos autores, *curvi* se expresa en el adulto de la siguiente manera: “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*.”

Expresión y modo de herencia de *curvi*

En primer lugar, se examinó la expresión de alas *curvi* en individuos heterocigotas de la primera generación. Para ello se realizaron cruzamientos entre la cepa marcadora *bw cui cn* y cada una de las 5 isólinas salvajes. Los resultados del análisis de la progenie F1 de estos cruzamientos se presentan en la TABLA 5A. Como se puede observar, se encontró una alta proporción de individuos del fenotipo no esperado, alas *curvi*. Asimismo, se observó que la mayoría de las hembras eran completamente salvajes, mientras que los machos eran mayoritariamente *curvi* (ANEXO II, TABLA 3). Estas características fueron observadas en todas las réplicas realizadas en cada isólinea, por lo cual se concluye que *curvi* no se comporta como una mutación recesiva clásica, puesto que se expresa en individuos híbridos para el alelo *curvi* y mayoritariamente en un sexo. Cabe señalar que no se observó desviación en la proporción de sexos en estos cruzamientos (ANEXO II, TABLA 3), salvo en el cruzamiento con la isólinea SG22.02.

Al observar individuos F1 de alas *curvi* y alas salvajes, se plantearon dos hipótesis: (1) siendo *Cui* dominante, la cepa marcadora *bw cui cn*, segrega el alelo *cui⁺*, ó (2) la cepa marcadora *bw cui cn* es homocigota, como se pensaba originalmente y la expresión de *Cui* es dependiente de factores genéticos no determinados. Para analizar dichas hipótesis se seleccionaron individuos F1 con alas salvajes y con alas *curvi*, y se cruzaron con hembras de la isólineas salvajes correspondiente (FIGURA 8A y B). Los resultados de la progenie F2 (TABLA 5B y C) indican que aunque *Cui* se expresa en los individuos heterocigotas no se comporta como una mutación dominante clásica, y que la cepa marcadora *bw cui cn* no porta el alelo *cui⁺* (ANEXO II, TABLA 4 y 5). A los efectos prácticos seguiremos denominado la mutación de alas, como *cui*, pues se discute más adelante la pertinencia de una posible correspondencia con otro gen.

TABLA 5. Expresión de *cui*. **A)** Progenie F1, **B)** F2 del cruzamiento entre machos F1 híbridos de fenotipo salvaje y hembras salvajes. **C)** F2 cruzamiento entre machos F1 híbridos con fenotipo *curvi* y hembras salvajes.

A) Cruzamientos ♀ salvajes (isolínea) x ♂ <i>bw cui cn</i>				
Cepa	Progenie		+	<i>cui</i>
salvaje	Total			
SG22.02	226		70	156
SB6.03	269		81	188
TB10.02	89		41	48
TB37.02	188		63	125
SB8.02	192		46	146

B) Cruzamientos ♀ salvajes (isolínea) x ♂ F1 <i>bw cui cn/ +, [+]</i>				
Cepa	Machos	Progenie		
salvaje	(N)	Total	+	<i>cui</i>
SG22.02	3	284	221	63
SB6.03	5	979	684	295
TB37.02	2	91	67	24
SB8.02	4	444	327	117

C) Cruzamientos ♀ salvajes (isolínea) x ♂ F1 <i>bw cui cn/ +, [cui]</i>				
TB37.02	5	429	287	142

Al cruzar una hembra marcadora de la cepa *bw cui cn* por machos de las diferentes isolíneas (en el marco de los análisis de recombinación), se observaron individuos con fenotipo *curvi* en la progenie F1. En primer lugar, descartamos la posibilidad que *curvi* fuese segregado por las isolíneas salvajes, puesto que los individuos de la progenie F1 de los cruces que involucran estas cepas salvajes con las otras cepas marcadoras, no expresaron el fenotipo *curvi*. Este hecho refuerza la propuesta de que las isolíneas salvajes aquí utilizadas no segregan el alelo *cui*. Rieger & col. (2013) aislaron una mutante que afecta las alas en la cepa salvaje GDH, que designaron como *Curly*, y observaron que el 96% de la progenie F1 (de cruzamientos recíprocos entre individuos salvajes e individuos de fenotipo *Curly*) fue fenotípicamente *Curly* concluyendo que la mutación *Curly* segrega como un alelo dominante mendeliano. Lamentablemente esta cepa mutante ha sido perdida por lo cual imposibilita realizar un análisis de alelismo con nuestra mutante *cui*.

En la cepa *bw cui cn*, se detectó un macho “*escaper*”, es decir un individuo que presentaba alas rectas (fenotípicamente salvajes) y ojos blancos (*bw cn*). De esta observación se evaluaron dos hipótesis: (1) que dicho individuo portara el alelo salvaje para *cui* ó (2) que fuera homocigota para el alelo *cui* pero no expresara la mutación. Se procedió a investigar estas dos posibilidades. Para ello se cruzó ese individuo con una hembra virgen de una aislínea salvaje que estaba a 25°C. En la progenie F1 se obtuvieron individuos con fenotipo salvaje y *curvi* en un 56,6% y 43.4%, respectivamente. Este resultado indicaría que el individuo analizado representa un “*escaper*”. Según la literatura, la sobreabundancia de progenie (alta densidad poblacional) examinada en mutantes de *Curly* de *D. melanogaster* por Nozawa (1956) produce baja expresión del fenotipo *Curly*. No podemos asegurar que nuestro “*escaper*” en *D. willistoni*, no se trate de un caso similar.

Finalmente, se procedió a realizar un análisis de la expresión de *cui* en la cepa marcadora respecto a la temperatura. Se utilizaron dos temperaturas 17°C y 25°C. Los resultados se describen en la TABLA 6. A 25°C todos los individuos expresaron alas *curvi* mientras que a 17°C solamente 81,3% expresaron la mutación, de los cuales el 60,3% eran machos. Ello indica que *cui* es dependiente del sexo solo cuando los individuos se cultivan a bajas temperaturas.

TABLA 6. Expresión de *curvi* en la cepa *bw cui cn* cultivadas a diferente temperatura, 17°C y 25°C.

Temperatura	Fenotipo	Sexo		Total
		♀	♂	
17°C	<i>bw cui cn</i>	790	1198	1988
	<i>bw cn</i>	375	82	457
	Total	1165	1280	2445
25°C	<i>bw cui cn</i>	531	620	1151
	<i>bw cn</i>	0	0	0
	Total	531	620	1151

Soler (2012) propuso, en estudios realizados con la cepa pura *cui*, que la mutación *cui* es dependiente de la temperatura, siendo la temperatura óptima de expresión 24°C. Nuestros datos de la expresión de *curvi* utilizando la cepa marcadora *bw cui cn* a 17°C y 25°C muestran un comportamiento similar al observado por Soler (2012).

