

Tesis de Licenciatura

Desequilibrios gaméticos entre ordenaciones del cromosoma 2 y siete loci enzimáticos en una población natural de *Drosophila buzzatii*

Piccinali, Romina V.

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

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

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Piccinali, Romina V.. (). Desequilibrios gaméticos entre ordenaciones del cromosoma 2 y siete loci enzimáticos en una población natural de *Drosophila buzzatii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000649_Piccinali

Cita tipo Chicago:

Piccinali, Romina V.. "Desequilibrios gaméticos entre ordenaciones del cromosoma 2 y siete loci enzimáticos en una población natural de *Drosophila buzzatii*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000649_Piccinali

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

**“Desequilibrios gaméticos entre
ordenaciones del cromosoma 2 y siete
loci enzimáticos en una población
natural de *Drosophila buzzatii*”**

Tesis de Licenciatura



Autora: Romina V. Piccinali

Director: Dr. Esteban R. Hasson

Co-directora: Dra. Constantina Rodríguez

Lugar de trabajo: Grupo de Investigación en
Biología Evolutiva (G.I.B.E.)

Marzo 1999

FCE y N BIBLIOTECA

La complejidad es un fenómeno inherente a todos los sistemas biológicos, entre ellos los sistemas genéticos o multilocus. En estos se hacen necesarios nuevos parámetros para describir la composición genética de las poblaciones, entre ellos el desequilibrio gamético. El análisis de este último puede arrojar luz sobre las causas del valor adaptativo diferencial de los portadores de distintas ordenaciones cromosómicas, como ocurre en el caso del polimorfismo de inversión del cromosoma 2 de *Drosophila buzzatii*, una especie cactófila originaria de América del Sur. Esto se debe a que las inversiones capturan en su interior conjuntos particulares de alelos pertenecientes a diferentes loci, que quedan protegidos de la recombinación y funcionan como una unidad segregacional. Este fenómeno se traduce entonces como diferenciación genética, debido a la presencia de asociaciones no aleatorias entre dichos loci y los cromosomas, las cuales podrían ser las responsables del valor adaptativo diferencial de cada una de las inversiones.

En el presente trabajo se analizó el desequilibrio gamético entre siete loci enzimáticos y el polimorfismo de inversión del cromosoma 2 en una población natural de *D. buzzatii*. Sólo tres de estos loci, Est-1 (Esterasa-1), Est-2 (Esterasa-2) y Xdh (Xantín-deshidrogenasa), los cuales mapean dentro, cerca y lejos respectivamente de los segmentos involucrados en los reordenamientos cromosómicos, exhibieron desequilibrios significativos, postulándose distintas explicaciones para la presencia de los mismos. También se detectaron desequilibrios entre pares de alelos de estos tres loci, de los cuales sólo una combinación presentó resultados significativos para los dos componentes de desequilibrio presentes en loci asociados a un sistema de inversiones: el componente "entre" (desequilibrio por covarianza) y el componente "dentro". El resto de las asociaciones mostró sólo desequilibrio "dentro", el cual fue siempre atribuible a una determinada ordenación, sugiriendo que, si los desequilibrios entre enzimas son causados por mecanismos selectivos, el valor adaptativo de las combinaciones alélicas no sería independiente de las ordenaciones cromosómicas.

Los resultados obtenidos fueron acordes con los provenientes de estudios similares en el área de origen y en áreas de colonización de la especie, demostrando la existencia de diferencias genéticas en el contenido de las inversiones del cromosoma 2 previas a la expansión de la especie a otros continentes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Esteban Hasson, por brindarme la posibilidad de incorporarme a su línea de investigación, por su respeto y constante apoyo a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Constantina Rodríguez, por su paciencia y dedicación a lo largo de mi entrenamiento en el laboratorio, por contagiarme su energía y optimismo para encarar desafíos y por enseñarme que siempre hay una manera diferente de ver el mundo.

A los Dres Juan José Fanara y Pedro Fernández-Iriarte, y al resto de la troupe *buzzatii-koepferae*: Marcelo, Paula, Gloria y Luciana, por su ayuda en no pocas ocasiones.

A la Dra. Marta Mudry, directora del G.I.B.E. y a los integrantes de las otras líneas de trabajo: Dra. Alicia Massarini, Dra. Rosa Liascovich, Lic. María Gorostiaga, Lic. Valeria Szapkievich, Lic. Romari Martínez, Lic. Marina Ascunce.

A Jimena, por su amistad y ayuda espiritual, especialmente en mis momentos más críticos de “tesitis”.

A Sonia, por las noches de vampiros, trolls y mandrágoras.

A Irma, por ser la dueña de un mundo amarillo.

A Emilce, por hacerme reír con las situaciones más insólitas.

A Andrea, la paleo-loca, por las incursiones en el pasado, piqueta de por medio, y por los planteos metafísicos rumbo a La Plata.

A Débora, por su paciencia infinita y por el aguante a lo largo de no pocos cuatrimestres.

A Sergio, por las tardes de cine y las confesiones de café.

A Maru y a Delia, por su oído ante mis quejas permanentes, sus oportunos llamados y consejos y, sobre todo, por su cariño incondicional.

A Andre por ser mi hermana del corazón, por tantos años de compartir idas y vueltas por la vida y por el diseño de tapas y carátulas que embellecen este trabajo.

A mis viejos y a Luciana, porque sin su amor y apoyo en todo momento este sueño no sería posible.

- **INTRODUCCIÓN**

- La complejidad, 1
- Los sistemas multilocus, 2
- El desequilibrio gamético, 2
- Las inversiones como generadores de desequilibrio, 6
- Las inversiones cromosómicas en el género *Drosophila*, 7
- El origen de las inversiones, 7
- ¿Qué ocurre mientras tanto con el contenido genético de una inversión y cómo este puede influir en la fijación de la misma?, 8
- El polimorfismo cromosómico de *Drosophila buzzatii*, 11
- Objetivos, 13

- **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Obtención de la muestra, 14
- Cruzamientos, 14
- Medio de cultivo, 16
- Análisis citológico de larvas, 17
- Procesamiento electroforético de adultos y F₁, 17
- Preparación de geles y corridas electroforéticas, 19
- Geles y tampones de corrida, 20
- Soluciones de tinción, 21
- Análisis estadísticos, 26

- **RESULTADOS**

- Comparaciones entre las muestras Otamendi A y B, 30
- Frecuencias cromosómicas y enzimáticas, 33
- Desequilibrios gaméticos cromosoma-enzima, 35
- Desequilibrios gaméticos enzima-enzima, 38

- **DISCUSIÓN**

- Otamendi A versus Otamendi B, 42
- Los desequilibrios cromosoma-enzima, 43
- Los desequilibrios enzima-enzima, 47
- Conclusiones, 49

- **BIBLIOGRAFÍA**

- Bibliografía citada y consultada, 50



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

To every complex problem, there is a simple solution, and it is usually wrong.

H. L. MENCKEN

LA COMPLEJIDAD

Durante varios siglos, desde las ideas de Galileo hasta Descartes y Newton, ha predominado la idea de simplicidad, poniéndose énfasis en la búsqueda de un universo fundamental, estable a través de las apariencias. Sin embargo hoy en día, hay que rendirse ante las evidencias que, en todos los niveles en los cuales pensemos, desde los sistemas planetarios hasta las partículas subatómicas, la naturaleza ya no es explicable en términos de este paradigma clásico (Prigogine, 1983; Weinberg, 1994).

Los nuevos desarrollos en física y matemática asociados con el caos y la inestabilidad han introducido una nueva visión del mundo, donde lo casual y lo irreversible asoman por todas partes. Este “nuevo comportamiento” de la naturaleza conduce a que las propiedades de los sistemas se tornen más complejas, dada su imprevisibilidad, irreversibilidad y dinámica.

La Biología siempre se ha enfrentado con este tipo de problemática, debido a que los sistemas biológicos, en cualquiera de sus niveles de organización, ya sean las moléculas celulares como las poblaciones y los ecosistemas, son sistemas complejos; están formados por un gran número de unidades integradas e interdependientes, cuya acción está coordinada en el espacio y en el tiempo y no están aisladas del entorno, ya que intercambian con el mismo materia y energía.

La Genética, especialmente la Genética de Poblaciones, no es ajena a esta realidad de la complejidad biológica y ha tratado desde muy temprano en su desarrollo de aplicar modelos que ayuden a comprender mejor el funcionamiento de la naturaleza. En este sentido los trabajos pioneros de Fisher (1930) y Wright (1932) plasman la idea que los genes no son entidades aisladas, si no que constituyen sistemas cuyas propiedades emergentes no pueden ser explicadas como la mera suma de cada una de las partes. Los trabajos de este último han resultado particularmente influyentes en el campo de la Biología Evolutiva, donde su “shifting balance theory of evolution” (1968-1978), es un ejemplo perfecto de este esfuerzo por crear modelos complejos que describan los procesos naturales de una manera más real. En el mismo los patrones microevolutivos son explicados considerando simultáneamente la acción de las

distintas fuerzas evolutivas (selección natural, deriva, migración), el efecto de la estructura poblacional y la presencia de interacciones génicas.

LOS SISTEMAS MULTILOCUS

Los genes, como se ha dicho anteriormente, constituyen un tipo particular de sistemas, los llamados sistemas multilocus, nombre que proviene del hecho que están integrados por dos o muchos más loci. En estos sistemas los genes muestran diferentes grados de cohesión, pudiendo ser ésta simplemente de tipo físico o de tipo funcional, en cuyo último caso los loci pueden o no estar juntos pero presentan interacciones entre ellos. En este aspecto merecen destacarse las ideas de Mayr, quien en su libro *Animal Species and Evolution* (1963) puso énfasis en el fenómeno de las interacciones génicas, tanto a nivel de los cromosomas como del genoma y aún del pool génico de las poblaciones.

Cuando se consideran sistemas multilocus para describir los cambios en la estructura genética de una población hay que establecer parámetros diferentes a los que se utilizan para un solo locus, donde las frecuencias alélicas y genotípicas son suficientes para detallar la variación genética poblacional. Si, en cambio, se quiere realizar un análisis que involucre a varios loci simultáneamente, es preciso considerar las frecuencias de las combinaciones alélicas de dichos loci, es decir que serán necesarias las frecuencias gaméticas o haplotípicas.

EL DESEQUILIBRIO GAMÉTICO

Si en una población la asociación de alelos de diferentes loci en las gametas es al azar, es decir que los haplotipos son el resultado del producto de las frecuencias alélicas de cada locus, dicha población se encuentra en equilibrio gamético (EG). En este sentido el EG es para un sistema multilocus análogo al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para un locus y describe el equilibrio que se alcanza en ausencia de fuerzas evolutivas en una población de tamaño infinito con apareamiento al azar. No obstante hay que destacar que el EG es una propiedad de los haplotipos y no de los genotipos.

Sin embargo, existen factores que pueden afectar este equilibrio. El más simple de ellos es el ligamiento, es decir la localización de dos o más loci en un mismo

cromosoma, fenómeno que genera el desvío de las proporciones observadas respecto de las esperadas cuando la segregación de los alelos de cada locus es independiente.

Este desvío de las frecuencias gaméticas esperadas por azar recibe el nombre de desequilibrio gamético (DG), el cual puede ser descripto mediante diferentes parámetros como por ejemplo D (Lewontin y Kojima, 1960).

No obstante, en ausencia de algún factor que lo mantenga, el DG decaerá con el tiempo debido a que la recombinación contrarresta el efecto del ligamiento destruyendo las asociaciones no azarosas.

Puede demostrarse que el DG (cuantificado mediante el parámetro D) varía a lo largo de las generaciones en función de la recombinación de la siguiente manera (Lewontin y Kojima, 1960):

$$D_t = (1-r)^t D_0$$

donde

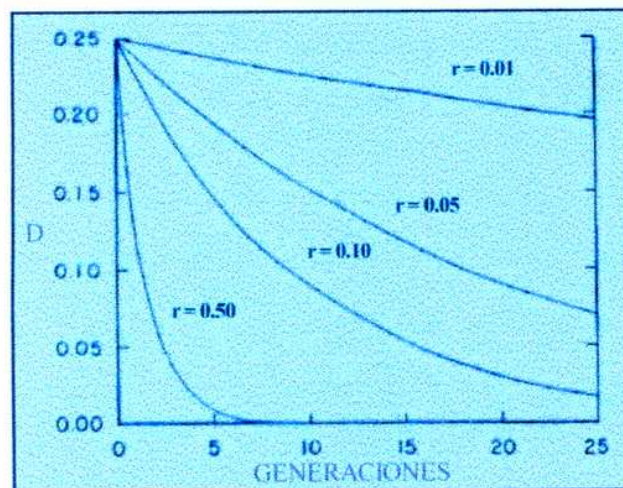
D_t es el desequilibrio gamético en la generación t

D_0 es el desequilibrio gamético inicial

r es la tasa de recombinación

t es el número de generaciones transcurridas.

Por lo cual, cuanto mayor es el valor de r (cuyo máximo es de 0.5) mayor es la velocidad con que se alcanza el EG ($D=0$), es decir menor es el número de generaciones necesarias para que las frecuencias gaméticas sean las correspondientes al producto de las frecuencias alélicas:



Es importante destacar que, a diferencia de lo que ocurre con el EHW que se alcanza luego de una generación de panmixia, una población logra el EG tras numerosas generaciones de apareamiento al azar.

Existen otros factores, además del ligamiento, que pueden provocar DG en las poblaciones naturales (Hedrick et al., 1978; Ridley, 1996, pag. 206):

- Aún no transcurrieron las generaciones suficientes para alcanzar el equilibrio: el número de generaciones necesarias para que se aleatoricen las frecuencias gaméticas puede ser muy grande, especialmente si la tasa de recombinación es muy baja (genes fuertemente ligados). Por ejemplo para que D_0 decaiga a la mitad con $r = 0.001$ se necesitan 693 generaciones.
- Sistema de apareamiento: si el sistema de apareamiento no es panmítico, la tasa de decaimiento del desequilibrio gamético disminuye. Si, por ejemplo, los portadores de un gen A_1 tienden a aparearse con mayor frecuencia con los portadores de un gen B_2 , existirá un exceso de gametas con el genotipo A_1B_2 . También cierto grado de endogamia, reproducción asexual o autofecundación reduce la proporción de heterocigotas, con lo cual disminuye la probabilidad que se formen gametas o individuos recombinantes.
- Tamaño poblacional pequeño: si el N es pequeño, procesos estocásticos como la deriva génica pueden provocar un exceso de algún haplotipo, generándose DG. Este efecto puede hallarse aún en poblaciones que hoy tienen un tamaño grande pero han sufrido algún proceso del tipo efecto fundador o un cuello de botella más o menos recientemente.
- Migración y estructura poblacional: si existe migración o hibridación entre dos poblaciones y las frecuencias alélicas para los diferentes loci son distintas, se generará desequilibrio gamético el cual puede ser cuantificado de acuerdo con la siguiente expresión propuesta por Cavalli-Sforza y Bodmer (1971):

$$D = m_1 m_2 (p_{1x} - p_{1y}) (q_{1x} - q_{1y})$$

donde

m_1 proporción de individuos de la población x

m_2 proporción de individuos de la población y

p_{1x} frecuencia del alelo A_1 en la población x

p_{1y} frecuencia del alelo A_1 en la población y

q_{1x} frecuencia del alelo B_1 en la población x

q_1 y frecuencia del alelo B_1 en la población y,

asumiendo $D = 0$ en cada población.

- La subdivisión poblacional: tiene generalmente un efecto similar al del sistema de apareamiento. Debido a que las subpoblaciones pueden tener frecuencias alélicas diferentes, la frecuencia de heterocigotas es menor a la esperada en una población única más grande (efecto Wahlund) y esta condición reduce la probabilidad de recombinación de las gametas.
- Efecto de arrastre (“genetic hitchhiking”): Thomson (1977) demostró que puede generarse DG entre dos loci neutros por arrastre de un tercer locus favorecido por la selección natural con el cual ambos están asociados.
- Selección natural: los portadores de ciertas combinaciones alélicas tienen un mayor valor adaptativo. Este valor adaptativo total puede depender de tres tipos de relaciones entre los valores adaptativos de cada locus:
 - Independencia aditiva: el valor adaptativo de cada genotipo multilocus es igual a la suma de los valores adaptativos para cada locus:

		LOCUS A		
		A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
LOCUS B	B_1B_1	$\alpha_1 + \beta_1$	$\alpha_2 + \beta_1$	$\alpha_3 + \beta_1$
	B_1B_2	$\alpha_1 + \beta_2$	$\alpha_2 + \beta_2$	$\alpha_3 + \beta_2$
	B_2B_2	$\alpha_1 + \beta_3$	$\alpha_2 + \beta_3$	$\alpha_3 + \beta_3$

- Independencia multiplicativa: el valor adaptativo de cada genotipo multilocus es igual al producto del valor adaptativo para cada locus:

		LOCUS A		
		A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
LOCUS B	B_1B_1	$\alpha_1 \times \beta_1$	$\alpha_2 \times \beta_1$	$\alpha_3 \times \beta_1$
	B_1B_2	$\alpha_1 \times \beta_2$	$\alpha_2 \times \beta_2$	$\alpha_3 \times \beta_2$
	B_2B_2	$\alpha_1 \times \beta_3$	$\alpha_2 \times \beta_3$	$\alpha_3 \times \beta_3$

- Interacciones epistáticas: cada genotipo posee un valor adaptativo determinado que no puede explicarse en términos de suma o producto de los genotipos para cada locus (no existe independencia aditiva ni multiplicativa para los valores adaptativos de los loci):

		LOCUS A		
		A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
LOCUS B	B_1B_1	α_1	α_4	α_7
	B_1B_2	α_2	α_5	α_8
	B_2B_2	α_3	α_6	α_9

LAS INVERSIONES COMO GENERADORES DE DESEQUILIBRIO

Las inversiones son un tipo de alteración cromosómica estructural en la cual un segmento de un cromosoma se ubica en sentido inverso respecto de la secuencia normal o estándar.