Test de independencia de *curvi*

Los datos de los experimentos relacionados con la expresión de *curvi* a diferentes temperaturas fueron avalados por el test G de independencia. En la mayoría de los casos el valor de test G fue mayor a 3,841 (ANEXO III), por lo que se aceptó la hipótesis nula de que existe una dependencia entre el sexo y el fenotipo. Según estos datos, el fenotipo *curvi* es dependiente del sexo en la cepa a 17°C y en los cruzamientos realizados a 25°C. Sin embargo, en la cepa cultivada a 25°C no se observó dependencia entre sexo y fenotipo, ya que todos los individuos expresaban alas *curvi*.

Adicionalmente, se observó una diferencia en la expresión del carácter *cui*, es decir, no todos los individuos expresan de la misma forma esta mutación. Existe una variabilidad en la expresión de *curvi*, debido a que hay individuos que presentan claramente la curvatura en las alas, y en el otro extremo, individuos a los que es necesario mirar bajo la lupa para notar que las alas no son salvajes y presentan una pequeña curvatura.

Propuesta de herencia de *curvi*

Se plantea, que posiblemente esta mutación sea dominante, pero con expresividad diferencial dependiente de varios factores. Ser dominante significa que se expresa en individuos heterocigotas, tal cual lo observado en los análisis detallados en esta pasantía. La expresión variable explicarían el por qué no todos los individuos heterocigotas la expresan y también el rango de expresión de la curvatura observado. Claramente, esta mutación tiene expresividad diferencial dependiente de otros factores, además del sexo y la temperatura, que aun son necesarios estudiar.

Aportes al mapeo de *curvi*

Se examinó la expresión de *curvi* en individuos de la progenie F2 provenientes de dos grupos de machos heterocigotas para *bw cui cn*, aquellos que expresaban alas *curvi* y aquellos que expresaban alas salvajes (FIGURA 8C y D). En ambos casos se observó recombinación en el intervalo *bw-cn* (ya descrito en la PARTE I) pero además, y significativamente, se observó dos clases fenotípicas no esperadas en la progenie: individuos *brown cinnabar* e individuos *curvi*. La clase *bw cn* (TABLA 7A y B) indicaría la ocurrencia de dos fenómenos no excluyentes entre sí: la no expresión de *curvi* en homocigosis, tal cual

fuera observado en la cepa marcadora *bw cui cn* a 25°C, y/o la existencia de gametos recombinantes en machos híbridos F1; no descartándose ninguna de las dos posibilidades. Por otra parte, la clase *curvi* (TABLA 7C) representaría gametos recombinantes en machos híbridos F1 y, en este caso, evidenciaría el ligamiento del gen *curvi* al cromosoma 2, tal como fuera descrito por Soler y Goñi (2012). Sin embargo, estos datos podrían cuestionar la posición de *cui* en el mapa genético (FIGURA 5) propuesta por S. Mateos (comunicación personal). La variabilidad en la expresión de *curvi* en individuos heterocigotas y homocigotas, dificulta los análisis de mapeo genético (basados en la frecuencia de recombinación en hembras) (ANEXO II, TABLAS 6-8).

TABLA 7. Segregación de *cui*. Análisis de la progenie F2 de los cruces indicados A) Machos F1 fenotipo *curvi* por hembras marcadoras. B) machos F1 fenotipo salvaje por hembras marcadoras. C) machos F1 fenotipo *curvi* por hembras *bw cn*. Parentales I y II hace referencia a individuos analizados que presentan fenotipo igual a los parentales.

A) Cruzamiento			♀ <i>bw cui cn</i> x ♂ F1 <i>bw cui cn</i> / +, [<i>cui</i>] *					
Cepa	Machos (N)	Progenie Total	Parentales I		Parentales II		Recombinantes	
Salvaje			+++	<i>bw cui cn</i>	<i>cui</i>	<i>bw cn</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>
SG22.02	4	426	122	197	104	3	0	0
SB6.03	3	224	52	109	62	1	0	0
TB37.02	6	157	47	56	52	2	0	0
SB8.02	5	552	93	253	203	3	0	0
GDH	6	498	181	180	129	5	3	0

B) Cruzamiento			♀ <i>bw cui cn</i> x ♂ F1 <i>bw cui cn</i> / +, [+]*					
GDH	4	282	83	105	83	5	6	0

C) Cruzamiento			♀ <i>bw cn</i> x ♂ F1 <i>bw cui cn</i> / +, [<i>cui</i>] *					
GDH	7	1048	518	94	4	430	2	0

Finalmente, los datos aquí presentados apuntan a redefinir la mutante que originalmente llamamos *cui*, y se propone como mejor candidato al gen *Curly* (*Cy*). Inicialmente, cuando la mutación *curvi* fue aislada en el laboratorio, fue descrita como tal debido a su homología fenotípica con el gen *cui* de *D. melanogaster* y; porque ambos genes eran recesivos y ligados al cromosoma 2 (el cromosoma 2 de *D. willistoni* es homólogo al cromosoma 2 de *D. melanogaster*). Sin embargo, actualmente son varias las observaciones que nos hacen pensar que dicha mutación podría ser el gen homólogo a *Curly* de *D.*

melanogaster. En primer lugar, el fenotipo actual de esta mutación (presenta una curvatura mucho más pronunciada que comprende todo el largo del ala y no solo la mitad distal) se asemeja más al fenotipo descrito para la mutación *Curly* de *D. melanogaster* que al descrito para *curvi*. En segundo lugar, según lo que se propone en esta tesina, esta mutación sería dominante y ligada al cromosoma 2 al igual que *Curly* de *D. melanogaster* (FlyBase.org). Por último, en *D. melanogaster*, *Curly* ha sido descrita con expresión variable dependiendo de la temperatura (FlyBase.org), al igual que lo que sucede con nuestra mutación.

Según la información provista para el gen *Curly* de *D. melanogaster* disponible en la página web del FlyBase, no hay anotación de transcritos ni se ha localizado la secuencia genómica correspondiente a este gen. Ello dificulta, por el momento, el diseño de una estrategia de estudio comparativo del alelo salvaje y mutante para nuestro mutante de alas en *D. willistoni*.