Podemos considerarlas como un tipo particular de sistemas multilocus, ya que afectan las relaciones de ligamiento de los genes contenidos en los cromosomas que las portan. Esto se debe a que, al generarse, capturan en su interior un conjunto particular de alelos pertenecientes a diferentes loci, que quedan protegidos de la recombinación, y funcionan como una unidad segregacional. Esta inhibición de la recombinación se explica porque los individuos heterocigotas para un cromosoma portador de una inversión, producen durante la meiosis gametas recombinantes que no son balanceadas. En el caso de inversiones que involucran el centrómero (pericéntricas), los entrecruzamientos dentro de la región invertida llevan a un 75% de gametas con duplicaciones o deficiencias, mientras que si el centrómero no está involucrado (inversiones paracéntricas), las gametas desbalanceadas constituyen el 50% del total.

Sin embargo en algunas especies los individuos heterocigotas para inversiones no sufren una reducción en la fertilidad gracias a la existencia de mecanismos compensatorios, que sortean los problemas mecánicos durante la meiosis. Un ejemplo de ello lo constituye el género *Drosophila*, donde las cromátidas di y acéntricas son

dirigidas a los cuerpos polares durante la oogénesis mientras que en la espermatogénesis no se producen entrecruzamientos (Sturtevant y Beadle, 1936). Este mecanismo compensatorio permite que tal tipo de alteración cromosómica sea muy abundante en las poblaciones naturales y que, como consecuencia, exista una reducción en la recombinación efectiva entre cromosomas portadores de diferentes inversiones.

LAS INVERSIONES CROMOSÓMICAS EN EL GÉNERO DROSOPHILA

La existencia de inversiones paracéntricas en el género *Drosophila* fue descubierta por Sturtevant (1917), cuyos estudios posteriores junto a Plunkett (1926) pusieron de manifiesto la existencia de diferencias interespecíficas en las inversiones, a través del ahora clásico caso de la inversión en el cromosoma 3 que diferencia a *D. melanogaster* de *D. simulans*. A partir de entonces los trabajos de Dobzhansky y colaboradores (Sturtevant y Dobzhansky, 1936a y b; Dobzhansky y Sturtevant, 1938), fundamentalmente en las especies *D. pseudoobscura* y *D. persimilis*, sentaron las bases para todos los estudios posteriores sobre los polimorfismos de inversión en el género.

EL ORIGEN DE LAS INVERSIONES

El origen de cada inversión, de acuerdo a la llamada "visión tradicional" (Krimbas y Powell, 1992) postula la existencia de un evento único en el cual se produce la ruptura simultánea pero independiente de dos regiones del cromosoma, que se vuelven a unir con una orientación opuesta respecto de la secuencia original.

Este modelo de origen único trae aparejadas tres suposiciones:

- ❶ Una inversión es un evento raro.
- ❷ La probabilidad que dos de tales eventos involucren la misma porción del cromosoma es aún menor (lo cual equivale a decir que las rupturas ocurren al azar a lo largo de todo el cromosoma).
- ❸ Si aún estas dos cosas ocurrieran, la inversión debe establecerse en la población o la especie, lo cual también constituye un evento de baja probabilidad.

Esto significa que el origen polifilético de las inversiones exigiría una concatenación de eventos cuya probabilidad de ocurrencia es muy baja.

Sin embargo numerosos estudios han puesto en tela de juicio la monofilia de las inversiones. A partir de los trabajos de Goldschmidt (1939) ha existido abundante información y discusión sobre la presencia de regiones donde ocurren rupturas masivas (ver revisión en Krimbas y Powell, 1992), a la vez que el descubrimiento de regiones móviles (transposones) en el genoma de *Drosophila* (Green, 1980; Engels, 1983; Engels y Preston, 1984) dio una nueva perspectiva al origen de las inversiones.

Por otra parte, trabajos más recientes basados en estudios moleculares tanto mediante análisis de sitios de restricción (Aquadro et al., 1991; Babcock y Anderson, 1996) como de secuenciación de ADN (Wesley y Eanes, 1994; Hasson y Eanes, 1996) hallaron que las diferencias genéticas entre distintas inversiones fueron mucho mayores que entre cromosomas portadores de un mismo reordenamiento, dando apoyo a la hipótesis de un origen único.

Una vez que la inversión se ha generado pueden señalarse tres etapas en su historia evolutiva (Krimbas y Powell, 1992):

- Tras su origen como evento único se perderá o mantendrá en la población a través de procesos estocásticos.
- Si logra aumentar su frecuencia, su destino podrá depender no solamente del azar sino también de procesos selectivos.
- Se genera un polimorfismo estable mantenido por algún tipo de selección o la inversión continúa aumentando su frecuencia hasta fijarse por deriva o selección direccional.

¿QUÉ OCURRE MIENTRAS TANTO CON EL CONTENIDO GENÉTICO DE LA INVERSIÓN Y COMO ÉSTE PUEDE INFLUIR EN LA FIJACIÓN DE LA MISMA?

Si las inversiones tienen un origen único, los alelos de los genes dentro de cualquier copia de una inversión dada deben ser iguales, y dicha identidad daría por resultado una asociación no al azar (DG) de loci ubicados dentro del segmento invertido. Sin embargo debe destacarse que la identidad de las ordenaciones disminuye a lo largo del tiempo debido a entrecruzamientos dobles, conversión génica y mutación.

Las evidencias acumuladas durante veinte años (Prakash y Lewontin, 1968, 1971; Kojima et al., 1970; Nair y Brnic, 1971; Charlesworth y Charlesworth, 1973; Prakash y Levitan, 1973, 1974; Prakash, 1974; Loukas y Krimbas, 1975; Charlesworth et al., 1979; García y Prevosti, 1981; Prevosti et al., 1983; Fontdevila et al., 1983; Smit-McBride et al., 1988) han mostrado que para las inversiones de *Drosophila* puede esbozarse el siguiente patrón: los loci ubicados fuera de la inversión no exhiben DG con la misma, los loci localizados dentro tienen grados variables de DG según la posición (por ejemplo, los loci ubicados en el centro de la inversión sufren mayor recombinación porque existe una mayor probabilidad de apareamiento entre cromosomas homólogos) y los loci cercanos a los puntos de ruptura exhiben DG, como resultado del efecto inhibitorio de la inversión sobre la formación de quiasmas en esas regiones (Dobzhansky y Epling, 1948a y b; Carson, 1953; Grell, 1962).

Existen diferentes explicaciones para estos patrones de DG:

- Razones históricas: los alelos se asocian entre sí y con las inversiones cuando éstas se originan, es decir simplemente por azar.
- Deriva: procesos poblacionales tales como cuellos de botella permiten a la deriva construir el desequilibrio. Diversos trabajos (Ishii y Charlesworth, 1971; Nei y Li, 1975, 1980; Strobeck, 1983) han concluido que los patrones observados de DG junto con las tasas conocidas de recombinación son compatibles con explicaciones histórico-neutralistas. No obstante Krimbas y Loukas (1980) postularon, en un estudio de las inversiones de *D. subobscura*, que la selección mantiene las asociaciones por un tiempo mayor al esperado por azar, ya que las estimaciones de la antigüedad del polimorfismo bajo un modelo neutralista indicarían que éste es reciente.
- Selección: la selección puede favorecer ciertas combinaciones de alelos dentro y entre ordenaciones generando DG. Según Wasserman (1972) hay tres niveles en los cuales puede actuar la selección para generar y mantener un polimorfismo cromosómico:
 - Selección génica: el valor adaptativo de la inversión se explica simplemente por dominancia (que enmascara los efectos de los alelos perjudiciales recesivos) o sobredominancia (los heterocigotas tienen mayor valor adaptativo que los homocigotas) de los genes capturados por ella, sin necesidad de interacciones entre loci.

- Selección cariotípica: cada ordenación está adaptada a un ambiente particular. Los alelos contenidos en una inversión son diferentes a los de otra ordenación, y sus portadores tendrán un valor adaptativo elevado en ambientes diferentes. En este modelo el polimorfismo puede ser mantenido si la población ocupa un ambiente heterogéneo o si existe una selección dependiente de las frecuencias contra el homocariotipo mejor adaptado.
 - Selección supergénica: para explicar este modelo de selección es necesario introducir previamente dos conceptos: supergen y coadaptación. Un supergen es un grupo de genes tan fuertemente ligados que la recombinación entre ellos ocurre muy raramente (Darlington y Mather, 1949). El término coadaptación fue acuñado por Dobzhansky (1949), para referirse a la compatibilidad entre reordenamientos cromosómicos alternativos de una misma población, es decir que las inversiones adquieren valor adaptativo si surgen en cromosomas que contienen sistemas de modificadores (genes) que dan origen a heterocigotas altamente adaptados con otros sistemas de modificadores en la misma población. Otros autores como Lewontin (1974) lo han aplicado para definir las asociaciones entre alelos particulares en los loci dentro de una inversión cromosómica y la inversión misma.
- A diferencia de los dos tipos anteriores de selección, aquí existen interacciones epistáticas entre genes localizados en un mismo cromosoma, las cuales constituyen los puntos iniciales para generar coadaptación dentro de las inversiones. Cada reordenamiento representa no un tipo único, sino una familia de supergenes que difieren entre sí en las combinaciones alélicas que poseen. La recombinación entre los distintos supergenes de la misma familia en los homocariotipos destruye la coadaptación de los mismos, provocando la desaparición de las combinaciones alélicas que generan mayor valor adaptativo en sus portadores. Este fenómeno no se produciría en los heterocariotipos, que pasarían a sus descendientes los supergenes coadaptados, mientras que una selección dependiente de la frecuencia contra el homocariotipo más abundante permitiría la existencia de polimorfismo cromosómico.

EL POLIMORFISMO CROMOSÓMICO DE *DROSOPHILA BUZZATII*

Dentro de las especies de *Drosophila* que presentan polimorfismos cromosómicos se encuentra *D. buzzatii* (Grupo *repleta*, Subgrupo *mulleri*, complejo *buzzatii*; Ruiz y Wasserman, 1993). Es una especie cactófila, habitante de zonas áridas y semiáridas, que se alimenta y desarrolla en los tejidos necróticos de Cactáceas, principalmente del género *Opuntia* (Hasson et al., 1992). Es originaria de América del Sur y ha sido recientemente introducida en forma pasiva en el Viejo Mundo (Fontdevila et al., 1981) y en Australia (Barker, 1982).

Gracias a su nicho ecológico bien definido, constituye un excelente modelo de estudio, tanto para evaluar procesos evolutivos en poblaciones naturales (Barker y East, 1980; Ruiz et al., 1986; Hasson et al., 1991; Rodríguez et al., 1999) como para realizar estudios eco-genéticos (Fanara, 1995; Fanara et al., 1996; Fanara et al., 1998; Fernández Iriarte, 1999) y genético-poblacionales asociados a la colonización (Fontdevila et al., 1982; Fontdevila, 1989).

Su cariotipo consiste en seis pares de cromosomas: cuatro pares de autosomas acrocéntricos de igual longitud, un par de cromosomas puntiformes, un X acrocéntrico largo y un pequeño Y también acrocéntrico (Wasserman, 1962). Su polimorfismo cromosómico está bien caracterizado: los cromosomas 2 y 4 (secuencias estándar-st) presentan un total de ocho inversiones paracéntricas: $2j$, $2jz^3$, $2jq^7$, $2jc^9$, $2js^9$, $2r^9$, $2y^3$ y $4s$ (Fontdevila et al., 1982; Ruiz et al., 1985; Ruiz y Wasserman, 1993; Hasson et al., 1995). En las poblaciones argentinas, las ordenaciones más frecuentes son $2st$, $2j$ y $4st$. $2jz^3$ y $4s$ muestran una distribución más limitada (Hasson et al., 1995) mientras que $2jq^7$, $2jc^9$, $2js^9$, $2r^9$ y $2y^3$ son muy raras y se han encontrado en al menos una población.

Las poblaciones del Viejo Mundo presentan sólo seis ordenaciones: $2st$, $2j$, $2jz^3$, $2jq^7$, $4st$ y $4s$ (Fontdevila et al., 1981; Fontdevila, 1989) las cuales también están presentes en Australia, con excepción de $2jq^7$ y $4s$. Esta reducción en la cantidad de ordenaciones junto con incrementos en las frecuencias de inversiones raras en América del Sur (por ejemplo jq^7) ha sido interpretada como un patrón resultante de procesos estocásticos asociados a la colonización (efecto fundador) (Fontdevila, 1989). Sin embargo debe destacarse que diversos estudios han puesto de manifiesto la naturaleza adaptativa del polimorfismo de inversión del cromosoma 2.

Las poblaciones del Nuevo Mundo muestran un patrón de estructuración poblacional concordante con las regiones fitogeográficas (Hasson et al., 1995) y la existencia de correlaciones significativas de las inversiones con variables geográficas (latitud, longitud y altitud) similares a los patrones clinales detectados en Australia (Knibb y Barker, 1988) da sustento a la hipótesis de una diferenciación selectiva.

Por otra parte, análisis de componentes de selección, tanto en una población del área de origen de la especie (Hasson et al., 1991) como en una población colonizada del Viejo Mundo (Ruiz et al., 1986), evidencian la existencia de diferentes patrones de selección endocíclica, donde cada ordenación afecta pleiotrópicamente varios componentes del valor adaptativo (una ordenación confiere una ventaja adaptativa en un estadio del ciclo de vida, pero resulta desventajosa en otro).

También se estudiaron caracteres morfológicos y su relación con las inversiones y la adecuación darwiniana, teniendo en cuenta que la selección natural opera fundamentalmente a través del fenotipo. Estos trabajos han demostrado la existencia de correlaciones entre las inversiones del cromosoma 2 y varios rasgos relacionados con el tamaño corporal (Norry et al., 1995a), entre el tamaño del tórax y componentes del valor adaptativo del adulto como la longevidad (Santos et al., 1992, Hasson et al., 1993) y la fecundidad (Santos et al., 1992) y entre el ancho de la cara y la probabilidad de apareamiento de los machos (Norry et al., 1995b). Más aún, este tipo de estudios ha permitido demostrar que el efecto medio de las inversiones sobre el tamaño corporal y la correlación entre tamaño y longevidad, permiten explicar los cambios de frecuencias cromosómicas debidos a longevidad diferencial (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., 1999).

Una orientación alternativa para analizar las diferencias de valor adaptativo entre los portadores de diferentes ordenaciones cromosómicas es comparar el contenido genético de las diferentes ordenaciones. Dado que éstas, como se expuso anteriormente, capturan combinaciones particulares de alelos en diferentes loci que segregan como un bloque (supergen), una manera de cuantificar la diferenciación en el contenido genético de las inversiones es estudiar las asociaciones gaméticas entre inversiones y loci que mapeen dentro o cerca de los segmentos involucrados en el rearreglo.

Knibb et al. (1987) estudiaron el desequilibrio gamético entre las inversiones del cromosoma 2 y las enzimas Esterasa-1 (Est-1) y Esterasa-2 (Est-2) en poblaciones

colonizadas de Australia. Dichos autores encontraron que los desequilibrios totales entre ambas enzimas y los cromosomas fueron significativos y que, además, Est-1 exhibía patrones de desequilibrio consistentes en todas las poblaciones analizadas.

Otro estudio de desequilibrios enzima-inversiones se llevó a cabo en dos poblaciones del Viejo Mundo utilizando las enzimas Est-2 y Peptidasa-2 (Pep-2) (Betrán et al., 1995). Est-2 exhibió un desequilibrio casi completo en ambas poblaciones, pero con asociaciones alelo-inversión diferentes a las encontradas en las poblaciones australianas.

Sin embargo, una limitación de ambos trabajos es que fueron realizados en poblaciones colonizadas y, como los mismos autores sugieren, estudiar qué ocurre con los desequilibrios gaméticos en el área de origen puede contribuir a arrojar luz sobre las causas de los mismos.

En este contexto se ha abordado el estudio de los desequilibrios cromosoma-enzima en poblaciones naturales pertenecientes a diferentes regiones fitogeográficas de Argentina (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación), utilizando marcadores que mapean dentro de los segmentos comprometidos en las inversiones j y jz³ (Aldehído oxidasa (Aldox) y Est-1), dentro de las inversiones jz³ y jq⁷ (Est-2) y fuera de todas las ordenaciones (Pep-2, Leucil aminopeptidasa (Lap) y Xantín deshidrogenasa (Xdh)).

En este trabajo se presenta el análisis de una de dichas poblaciones.

OBJETIVOS

- Cuantificar el desequilibrio gamético entre las ordenaciones del cromosoma 2 y siete loci enzimáticos que mapean en el mismo en una población natural del área de origen de *Drosophila buzzatii*.
- Comparar los resultados obtenidos a partir de dos métodos diferentes para aislar cromosomas salvajes ya utilizados en trabajos anteriores, para comprobar si existe algún tipo de efecto debido al tratamiento empleado.