La falta de disponibilidad de secuencias y patrones de expresión de muchos genes en *D. melanogaster* es una de las áreas que la comunidad que investiga en *Drosophila* se ha propuesto desarrollar. Existe un consenso abrumador de que algunas grandes áreas en particular necesitan ser apoyadas y ampliadas en los próximos años; entre las que se destaca el análisis funcional del genoma completo de *Drosophila*, incluyendo la caracterización de patrones de expresión temporales y espaciales de todos los genes y proteínas de *Drosophila* (White Paper 2012, FlyBase: http://flybase.bio.indiana.edu/static_pages/news/whitepapers/DrosBoardWP2009.pdf). Los logros en esta área de trabajo proporcionarían a corto plazo las secuencias, transcritos, proteína, y otros datos de genes en *Drosophila melanogaster*; entre ellos los genes candidatos al fenotipo de alas tipo "*curly*"; permitiendo además determinar los correspondientes ortólogos en otras especies de *Drosophila* cuyos genomas han sido secuenciado. La disponibilidad de nuevos datos en *D. melanogaster* facilitarían, entre otros, la revisión del mapa genético, físico y genómico de *D. willistoni*, condición necesaria para desarrollar futuros proyectos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se halló recombinación espontánea en machos en *D. willistoni* en los cromosomas 2 y 3 analizados. Si bien se observó una baja proporción de machos que experimentan recombinación y en frecuencias variables, los datos indican la existencia de variabilidad en los cromosomas marcadores y cromosomas salvajes presentes en los machos híbridos analizados. Nuestros datos no nos permiten discriminar claramente entre un origen de recombinación mitótica y meiótica, por lo cual se propone ampliar la muestra de datos. Estudios dirigidos para analizar (y reexaminar) el mapa genético en *D. willistoni* serán fundamentales para incluir otros marcadores de recombinación, incluyendo la síntesis de nuevas cepas marcadoras que permitan analizar los factores que determinan la recombinación en machos de esta especie.

El análisis genético de la expresión de una mutante que afecta a las alas en *D. willistoni*, originalmente descrita como *cui* (*curvi*) revela que se trata de una mutación dominante que se expresa diferencialmente en los sexos y cuya expresión depende de la temperatura. Se propone que esta mutación tiene similitud con el gen *Curly* de *D. melanogaster*. Sin embargo, no es posible diseñar una estrategia de estudio comparativo entre las secuencias del alelo salvaje y mutante puesto que no se dispone del gen ortólogo de *Cy* en *D. willistoni*.

Considerando el alto grado de polimorfismo cromosómico en *D. willistoni*, sería importante determinar a futuro el arreglo genético de los cromosomas politenicos, en especial, de las cepas marcadoras utilizadas, que permitan determinar posibles inversiones.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook* 1: 451-501.
- 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.
- David, J.R.; Gibert, P.; Legout, H.; Petavy, G.; Capy, P.; & Moreteau, B. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3-12.
- Dobzansky, T. 1950. The Chromosomes of *Drosophila willistoni*. *Journal of Heredity* 40: 156-158.
- Dos Santos-Colares, M.C; Degrandi, T.H. & Valente V.L.S. 2004. Cytological detection of male recombination in *Drosophila willistoni*. *Cytologia* 69(4): 359-365.
- Ehrman, L. & Powell, J.R. 1982. *The Genetics and Biology of Drosophila*, 3b.eds Ashburner, M.; Carson. H.L. & Thompson, J.N. London Academic Press, pp: 193-225.
- St. Pierre, S.E.; Ponting, L.; Stefancsik, R.; McQuilton, P.; and the FlyBase Consortium (2014). FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. www.flybase.org
- França, Z.M.; Da Cunha, A.B. 1968. Crossing-over between heterozygous inversions and its relation with polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Revista Brasileira de Biologia* 28: 495-497.
- Fresia, P.; Graneri, J. & Goñi, B. 2002. Anesthetic effects of two chemicals on the fertility of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* 84: 141-142.
- Goñi, B.; Martinez, M.E.; Valente, V.L.S. & Vilela, C.R. 1998. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. *Revista Brasileira de Entomologia* 42: 131-140.
- Goñi, B.; Matsuda, M. & Tobar, Y.N. 2006. Chiasmata and Chromosome breakages are related to crossing over in *Drosophila ananassae* males. *Genome* 49: 1374-1383.
- Hiraizumi, Y. 1971. Spontaneous Recombination in *Drosophila melanogaster* males. *Proceedings of the National Academy of Science*, 68 (2): 268-270.

- Hiraizumi, Y; Slatko, B.; Langley, C. & Nill, A. 1973. Recombination in *Drosophila melanogaster* male. *Genetics* 73: 439-444.
- Hinton, C.W. 1970. Identification of two loci controlling crossing over in males of *Drosophila ananassae*. *Genetics* 66(4): 663-676.
- Kale, P.G. 1969. The Meiotic origin of Spontaneous Crossovers in *Drosophila ananassae* Males. *Genetics* 62 (1): 123-133.
- Kikkawa, H. 1938. Spontaneous crossing over in the male of *Drosophila ananassae*. *Zoological Magazine* 49: 159-160.
- Lindsley, D.L. & Grell, E.H. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington 627: 469pp.
- Matsuda, M. & Tobari, Y.N. 1983. Enhancer and suppressor system of male recombination in *Drosophila ananassae*. *Japanese Journal of Genetics* 58(3): 181-192.
- Matta, B.P & Bitner-Mathe, B.C. 2004. Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. *Heredity* 93: 330–341.
- Morgan, T.H. 1912. Complete linkage in the second chromosomes of the males of *Drosophila*. *Science* 36: 719-720.
- Morgan, T.H. 1914. No crossing over in the male of *Drosophila* of genes in the second and the third pairs of chromosomes. *Biological Bulletin* 26: 195-204.
- Moriwaki, D. 1937. A high ratio of crossing over in *Drosophila ananassae*. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs und Vererbungslehre* 74: 17-23.
- Nozawa, K. (1956). The effects of the environmental conditions on Curly expressivity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetica*. 31: 163-171.
- O’Grady, P.M. & Kidwell, M.G. 2002. Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 442-453.
- Painter, T.S. 1933. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78: 585-586.
- Papaceit, M. & Juan, E. 1998. Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by *in situ* hybridization. *Chromosome Research* 6(1): 49-54.