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El muestreo se llevó a cabo en la población natural denominada Otamendi (Hasson et al, 1995), localizada a unos 30 km al noroeste de la ciudad de Buenos Aires en el kilómetro 50 de la Ruta Nacional 9.

Esta localidad se encuentra en la Región Fitogeográfica de la Pampa Meridional (Cabrera, 1976) y sus coordenadas geográficas son 34.4° de latitud y 58.8° de longitud. El área estudiada es un cortaderal que corre paralelo a las vías del ferrocarril Mitre y está ocupada irregularmente por cactus de la especie *Opuntia vulgaris*.

La recolección de adultos se realizó durante el mes de octubre de 1996 por la tarde, utilizando trampas de banana fermentada con levaduras, que se distribuyeron alrededor de las plantas de *O. vulgaris* donde funcionaron como cebos. Luego, con ayuda de una red entomológica, se procedió a la captura de individuos adultos, los cuales fueron colocados en frascos y llevados al laboratorio.

CRUZAMIENTOS

En sus estudios para identificar la presencia de genes letales en los cromosomas de *Drosophila*, Muller (1950) y posteriormente Dobzhansky (1970) idearon una técnica de cruzamientos controlados para aislar cromosomas de individuos colectados en poblaciones naturales y ponerlos en homocigosis.

Para ello utilizaron cepas con dos marcadores dominantes visibles localizados en cromosomas homólogos y letales en homocigosis (cepas de letales balanceados). Debido a que la finalidad era obtener cromosomas “salvajes” (es decir provenientes de la población natural) utilizaron sólo a los machos, ya que en éstos el entrecruzamiento está inhibido y no se producen quiasmas durante la meiosis.

La técnica consiste en cruzar los machos (cuyo genotipo puede representarse como $+_1 / +_2$) con hembras vírgenes de la cepa (genotipo M_1/M_2). Los individuos de la siguiente generación resultan todos heterocigotas y portadores de un cromosoma salvaje y otro mutante ($M_1/+_1$, $M_1/+_2$, $M_2/+_1$, $M_2/+_2$). De esta F_1 se toma nuevamente un macho (seleccionando de esta manera un cromosoma salvaje) y se lo cruza con otra hembra de la misma cepa. Suponiendo que el macho elegido sea $M_1/+_1$, la F_2 estará compuesta por individuos M_1/M_1 (que mueren), M_1/M_2 , $M_1/+_1$ y $M_2/+_1$. Con este paso se logra amplificar el número de individuos portadores del cromosoma $+_1$.

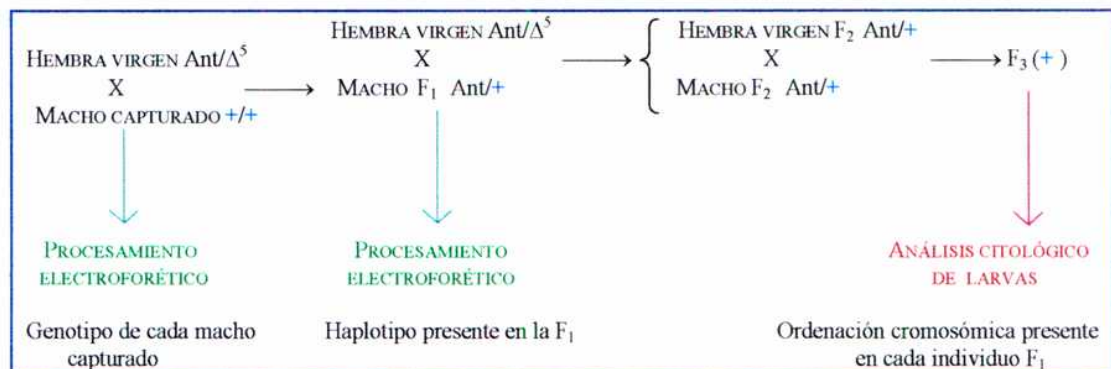
Finalmente se realiza un cruzamiento entre machos y hembras F_2 portadores de la mutación M_1 ($M_1/+_1$) y se obtiene una F_3 con los genotipos M_1/M_1 (que mueren), $M_1/+_1$ (mutantes visibles) y $+_1/+_1$ (fenotipo salvaje), lográndose de esta manera poner en homocigosis el cromosoma de interés.

Sobre la base de esta técnica se utilizaron dos esquemas de cruzamientos controlados para obtener haplotipos de los individuos colectados en la población natural.

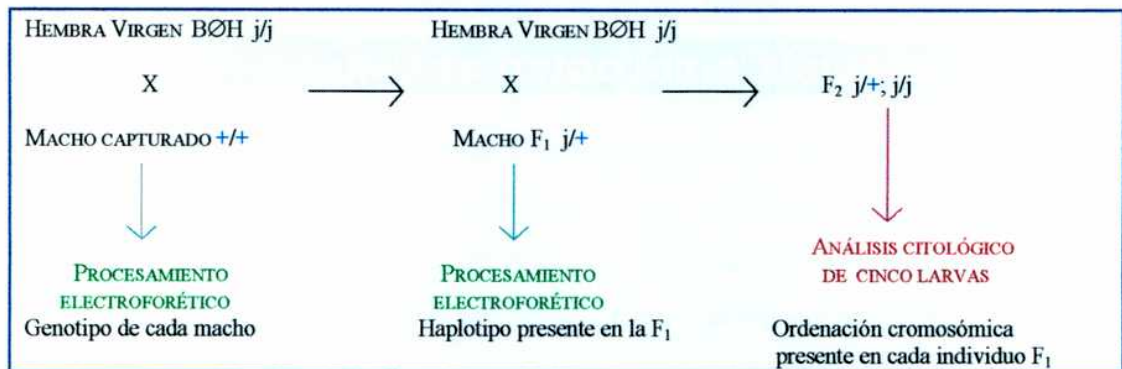
Tras la identificación y sexado de los adultos, se obtuvieron 199 machos de *Drosophila buzzatii* los cuales fueron distribuidos uniformemente en dos grupos, Otamendi A y Otamendi B.

Cada uno de estos grupos fue sometido a un tratamiento diferente para aislar cromosomas 2 y determinar su ordenación (2st, 2j, etc.) y los alelos correspondientes a siete loci isoenzimáticos que mapean dentro de dicho cromosoma. Es decir que a partir de los 199 individuos se obtuvieron los datos cromosómicos y enzimáticos de 199 gametas o haplotipos.

Los cien machos asignados a Otamendi A fueron cruzados con hembras de una cepa de letales equilibrados para el cromosoma 2, portadora de las mutaciones Antennapedia y Δ^5 (Barker, 1994), cedida por el Profesor Dr. J. S. Barker, de acuerdo al siguiente esquema de cruzamientos:



Los individuos restantes (Otamendi B) fueron cruzados individualmente con hembras de una cepa homocariotípica para el cromosoma 2 y para los 7 loci enzimáticos estudiados (cepa BØH, cedida por el Profesor Dr. A. Fontdevila), mediante el siguiente esquema:



Todos los cruzamientos se llevaron a cabo en tubos individuales conteniendo una fórmula modificada de un medio de cultivo preparado con levaduras muertas (David, 1962).

MEDIO DE CULTIVO

Ingredientes

- 120 gr de levadura
- 8 gr de agar
- 2 gr de sal
- 180 gr de harina de maíz (tipo paraguaya)
- 2.5 gr de nipagín sódico
- 1400 ml de agua destilada
- 10 ml de etanol
- 2 ml de ácido propiónico

Preparación

Se calienta hasta ebullición el agar con la sal en 600 ml de agua. Se le agrega la levadura previamente disuelta en 200 ml de agua y se cocina todo durante media hora revolviendo constantemente.

Se agrega la harina disuelta en 600 ml de agua y se cocina hasta que cambia la consistencia de la mezcla (aproximadamente 1-2 minutos).

Se retira del fuego, se deja enfriar brevemente y se le adiciona el nipagín sódico (fungicida) en 10 ml de etanol y 2 ml de ácido propiónico.

Se vuelca con ayuda de una cuchara y un embudo en tubos esterilizados, los cuales se tapan con algodón una vez que el medio está frío.

ANÁLISIS CITOLÓGICO DE LARVAS

Para determinar los haplotipos cromosómicos de los machos capturados se disecaron larvas de tercer estadio, de acuerdo a la técnica descrita por Fondevila et al. (1981). En ella las larvas se colocan en una caja de Petri con una mezcla 3:1 de etanol absoluto y ácido acético 60%. Con dos agujas enmangadas se seccionan y se extraen las glándulas salivales, dejándolas desprovistas de grasa.

En un porta-objetos se pone una gota de mezcla de orceína lacto-acética (60% de orceína acética y 40% de ácido láctico) sobre la que se depositan las glándulas dejándolas teñir durante 30 minutos. Luego se coloca el cubreobjetos y se realiza el aplastado con ayuda de un papel de filtro.

Para la muestra Otamendi A se analizó una sola larva, ya que todos los individuos F_3 contenían al menos una copia del cromosoma salvaje. En el caso de Otamendi B fue necesario analizar cinco larvas de la F_2 para que la probabilidad de no muestrear el cromosoma salvaje fuese menor al 5%. Esto se debe a que en la F_2 se espera que la mitad de los individuos sean j/j y el resto $j/+$; la probabilidad que de n larvas analizadas ninguna tenga el cromosoma proveniente de la población natural es entonces $(1/2)^n$. Si n es igual a cinco el valor de esta probabilidad es de 0.031.

PROCESAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE ADULTOS Y F

En ambas muestras, una vez que hubiesen dejado descendencia, los machos colectados en el campo y sus correspondientes F_1 se colocaron en tubos de plástico rotulados y se congelaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento electroforético.

En la figura 1 se muestra la localización de los siete loci enzimáticos analizados que mapean en el cromosoma 2 (Schafer et al., 1993; Betrán et al., 1995, Ranz et al., 1997): Esterasa-1 (Est-1), Aldehído oxidasa (Aldox), Esterasa-2 (Est-2), Leucil-aminopeptidasa (Lap), Peptidasa-1 (Pep-1), Peptidasa-2 (Pep-2) y Xantin-deshidrogenasa (Xdh). Se sabe que tanto Est-1 como Aldox se encuentran dentro del segmento involucrado en la inversión j , mientras que Est-2 es cercana al sitio de rotura proximal de la misma inversión y está involucrada en la porción que cambia de

orientación en las inversiones jz^3 y jq^7 . Pep-2, Lap y Xdh están por fuera de las regiones comprometidas en los reordenamientos y de Pep-1 sólo se sabe que mapea en el cromosoma 2.

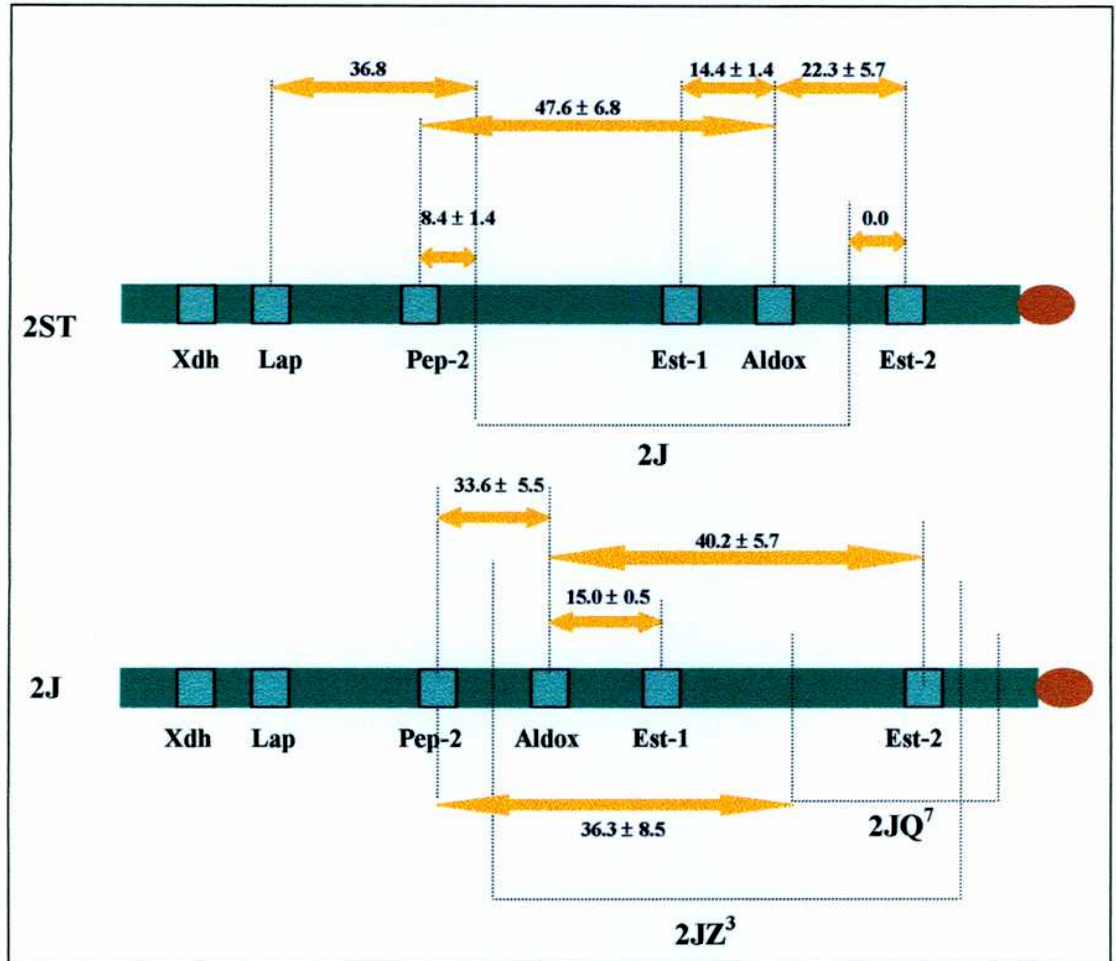


Figura 1. Mapa genético de los loci enzimáticos analizados en el cromosoma 2 de *Drosophila buzzatii*. La localización de Xdh es citológica (Ranz et al., 1987) y por eso faltan las distancias de recombinación con otros marcadores (modificado a partir de Betrán et al., 1986; Schafer et al., 1993 y Rodríguez, 1998).

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales utilizando geles de almidón SIGMA como soporte, de acuerdo a las técnicas descritas por Barker y Muller (1976), Barker et al. (1976), Sánchez (1986) y Rodríguez (1998).

Se montaron dos sistemas de corrida: ZOUROS para Est-1, Est-2, Lap y Aldox y TBE para Pep-1, Pep-2 y Xdh.

PREPARACIÓN DE GELES Y CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS

Los geles se preparan los días previos a las corridas, agitando constantemente el almidón con la solución correspondiente en un erlenmeyer hasta ebullición. Una vez alcanzado este punto se aplica vacío mediante una bomba para quitar las burbujas e inmediatamente se vuelcan en bandejas de acrílico de 450 x 170 x 15 mm.

Una vez que los mismos se solidifican, se practican las ranuras para la siembra de los homogenatos. Debido al ancho de los geles se pueden analizar por corrida 36 individuos, que se alternan con moscas de la cepa BØH. Ésta se utiliza como control debido a que se conoce su contenido alélico para los sistemas enzimáticos estudiados, por haber sido utilizada en trabajos de electroforesis previos de poblaciones colonizadas, permitiendo la comparación de resultados.

El día de la corrida los individuos congelados y los controles se colocan en una grilla con dos gotas de tampón de extracción (Tris-clorhídrico 0,1M pH 7) en cada una de las celdas. Las moscas se homogeneizan con ayuda de una varilla adosada a un rotor y luego se colocan dos papeles Whatmann 6MM de 6 x 3 mm en cada celda, uno para cada gel. Los papeles se siembran en las ranuras practicadas a los geles y se agrega una gota de azul de bromofenol en algunos carriles como control del frente de corrida.

Los geles se montan en las cubetas, donde previamente se vuelcan las soluciones en los electrodos y hielo picado en el centro para mantener el sistema más refrigerado.

Se coloca una toalla de fibra (tipo Mortimer) entre cada electrodo y un extremo del gel para que actúe como puente en el flujo de la corriente y los iones y todo se cubre con una película autoadherente de RESINITE RMF-61 y un vidrio para evitar que las toallas se muevan.

Se ponen las cubetas en la heladera y se conectan los electrodos a una fuente Sigma PS 250-2. La relación voltaje-miliamperaje debe ser de aproximadamente 80-100volts a 70-80 miliamperès, cuidando que el último nunca supere los 100 miliamperès.

La corrida se interrumpe cuando el frente llega a la toalla opuesta a la línea de siembra. Los geles se retiran y cortan con ayuda de una tansa montada en un soporte de madera, de acuerdo al grosor y al número deseado de cortes.

Finalmente se colocan los cortes en bandejas en las cuales se agrega la correspondiente solución de tinción y se llevan a estufa a 37° hasta la aparición de bandas. Una vez que esto ocurre se fijan los geles y se los conserva en la heladera hasta el momento de su lectura e interpretación.

La determinación de los alelos enzimáticos se realiza sobre el gel ya fijado y con ayuda de un transiluminador, utilizando los individuos controles como referencia para asignar los alelos enzimáticos correspondientes.

GELES Y TAMPONES DE CORRIDA

ZOUROS

En este sistema se revelaron las enzimas Esterasa-1 (Est-1), Esterasa-2 (Est-2), Leucil amino peptidasa (Lap) y Aldehído oxidasa (Aldox).