- Parada, C. 2004. Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
- Pita, S; Panzera, Y; Valente, V.L.S; Das Gracias Silva, Z; García, C; Lauer, A. C; Montes, M.A & Rohde, C. 2014. Cytogenetic mapping of the Müller F element genes in *Drosophila willistoni* group. *Genetica* 142(5): 397-403.
- Powell, J.R. 1977. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. (Oxford Series in Ecology & Evolution). Oxford University Press, New York.
- Powell, A. M.; Matthew D. & Powell, J.R. 2010. Phenotypic Plasticity Across 50 MY of Evolution: *Drosophila* Wing Size and Temperature. *Journal of Insect Physiology* 56(4): 380-382.
- Powell, J.R.; Dion, K.; Papaceit, M.; Aguade, M.; Vicario, S.; Garrick, R.C. 2011. Nonrecombining genes in a recombination environment: the *Drosophila* "dot" chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 28(1): 825-833.
- Rieger, T.T.; Monte, E.S.; Pessoa-Junior, M.E.; Oliveira, D.L. & Santos, J.F. 2013. New spontaneous wing mutant *curly* in *Drosophila willistoni* strain GdH4-1. *Drosophila Information Service* 96: 222-225.
- Schaeffer, S.W.; Bhutkar, A.; McAllister, B.F.; Matsuda, M.; Matzkin, L.M.; O'Grady, P.M.; Rohde, C.; Valente, V.L.S.; Aguade, 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.; Tobar, 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 Company, San Francisco, 859p.
- Soler, A.M. 2012. Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
- Soler, A. M. & Goñi, B. 2012. Linkage relationships of spontaneous mutations in *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* 95: 129-139.
- Spassky, B. & Dobzhansky, T. 1950. Comparative genetics of *Drosophila willistoni*. *Heredity* 4: 201-215.

- Sperlich, D. & Pfriem, P. 1986. Chromosomal Polymorphism in natural and experimental populations. *Genetics and Biology of Drosophila*, Eds. M. Ashburner; H.L. Carson & J.N. Thompson, Jr. Academic Press, London, 3ed: 257-309.
- Sturtevant, A.H. 1917. Genetic factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 3: 555-558.
- Sturtevant, A.H. 1926. A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to inversion of a section of the third chromosome. *Biologische Zentralblatt* 46: 697-702.
- Sturtevant, A.H. & Novitski, E. 1941. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* 26: 517-541.
- Tan, C.C. 1935. Salivary gland chromosomes in the two races of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* 20: 392-402.
- Valente, V.L.S.; Rohde, C.; Valiati, V.H.; Morales, N.B. & Goni, B. 2001. Chromosome inversions occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* 84: 55-59.
- 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.
- Waddington, C.H. (1940). The genetic control of wing development in *Drosophila*. *Journal of Genetica* 41: 75-139.

ANEXOS

Anexo I. Recombinación en machos de *D. willistoni*

TABLA 1. Recombinación en machos. Análisis de la progenie F2 de un individuo F1 producto del cruzamiento entre cepas marcadoras del cromosoma 2 o 3 y las cepas salvajes indicadas.

		Marcador cromosoma 2								Marcador cromosoma 3							
Cepa salvaje	Progenie Total	<i>bwpx cn</i>		Recombinantes	%	Progenie Total	<i>bw cui cn</i>				%	Progenie Total	<i>kay e ro</i>				%
		+++	<i>bwpx cn</i>				+++	<i>bw cn</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>			+++	<i>e ro</i>	<i>e</i>	<i>ro</i>	
SG2.02	138	89	49	0	0.47	55	27	28	0	0	0.29	344	245	98	1	0	
	129	72	57	0		96	49	47	0	0		72	50	22	0	0	
	131	80	51	0		67	41	26	0	0		248	198	46	1	3	1.61
	197	110	87	0		140	80	60	0	0		46	28	18	0	0	
						14	10	4	0	0		142	107	35	0	0	
						28	19	9	0	0		124	90	34	0	0	
						125	71	54	0	0		141	104	37	0	0	
						214	113	100	1	0		380	241	139	0	0	
						53	25	28	0	0		154	114	40	0	0	
						76	41	35	0	0		224	152	72	0	0	
				170	88	82	0	0	173	116	57	0	0				
				41	22	19	0	0	401	221	180	0	0				
SG22.02	150	73	77	0	0.18	274	141	133	0	0	0.18	251	148	103	0	0	
	44	24	20	0		44	21	23	0	0		465	279	186	0	0	
	41	41	0	0		44	26	18	0	0		459	273	186	0	0	
	60	42	18	0		64	38	26	0	0		455	264	191	0	0	
	69	36	33	0								168	98	70	0	0	
												569	351	217	0	1	
									406	240	166	0	0				
									654	423	231	0	0				
									169	100	69	0	0				
									369	233	136	0	0				
									126	81	45	0	0				
									339	196	143	0	0				
SY3.01	78	42	36	0	0.18	118	56	62	0	0	0.18	7	5	2	0	0	
	60	36	24	0		117	69	48	0	0		309	185	124	0	0	
	126	45	81	0		130	64	66	0	0		200	147	53	0	0	
	99	48	51	0		29	14	15	0	0		79	53	26	0	0	
						53	31	22	0	0		138	103	35	0	0	
						168	84	84	0	0		80	57	23	0	0	
						152	72	80	0	0		64	46	18	0	0	
						113	60	53	0	0		56	47	9	0	0	
						184	96	88	0	0		178	108	70	0	0	
						50	26	24	0	0		36	27	9	0	0	
						48	31	17	0	0							
				64	23	41	0	0									
				72	31	41	0	0									
SB6.03	98	46	52	0	0.18	73	41	32	0	0	0.18	347	193	154	0	0	
	156	82	74	0		70	33	37	0	0		549	367	181	0	1	
	150	85	65	0		81	40	41	0	0		273	163	110	0	0	
	183	101	82	0								621	376	245	0	0	
	66	41	25	0								380	255	125	0	0	
												260	162	98	0	0	
									262	165	97	0	0				
									162	94	68	0	0				
									310	169	141	0	0				
									402	236	166	0	0				

TABLA 1. Recombinación en machos de *D. willistoni*. (cont.)