Solución A (Tris-cítrico) pH 8.6

2.944 g de ac. cítrico monohidrato (0.007 M)

12.114 g de tris (0.050 M)

2.000 l de agua destilada

Solución B (Borato-litio) pH 8.5

94.000 g de ácido bórico (0.760 M)

17.204 g de LiOH monohidrato (0.205 M)

2.000 l de agua destilada

Gel

31.5 g de almidón hidrolizado (9%) en 315 ml de ZOUROS A + 35 ml de ZOUROS B.

Electrodos

200 ml de ZOUROS B + 600 ml de agua destilada por cubeta.

TBE

En este sistema se revelaron las enzimas Pep-1, Pep-2 y Xdh.

Solución TBE (Tris-bórico-EDTA) pH 8.6

43.60 g de tris (0.180 M)

12.36 g de ácido cítrico (0.100 M)

2.98 g de EDTA-Na (0.004 M)

2.00 l de agua destilada

Gel

27 g de almidón hidrolizado (9%) en 60 ml de TBE + 240 ml de agua destilada.

Electrodo

750 ml de TBE por cubeta.

SOLUCIONES DE TINCIÓN

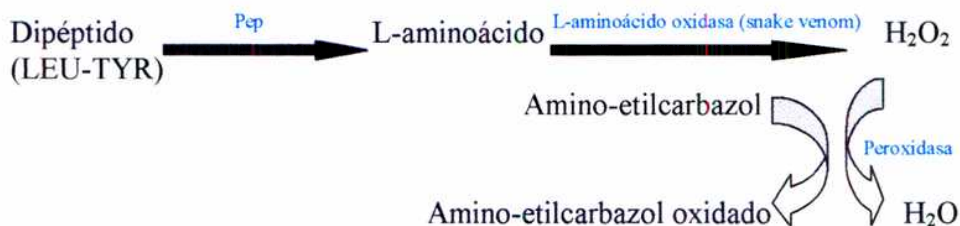
PEP-1 Y PEP-2



Función enzimática

Dipéptido $\xrightarrow{\text{Pep}}$ L-aminoácido + péptido

Reacción de tinción



Tinción

Tampón fosfato pH 7.6

1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

100 ml de agua destilada

Solución 1

Disolver en 15 ml de tampón fosfato

12 mg de L-leucil-L-tirosina

6 mg de Snake Venom

12 mg de Peroxidasa

Solución 2

Disolver en 1.7 ml de N-N-dimetilformamida

15 mg de 3-amino-N-etil-carbazol

Sobregel de agar

Disolver en 15 ml del tampón fosfato

120 mg de agar

Procedimiento

Se practica un nuevo corte longitudinal de unos 2 mm. de espesor al corte destinado a las peptidasas.

Se realiza una ventana en la capa superior, cuidando dejar al menos 1 cm en cada lado del gel.

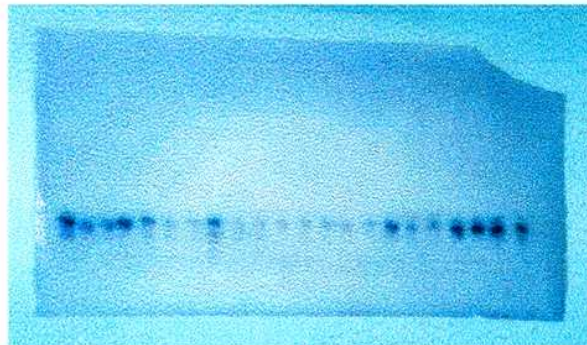
Se calienta el agar hasta ebullición y se enfría a 45°.

Se le agregan agitando las soluciones 1 y 2.

En el sitio donde estaba la ventana se vuelca el agar con las soluciones 1 y 2.

Se incuba a 37° hasta la aparición de bandas, fijando inmediatamente por la difusión.

XDH



Función enzimática



Reacción de tinción



Tinción

Tampón DH: Tris-HCl (0.05 M) pH 7.5

6.055 g de tris

1.000 l de agua destilada

HCl hasta ajustar pH

Procedimiento

Disolver 100 mg de hipoxantina en 100 ml de tampón DH.

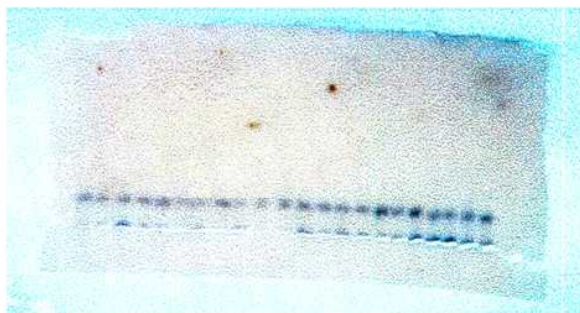
Calentar a ebullición y dejar enfriar.

Agregar 20 mg de MTT, 25 mg de β -NAD y 15 mg de KCL.

Justo antes de colocar sobre las bandejas de tinción agregar una punta de espátula de PMS.

Incubar a 37° hasta la aparición de bandas.

LAP



Función enzimática

Péptido aminoacil $\xrightarrow{\text{Lap}}$ aminoácido + péptido

Reacción de tinción

L-leucil-Naftilamida $\xrightarrow{\text{Lap}}$ Compuesto diazo coloreado
Naftol $\xrightarrow{\text{Lap}}$ Fast Black-K

Solución Lap A pH 3.5

19.6 g de anhídrido maleico

8.0 g de NaOH

1.0 l de agua destilada

Solución Lap B pH 13.5

12.8 g de NaOH

1.0 l de agua destilada

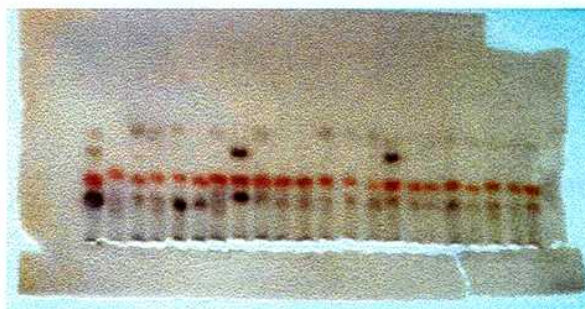
Procedimiento

Previamente a la tinción sumergir los geles en ácido bórico 0.5 M durante 15 minutos.

Retirar el bórico y agregar una solución de 50 ml de Lap A, 10 ml de Lap B y 40 ml de agua destilada con 70 mg de L-leucil-naftilamida (disuelta en 1 ml de metanol) y 30 mg de Fast Black (que se agregan al final de todo y en ausencia de luz).

Incubar a 37° hasta aparición de bandas.

EST-1 Y EST-2



Función enzimática



Reacción de tinción



Tinción

Tampón fosfato (0.1 M) pH 6.5

27.217 g de KH_2PO_4 (0.2 M)

14.194 g de Na_2HPO_4 (0.1 M)

2.000 l de agua destilada

Solución ANA

Disolver 20 mg de α - y 20 mg de β -naftilacetato en 0,5 ml de acetona, añadir 0,5 ml de agua destilada y agitar.

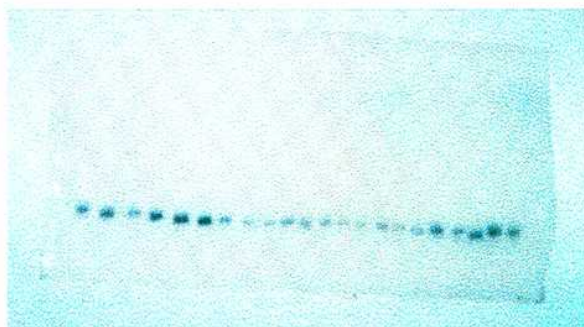
Procedimiento

Colocar los geles en ácido bórico 0.5 M durante 15 minutos.

Lavar y agregar 100 ml de tampón fosfato con 1.5 ml de solución ANA y 60 mg de Fast Garnet GBC disueltos en 10 ml de n-propanol.

Incubar a 37° hasta aparición de bandas.

ALDOX



Función enzimática



Reacción de tinción



Tinción

Tampón DH: Tris – HCl pH: 8,6

20.186 g de tris

3.000 l de agua destilada

HCl hasta ajustar pH

Procedimiento

En 100 ml de tampón de tinción DH se colocan 2,5 ml de benzaldehído, 15 mg de β -NAD, 30 mg de MTT y 5 mg de PMS (al final y en ausencia de luz).

Incubar a 37°C hasta aparición de bandas (aprox. 2 hs). Si se incuba con otros geles, tapar las bandejas ya que los vapores de benzaldehído pueden actuar como sustrato en donde estén revelando deshidrogenasas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Una vez que se obtuvo la caracterización cromosómica y enzimática de una gameta de cada individuo (haplotipo), se realizaron pruebas de homogeneidad para determinar si las distribuciones alélicas eran significativamente diferentes entre las muestras Otamendi A y Otamendi B utilizando el programa Genepop, versión 3 (Raymond y Rousset, 1995).