Cepa salvaje	Marcador cromosoma 2					Marcador cromosoma 3											
	Progenie Total	<i>bwp x cn</i>		Recombinantes	% Recomb.	Progenie Total	<i>bw cui cn</i>			% Recomb.	Progenie Total	<i>kay e ro</i>			% Recomb.		
		+++	<i>bw px cn</i>				+++	<i>bw cn</i>	<i>bw</i>			<i>cn</i>	+++	<i>e ro</i>		<i>e ro</i>	
SB8.02	226	133	93	0		102	48	54	0	0		562	347	215	0	0	
	205	108	97	0		44	28	16	0	0		243	150	93	0	0	
	126	75	51	0		84	49	35	0	0		33	16	17	0	0	
	220	115	105	0		203	130	73	0	0		367	226	141	0	0	
	187	91	96	0		119	41	78	0	0		40	23	17	0	0	
												254	166	88	0	0	
												118	81	37	0	0	
												235	153	82	0	0	
												221	133	88	0	0	
												264	175	89	0	0	
												125	73	52	0	0	
												78	49	29	0	0	
												76	52	24	0	0	
												34	16	18	0	0	
TB10.02	125	78	47	0		80	41	39	0	0		505	308	197	0	0	
	50	27	23	0		66	39	27	0	0		316	221	95	0	0	
	139	73	66	0		66	36	30	0	0		46	30	16	0	0	
	28	13	15	0		54	27	27	0	0		106	69	37	0	0	
	88	47	41	0		153	77	76	0	0		450	276	174	0	0	
						200	118	82	0	0		194	130	64	0	0	
						118	67	51	0	0		450	275	172	0	3	0.67
						58	36	22	0	0		205	135	70	0	0	
						23	13	10	0	0		151	87	64	0	0	
						38	20	18	0	0							
						144	90	54	0	0							
TB37.02	138	68	70			10	4	6	0	0		124	69	55	0	0	
	157	92	65			29	21	8	0	0		208	136	72	0	0	
	135	70	65			31	20	11	0	0		187	130	57	0	0	
	193	107	86			29	16	13	0	0		247	178	69	0	0	
						28	17	11	0	0		264	191	73	0	0	
						30	21	9	0	0		127	94	33	0	0	
												105	70	35	0	0	
												49	35	14	0	0	
												176	128	48	0	0	
GDH	41	21	20	0		149	77	70	2	0	1.34						
	23	14	9	0		232	136	96	0	0							
	4	0	4	0		350	138	212	0	0							
	17	7	10	0		128	67	61	0	0							
	7	4	3	0		50	30	20	0	0							
	43	18	25	0		99	53	46	0	0							
	38	19	19	0		40	21	19	0	0							
	102	59	43	0		127	74	47	6	0	4.72						
	17	12	5	0		57	40	14	3	0	5.26						
	235	123	112	0		49	31	18	0	0							
	20	12	8	0		50	32	18	0	0							
	37	20	17	0		162	98	64	0	0							
	77	47	30	0		6	4	2	0	0							
	38	22	16	0		99	56	43	0	0							
	80	46	34	0		179	108	71	0	0							
	31	13	18	0		27	15	12	0	0							
	16	6	10	0		24	18	6	0	0							

TABLA 2. Recombinación en machos. Análisis de la progenie F2 un individuo F1 producto del cruzamiento entre las cepas marcadoras *bw cui cn* (cromosoma 2) y *kay; e ro* (cromosoma 3).

Retrocruza con marcador cromosoma 2						Retrocruza con marcador cromosoma 3											
Progenie	Parentales		Recombinantes		%	Progenie	Parentales		Recombinantes		%	Progenie	Parentales		Recombinantes		%
Total	++	<i>bw cn</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>	Recombinación	Total	++	<i>bw cn</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>	Recombinación	Total	++	<i>e ro</i>	<i>e</i>	<i>ro</i>	Recombinación
Cruzamiento	♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ F1 (♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ <i>kay e ro</i>)					Cruzamiento	♀ <i>bw cui cn</i> X ♂ F1 (♀ <i>kay e ro</i> X ♂ <i>bw cui cn</i>)					Cruzamiento	♀ <i>kay e ro</i> X ♂ F1 (♀ <i>kay e ro</i> X ♂ <i>bw cui cn</i>)				
140	65	75	0	0		51	27	24	0	0		73	58	15	0	0	
187	97	90	0	0		102	59	43	0	0		151	103	48	0	0	
89	73	16	0	0		84	58	26	0	0		68	42	26	0	0	
184	109	75	0	0		12	5	7	0	0		501	315	186	0	0	
149	86	63	0	0		17	8	9	0	0		27	17	10	0	0	
36	26	10	0	0		89	45	44	0	0		311	178	133	0	0	
113	63	50	0	0		20	10	10	0	0		160	101	59	0	0	
104	70	34	0	0		118	67	51	0	0		16	7	9	0	0	
37	16	21	0	0		106	62	44	0	0		106	70	36	0	0	
12	4	8	0	0		26	13	13	0	0		307	182	125	0	0	
19	10	9	0	0		78	48	30	0	0		270	154	116	0	0	
44	26	18	0	0		121	68	53	0	0		166	122	44	0	0	
80	43	37	0	0		154	91	63	0	0		90	25	65	0	0	
106	64	42	0	0		15	12	3	0	0		168	106	62	0	0	
78	42	36	0	0		22	13	9	0	0		140	84	56	0	0	
						37	20	17	0	0		140	90	50	0	0	
						80	40	40	0	0							

Anexo II. Segregación del fenotipo *curvi* en *D. willistoni*

TABLA 3. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F1 de los cruzamientos entre la cepa marcadora del cromosoma 2 (*bw cui cn*) y las isolíneas salvajes indicadas.

Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total	Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total
		♀	♂				♀	♂	
SB6.03	<i>cui</i>	54	134	188 (69.9%)	TB37.02	<i>cui</i>	33	92	125 (66.5%)
	+	72	9	81		+	58	5	63
	Total	126	143	269		Total	91	97	188
SG22.02	<i>cui</i>	26	130	156 (69.0%)	SB8.02	<i>cui</i>	46	100	146 (76.0%)
	+	58	12	70		+	40	6	46
	Total	84	142	226		Total	86	106	192
TB10.02	<i>cui</i>	3	45	48 (53.9%)					
	+	41	0	41					
	Total	44	45	89					

TABLA 4. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F2 de los cruzamientos entre machos F1 híbridos (*bw cui cn/+*) fenotípicamente salvaje y hembras de isolíneas salvajes. Detallado en la FIGURA 8A.

Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total	Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total
		♀	♂				♀	♂	
SB6.03	[<i>cui</i>]	69	226	295	SB8.02	[<i>cui</i>]	50	67	117
	[+]	398	286	684		[+]	206	121	327
	Total	467	512	979		Total	256	188	444
SG22.02	[<i>cui</i>]	17	46	63	TB37.02	[<i>cui</i>]	7	17	24
	[+]	119	102	221		[+]	55	12	67
	Total	136	148	284		Total	62	29	91

TABLA 5. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F2 del cruzamiento entre hembra de la isolínea salvaje TB37.02 y macho F1 (*bw cui cn/+*) fenotípicamente *curvi*. Detallado en

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	43	99	142
[+]	184	103	287
Total	227	202	429

la FIGURA 8B.

TABLA 6. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F2 de los cruzamientos entre hembra marcadora *bw cui cn* y machos F1 (*bw cui cn/+*) fenotípicamente *curvi*. Detallado en la FIGURA 8E.

Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total	Cepa Salvaje	Fenotipo	Sexo		Total
		♀	♂				♀	♂	
	[<i>cui</i>]	62	109	171		[<i>cui</i>]	187	269	456
SB6.03	[+]	46	7	53	SB8.02	[+]	79	17	96
	Total	108	116	224		Total	266	286	552
	[<i>cui</i>]	122	179	301		[<i>cui</i>]	48	60	108
SG22.02	[+]	99	26	125	TB37.02	[+]	39	10	49
	Total	221	205	426		Total	87	70	157

Tabla 7. Segregación de *cui*. Análisis de la progenie F2 del cruzamiento entre hembra *bw cui cn* y macho F1 (*bw cui cn/+*) fenotípicamente salvaje. Detallado en la FIGURA 8D.

Progenie F2 Total/macho	Parentales				Recombinantes								
	<i>bw cui cn</i>		+++		<i>bw</i>		<i>cn</i>		<i>bw cn</i>		<i>cui</i>		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
57	5	9	18	2	0	0	0	3	0	0	1	19	
49	10	7	11	3	0	0	0	0	1	0	1	16	
162	31	31	50	3	0	0	0	0	2	0	6	39	
179	42	27	57	14	0	0	0	0	2	0	5	32	
27	7	5	3	6	0	0	0	0	0	0	0	6	
24	3	3	8	6	0	0	0	0	0	0	0	4	
Total	498	98	82	147	34	0	0	0	3	5	0	13	116

Tabla 8. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F2 del cruzamiento entre hembra *bw cui cn* y macho F1 (*bw cui cn /+*) fenotípicamente salvaje. Detallado en la FIGURA 6.

Progenie F2 Total/macho	Parentales				Recombinantes								
	<i>bw cui cn</i>		+++		<i>bw</i>		<i>cn</i>		<i>bw cn</i>		<i>cui</i>		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
127	27	17	10	24	4	2	0	0	1	2	22	18	
50	10	7	12	6	0	0	0	0	1	0	4	10	
6	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
99	16	26	26	3	0	0	0	0	1	0	4	23	
Total	282	55	50	50	33	4	2	0	0	3	2	30	53

Tabla 9. Segregación de *curvi*. Análisis de la progenie F2 del cruzamiento entre hembra *bw cn* y macho F1 (*bw cui cn/ +*) fenotípicamente *curvi*. Detallado en la FIGURA 8C.

Progenie F2	Parentales				Recombinantes								
	Total/ macho	<i>bw cui cn</i>		+++	<i>bw</i>		<i>cn</i>		<i>bw cn</i>		<i>cui</i>		
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
149	0	2	31	44	2	0	0	0	41	27	2	0	
232	4	27	72	63	0	0	0	0	40	25	1	0	
350	6	19	69	69	0	0	0	0	114	73	0	0	
128	1	17	32	34	0	0	0	0	30	13	0	1	
50	3	1	14	16	0	0	0	0	8	8	0	0	
99	4	8	33	20	0	0	0	0	25	9	0	0	
40	1	1	15	6	0	0	0	0	7	10	0	0	
Total	1048	19	75	266	252	2	0	0	0	265	165	3	1

Anexo III. Test G de independencia.

Tablas de contingencia y cálculos del test G de independencia realizados para el análisis de expresión de *cui*

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)

TABLA 10. Test G de independencia. Análisis estadístico para la cepa *bw cui cn*. **A)** 17°C, **B)** 25°C

A) Cepa *bw cui cn* cultivada a 17°C

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>bwcuicn</i>]	790	1198	1988
[<i>bwcn</i>]	375	82	457
Total	1165	1280	2445

$$Q1 = 790 \ln 790 + 1198 \ln 1198 + 375 \ln 375 + 82 \ln 82$$

$$Q1 = 5270,906 + 8491,914 + 2222,597 + 361,351$$

$$Q1 = 16346,768$$

$$Q2 = 1988 \ln 1988 + 457 \ln 457 + 1165 \ln 1165 + 1280 \ln 1280$$

$$Q2 = 15098,63 + 2798,98 + 8225,455 + 9157,908$$

$$Q2 = 35280,973$$

$$Q3 = 2445 \ln 2445$$

$$Q3 = 19075,4$$

$$G = 2(16346,768 - 35280,973 + 19075,4)$$

G=282.39

B) Cepa *bw cui cn* cultivada a 25°C

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>bw cui cn</i>]	531	620	1151
[<i>bw cn</i>]	0	0	0
Total	531	620	1151

$$Q1 = 531 \ln 531 + 620 \ln 620 + 0 \ln 0 + 0 \ln 0$$

$$Q1 = 3331,899 + 3986,426 + 0 + 0$$

$$Q1 = 7318,325$$

$$Q2 = 1151 \ln 1151 + 0 \ln 0 + 531 \ln 531 + 620 \ln 620$$

$$Q2 = 8112,693 + 0 + 3331,899 + 3986,426$$

$$Q2 = 15431,018$$

$$Q3 = 1151 \ln 1151$$

$$Q3 = 8112,693$$

$$G = 2(7318,325 - 15431,018 + 8112,693)$$

G=0

TABLA 11. Test G de independencia. Análisis estadístico del fenotipo de individuos de la progenie F1 del cruce entre hembra *bw cui cn* y machos salvajes de las isolíneas indicadas **A)** SG22.02. **B)** SB6.03. **C)** TB10.02. **D)** TB37.02. **E)** SB8.02

A) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SG22.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	26	130	156
[+]	58	12	70
Total	84	142	226

$$Q1 = 26 \ln 26 + 130 \ln 130 + 58 \ln 58 + 12 \ln 12$$

$$Q1 = 84,711 + 632,779 + 235,506 + 29,819$$

$$Q1 = 982,815$$

$$Q2 = 156 \ln 156 + 70 \ln 70 + 84 \ln 84 + 142 \ln 142$$

$$Q2 = 787,778 + 297,395 + 372,189 + 703,727$$

$$Q2 = 2161,089$$

$$Q3 = 226 \ln 226$$

$$Q3 = 1225,041$$

$$G = 2 (982,815 - 2161,089 + 1225,041)$$

G=93,534

B) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB6.03

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	54	134	188
[+]	72	9	81
Total	126	143	269

$$Q1 = 54 \ln 54 + 134 \ln 134 + 72 \ln 72 + 9 \ln 9$$

$$Q1 = 215,405 + 656,311 + 307,92 + 19,775$$

$$Q1 = 1199,411$$

$$Q2 = 188 \ln 188 + 81 \ln 81 + 126 \ln 126 + 143 \ln 143$$

$$Q2 = 984,451 + 355,950 + 609,372 + 709,687$$

$$Q2 = 2659,46$$

$$Q3 = 269 \ln 269$$

$$Q3 = 1504,977$$

$$G = 2 (1199,411 - 2659,46 + 1504,977)$$

G=89,856

C) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea TB10.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	3	45	48
[+]	41	0	41
Total	44	45	89

$$Q1 = 3 \ln 3 + 45 \ln 45 + 41 \ln 41 + 0 \ln 0$$

$$Q1 = 3,296 + 171,3 + 152,256 + 0$$

$$Q1 = 326,852$$

$$Q2 = 48 \ln 48 + 41 \ln 41 + 44 \ln 44 + 45 \ln 45$$

$$Q2 = 185,818 + 152,256 + 166,504 + 171,3$$

$$Q2 = 675,878$$

$$Q3 = 89 \ln 89$$

$$Q3 = 399,489$$

$$G = 2 (326,852 - 675,878 + 399,489)$$

G=100,926

D) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea TB37.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	33	92	125
[+]	58	5	63
Total	91	97	188

$$Q1 = 33 \ln 33 + 92 \ln 92 + 58 \ln 58 + 5 \ln 5$$

$$Q1 = 115,385 + 416,005 + 235,506 + 8,047$$

$$Q1 = 774,943$$

$$Q2 = 125 \ln 125 + 63 \ln 63 + 91 \ln 91 + 97 \ln 97$$

$$Q2 = 603,539 + 261,017 + 410,488 + 443,747$$

$$Q2 = 1718,791$$

$$Q3 = 188 \ln 188$$

$$Q3 = 984,451$$

$$G = 2 (774,943 - 1718,791 + 984,451)$$

G=81,206

E) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB8.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	46	100	146
[+]	40	6	46
Total	86	106	192

$$Q1 = 46 \ln 46 + 100 \ln 100 + 40 \ln 40 + 6 \ln 6$$

$$Q1 = 176,118 + 460,517 + 147,555 + 10,751$$

$$Q1 = 794,941$$

$$Q2 = 146 \ln 146 + 46 \ln 46 + 86 \ln 86 + 106 \ln 106$$

$$Q2 = 727,607 + 176,118 + 383,074 + 494,325$$

$$Q2 = 1781,124$$

$$Q3 = 192 \ln 192$$

$$Q3 = 1009,439$$

$$G = 2 (794,941 - 1781,124 + 1009,439)$$

G=46,512

TABLA 12. Test G de Independencia. Análisis estadístico del fenotipo del individuo de la progenie F2 del cruce entre hembras salvajes y machos híbridos F1 (*bw cui cn/+*) fenotípicamente salvaje. Los cromosomas salvajes corresponden a las siguientes isolíneas. **A)** SG22.02. **B)** SB6.03. **C)** TB37.02. **D)** SB8.02.

A) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SG22.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	17	46	63
[+]	119	102	221
Total	136	148	284

$$Q1 = 17 \ln 17 + 46 \ln 46 + 119 \ln 119 + 102 \ln 102$$

$$Q1 = 48,165 + 176,118 + 568,716 + 471,747$$

$$Q1 = 1264,746$$

$$Q2 = 63 \ln 63 + 221 \ln 221 + 136 \ln 136 + 148 \ln 148$$

$$Q2 = 261,017 + 1192,994 + 668,121 + 739,587$$

$$Q2 = 2861,719$$

$$Q3 = 284 \ln 284$$

$$Q3 =$$

$$Q3 = 1604,309$$

$$G = 2 (1264,746 - 2861,719 + 1604,309)$$

G= 14,672

B) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB6.03

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	69	226	295
[+]	398	286	684
Total	467	512	979

$$Q1 = 69 \ln 69 + 226 \ln 226 + 398 \ln 398 + 286 \ln 286$$

$$Q1 = 292,153 + 1225,041 + 2382,608 + 1617,614$$

$$Q1 = 5517,416$$

$$Q2 = 295 \ln 295 + 684 \ln 684 + 467 \ln 647 + 512 \ln 512$$

$$Q2 = 1677,658 + 4465,123 + 2870,336 + 3194,022$$

$$Q2 = 12207,139$$

$$Q3 = 979 \ln 979$$

$$Q3 = 6741,914$$

$$G = 2 (5517,416 - 12207,139 + 6741,914)$$

G=104,382

C) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea TB37.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	7	17	24
[+]	55	12	67
Total	62	29	91

$$Q1 = 7 \ln 7 + 17 \ln 17 + 55 \ln 55 + 12 \ln 12$$

$$Q1 = 13.621 + 48.165 + 220.403 + 29.819$$

$$Q1 = 312.008$$

$$Q2 = 24 \ln 24 + 67 \ln 67 + 62 \ln 62 + 29 \ln 29$$

$$Q2 = 76.73 + 281.714 + 255.882 + 97.652$$

$$Q2 = 711.522$$

$$Q3 = 91 \ln 91$$

$$Q3 = 410.488$$

$$G = 2 (312,008 - 711,522 + 410,488)$$

G=21,948

D) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB8.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	50	67	117
[+]	206	121	327
Total	256	188	444

$$Q1 = 50 \ln 50 + 67 \ln 67 + 206 \ln 206 + 121 \ln 121$$

$$Q1 = 195,601 + 281,714 + 1097,542 + 580,291$$

$$Q1 = 2155,148$$

$$Q2 = 117 \ln 117 + 327 \ln 327 + 256 \ln 256 + 188 \ln 188$$

$$Q2 = 557,174 + 1893,317 + 1419,565 + 984,451$$

$$Q2 = 4854,507$$

$$Q3 = 444 \ln 444$$

$$Q3 = 2706,546$$

$$G = 2 (2155,148 - 4854,507 + 2706,546)$$

G=14,374

TABLA 13. Test G de independencia. Análisis estadístico de la progenie F2 del cruce diagramado en la FIGURA 8B.

Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea TB37.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	43	99	142
[+]	184	103	287
Total	227	202	429

$$Q1 = 43 \ln 43 + 99 \ln 99 + 184 \ln 184 + 103 \ln 103$$

$$Q1 = 161.732 + 454.917 + 959.548 + 477.377$$

$$Q1 = 2053.374$$

$$Q2 = 142 \ln 142 + 287 \ln 287 + 227 \ln 227 + 202 \ln 202$$

$$Q2 = 703.727 + 1624.271 + 1231.464 + 1072.27$$

$$Q2 = 4631.732$$

$$Q3 = 429 \ln 429$$

$$Q3 = 2600.365$$

$$G = 2 (2053.374 - 4631.732 + 2600.365)$$

G=44.014

TABLA 14. Test G de independencia. Análisis estadístico para la progenie F1 del cruce entre macho fenotípicamente salvaje de la cepa *bw cui cn* y hembra de la isolínea TB37.02 a 25°C.

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	10	46	56
[+]	62	11	73
Total	72	57	129

$$Q1 = 10 \ln 10 + 46 \ln 46 + 62 \ln 62 + 11 \ln 11$$

$$Q1 = 23,026 + 176,118 + 255,882 + 26,377$$

$$Q1 = 481,403$$

$$Q2 = 56 \ln 56 + 73 \ln 73 + 72 \ln 72 + 57 \ln 57$$

$$Q2 = 225,42 + 313,204 + 307,92 + 230,454$$

$$Q2 = 1076,998$$

$$Q3 = 129 \ln 129$$

$$Q3 = 626,916$$

$$G = 2 (481,403 - 1076,998 + 626,916)$$

G= 62,642

TABLA 15. Test G de independencia. Análisis estadístico del fenotipo de la progenie F2 del cruce entre hembras *bw cui cn* y machos (*bw cui cn/+*) fenotípicamente *curvi* diagramado en la FIGURA 8C. Los cromosomas salvajes provienen de las siguientes isolíneas: **A)** SG22.02. **B)** SB6.03. **C)** TB37.02. **D)** SB8.02.

A) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SG22.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	122	179	301
[+]	99	26	125
Total	221	205	426

$$Q1 = 122 \ln 122 + 179 \ln 179 + 99 \ln 99 + 26 \ln 26$$

$$Q1 = 586,091 + 928,542 + 454,917 + 84,711$$

$$Q1 = 2054,261$$

$$Q2 = 301 \ln 301 + 125 \ln 125 + 221 \ln 221 + 205 \ln 205$$

$$Q2 = 1717,84 + 603,539 + 1192,994 + 1091,217$$

$$Q2 = 4605,59$$

$$Q3 = 426 \ln 426$$

$$Q3 = 2579,191$$

$$G = 2 (2054,261 - 4605,59 + 2579,191)$$

G= 55,724

B) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB6.03

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	62	109	171
[+]	46	7	53
Total	108	116	224

$$Q1 = 62 \ln 62 + 109 \ln 109 + 46 \ln 46 + 7 \ln 7$$

$$Q1 = 255,882 + 511,357 + 176,118 + 13,621$$

$$Q1 = 956,978$$

$$Q2 = 171 \ln 171 + 53 \ln 53 + 108 \ln 108 + 116 \ln 116$$

$$Q2 = 879,224 + 210,425 + 505,67 + 551,416$$

$$Q2 = 2146,735$$

$$Q3 = 224 \ln 224$$

$$Q3 = 1212,209$$

$$G = 2 (956,978 - 2146,735 + 1212,209)$$

G= 44,904

C) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea TB37.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	48	60	108
[+]	39	10	49
Total	87	70	157

$$Q1 = 48 \ln 48 + 60 \ln 60 + 39 \ln 39 + 10 \ln 10$$

$$Q1 = 185,818 + 245,661 + 142,879 + 23,026$$

$$Q1 = 597,384$$

$$Q2 = 108 \ln 108 + 49 \ln 49 + 87 \ln 87 + 70 \ln 70$$

$$Q2 = 505,67 + 190,699 + 388,534 + 297,395$$

$$Q2 = 1382,298$$

$$Q3 = 157 \ln 157$$

$$Q3 = 793,831$$

$$G = 2 (597,384 - 1382,298 + 793,831)$$

G=17,834

D) Cromosoma salvaje proveniente de la isolínea SB8.02

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	187	269	456
[+]	79	17	96
Total	266	286	552

$$Q1 = 187 \ln 187 + 269 \ln 269 + 79 \ln 79 + 17 \ln 17$$

$$Q1 = 978,217 + 1504,977 + 345,186 + 48,165$$

$$Q1 = 2876,545$$

$$Q2 = 456 \ln 456 + 96 \ln 96 + 266 \ln 266 + 286 \ln 286$$

$$Q2 = 2791,857 + 438,177 + 1485,21 + 1617,614$$

$$Q2 = 6332,858$$

$$Q3 = 552 \ln 552$$

$$Q3 = 3485,079$$

$$G = 2 (2876,545 - 6332,858 + 3485,079)$$

G=57,532

TABLA 16. Test G de independencia. Análisis estadístico de la progenie F2 del cruce plasmado en la FIGURA 8D

Cromosoma salvaje proveniente de GDH

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[cui]	85	103	188
[+]	57	37	94
Total	142	140	282

$$Q1 = 85 \ln 85 + 103 \ln 103 + 57 \ln 57 + 37 \ln 37$$

$$Q1 = 377,625 + 477,377 + 230,454 + 133,604$$

$$Q1 = 1219,06$$

$$Q2 = 188 \ln 188 + 94 \ln 94 + 142 \ln 142 + 140 \ln 140$$

$$Q2 = 984,451 + 427,07 + 703,727 + 691,83$$

$$Q2 = 2807,078$$

$$Q3 = 282 \ln 282$$

$$Q3 = 1591,018$$

$$G = 2 (1219,06 - 2807,078 + 1591,018)$$

G=6,00

TABLA 17. Test G de independencia. Análisis estadístico de la progenie F2 del cruce diagramado en la FIGURA 7E.

Cromosoma salvaje proveniente de GDH

Fenotipo	Sexo		Total
	♀	♂	
[<i>cui</i>]	111	198	309
[+]	152	37	189
Total	263	235	498

$$Q1 = 111 \ln 111 + 198 \ln 198 + 152 \ln 152 + 37 \ln 37$$

$$Q1 = 522,758 + 1047,077 + 763,63 + 133,604$$

$$Q1 = 2467,069$$

$$Q2 = 309 \ln 309 + 189 \ln 189 + 263 \ln 263 + 235 \ln 235$$

$$Q2 = 1771,602 + 990,690 + 1465,477 + 1283,003$$

$$Q2 = 5510,772$$

$$Q3 = 498 \ln 498$$

$$Q3 = 3092,879$$

$$G = 2 (2467,069 - 5510,772 + 3092,879)$$

$$G = 98,352$$

Anexo IV. Medio de cultivo

Beatriz Goñi
Lab. Drosophila, Sección Genética Evolutiva
Facultad de Ciencias, 2009

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

Preparación:

- 1) $\frac{2}{3}$ del Agua fría, agregar Agar + Levadura. Cocer a fuego fuerte revolviendo constantemente hasta que rompa el hervor.
- 2) Aparte, mezclar $\frac{1}{3}$ del Agua fría + Maíz. Agregar a la preparación primera una vez que esta 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 ácido 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. Se utiliza "AGAR-AGAR 900" comercial.

Levadura: Fuente de proteínas. Se utiliza levadura seca de los panaderos

Harina de Maíz: Material de sostén, relleno.

Glucosa (=Dextrosa): Fuente de energía. Usar glucosa en polvo comercial.

Agentes antibacterianos y fungicidas: "Nipagin" se utiliza en la conservación de los alimentos en la industria. Se acidifica el medio con Ácido propiónico