La hipótesis nula testeada fue H_0 “las distribuciones alélicas de ambas muestras son idénticas”. Para cada locus se realizó un test exacto de Fisher mediante una tabla de contingencia de este tipo:

Subpoblación	Alelo 1	Alelo 2	Total
A	54	46	100
B	85	15	100
Total	139	61	200

y se obtuvo un estimador insesgado del valor de P (Raymond y Rousset, 1995).

Simultáneamente se realizó una prueba de χ^2 de homogeneidad entre muestras (Sokal, 1981).

Para aquellos loci en los cuales las diferencias fueron no significativas ($P > 0.05$) ambas muestras se agruparon para estimar las frecuencias alélicas y los desequilibrios de ligamiento cromosoma-enzima.

La significación estadística del desequilibrio cromosoma-enzima global se realizó a partir de una prueba de χ^2_T (Weir y Cockerham, 1978) mediante tablas de contingencia del tipo:

Cromosoma	Locus enzimático	a	b	c	Total
2st		5	15	20	40
2j		11	70	19	100
2jz ³		4	15	41	60
Total		20	100	80	200

Aceptando únicamente frecuencias esperadas mayores o iguales a 1 (Weir y Cockerham, 1978; Knibb et al., 1987).

La hipótesis nula puesta a prueba fue: H_0 “las frecuencias gaméticas observadas son iguales al producto de las frecuencias alélicas” (independencia de las frecuencias alélicas de cromosoma y enzima).

El desequilibrio gamético entre pares de alelos se cuantificó a partir de estimaciones del parámetro D (Lewontin y Kojima, 1960) que mide el desvío de las frecuencias esperadas por azar entre alelos de dos loci diferentes:

$$D_{ij} = p_{ij} - p_i p_j$$

donde p_{ij} es la frecuencia observada de gametas que contienen el alelo i del locus A y el alelo j del locus B ,
 p_i es la frecuencia del alelo i del locus A y
 p_j es la frecuencia del alelo j del locus B .

La significación de D ($H_0: D_{ij} = 0$, no existe desequilibrio gamético entre los alelos i y j), se realizó mediante el estadístico:

$$X_{ij}^2 = 2 n D_{ij}^2 / p_i (1 - p_i) p_j (1 - p_j)$$

donde n es el número de gametas analizadas y que sigue una distribución χ^2 con un grado de libertad (Weir, 1996).

También se calculó el coeficiente D' que es el valor de D estandarizado con respecto al máximo valor que éste puede alcanzar de acuerdo con las frecuencias alélicas correspondientes a los dos loci cuyo desequilibrio se está considerando (Lewontin, 1964):

$$D'_{ij} = \frac{D_{ij}}{D_{ij\max}}$$

donde $D_{ij\max}$ toma uno de los siguientes valores:

$\min(p_i p_j, (1-p_i)(1-p_j))$ si $D_{ij} < 0$

$\min((1-p_i)p_j, p_i(1-p_j))$ si $D_{ij} > 0$

D, su probabilidad asociada y D' se calcularon utilizando el programa estadístico Arlequín, versión 1.1 (Schneider et al., 1998).

Finalmente, para aquellos loci que exhibieron desequilibrios significativos con las inversiones se calcularon los desequilibrios enzima-enzima. Para ello es importante destacar que al estudiar el desequilibrio gamético total entre dos loci asociados a un sistema de inversiones, éste puede descomponerse en dos factores: a) el desequilibrio “dentro” de las inversiones y, b) el desequilibrio “entre” inversiones (Ruiz et al., 1991; Betrán et al., 1995). El primero corresponde al desequilibrio de los loci dentro de cada ordenación y el segundo al desequilibrio de cada locus con las inversiones (desequilibrio por covarianza).

El caso más simple de este tipo de desequilibrios es el que corresponde a dos ordenaciones cromosómicas y dos loci dialélicos, para el cual puede demostrarse que el desequilibrio total puede descomponerse de la siguiente manera (Ruiz et al., 1991):

$$D_{uv} = pD_{uv}(C_1) + qD_{uv}(C_2) + D_u(C_1)D_v(C_1)/p + D_u(C_2)D_v(C_2)/q$$

donde p y q son las frecuencias de las ordenaciones cromosómicas C_1 y C_2 respectivamente, $D_{uv}(C_i)$ es el desequilibrio entre los alelos u y v de los loci A y B dentro de la ordenación C_i y $D_u(C_i)$ y $D_v(C_i)$ son los coeficientes de desequilibrio de los alelos u (del loci A) y v (del loci B) con la ordenación C_i .

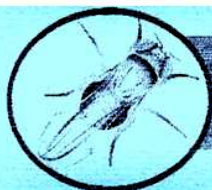
Para el caso particular de Otamendi, una población donde coexisten tres ordenaciones cromosómicas ($2jq^7$ se excluye porque debido a su muy baja frecuencia se aisló un solo cromosoma y los desequilibrios no pudieron ser calculados), se verifica que el desequilibrio total o global entre los alelos u y v de los loci A y B es:

$$D_{uv} = pD_{uv}(2st) + qD_{uv}(2j) + rD_{uv}(2jz^3) + D_u(2st)D_v(2st)/p + D_u(2j)D_v(2j)/q + D_u(2jz^3)D_v(2jz^3)/r$$

donde p, q y r son las frecuencias de las ordenaciones 2st, 2j y $2jz^3$ respectivamente. $D_{uv}(2st)$ es el coeficiente de desequilibrio entre los alelos u y v de los loci A y B (por ejemplo Est-1^a y Est-2^b) dentro de la ordenación 2st; $D_u(2st)$ es el coeficiente del desequilibrio del alelo u del locus A (Est-1^a) con la ordenación 2st y D_v es el

coeficiente de desequilibrio entre el alelo v del locus B (Est-2^b) y la ordenación 2st, es decir corresponden a los desequilibrios cromosoma-enzima de los dos loci que se están analizando. Los mismos criterios se aplican a las ordenaciones 2j y 2jz³.

Se calcularon entonces los desequilibrios enzima-enzima totales y enzima-enzima dentro de cada ordenación (desequilibrio “dentro”), ya que el tercer componente (desequilibrio “entre”) fue considerado previamente al analizar los desequilibrios enzima-cromosoma.



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

COMPARACIONES ENTRE LAS MUESTRAS OTAMENDI A Y B

Tras el procesamiento de los individuos se obtuvieron los datos correspondientes a 186 gametas. Con esta información se calcularon las frecuencias cromosómicas y alélicas para las muestras Otamendi A y B, las cuales se presentan en las tablas 1, 2 y 3.

La homogeneidad de estas frecuencias fue evaluada mediante dos análisis, un test exacto de Fisher y una prueba de χ^2 . Las tablas de contingencia para ésta última se construyeron admitiendo solamente frecuencias esperadas mayores o iguales a uno, con el fin de evitar posibles sobreestimaciones del estadístico X^2 (Sokal y Rohlf, 1981). Se hizo entonces necesaria la agrupación de algunas clases y, siempre que fue posible, se aplicó algún criterio que justifique la asociación de los datos. Así, para los cromosomas se agruparon las clases jz^3 y jq^7 por ser ambas ordenaciones derivadas. También se reunieron en una clase única los alelos Est-2^a y Est-2^{c*} debido a que en los análisis electroforéticos de ésta y otras poblaciones de Argentina (en los cuales se corrieron simultáneamente progenitor y F₁), se observó que Est-2^{c*} siempre proviene de un progenitor portador de un alelo que se interpreta como Est-2^a. Un aspecto llamativo de Est-2^{c*} (que había sido presentado previamente en estudios de poblaciones australianas como Est-2^{c+} (Knibb et al., 1987; Knibb y Barker, 1988)) es que genera en heterocigosis un patrón de tres bandas, pese a que se trata de una enzima monomérica. Finalmente fueron agrupadas las clases Aldox^b con Aldox^c y Pep-2^a con Pep-2^{a+} respectivamente, utilizando como criterio la mayor cercanía de estas bandas en el patrón de migración electroforético.

Los alelos nulos fueron excluidos del análisis debido a la imposibilidad de fijar un criterio no arbitrario para agruparlos y a su muy baja frecuencia (menos del 1%)

Tabla 1. Frecuencias cromosómicas para las muestras Otamendi A y B. N es el número de gametas analizadas.

Ordenación	2st	2j	2jz ³	2jq ⁷	N
Otamendi A	0.175	0.575	0.238	0.012	80
Otamendi B	0.135	0.730	0.135	0.000	89
Total					169

Los resultados obtenidos, tanto mediante el test exacto de Fisher como a través de la prueba de χ^2 de homogeneidad, se resumen en la tabla 4. En ella puede verse que las diferencias entre Otamendi A y B no fueron significativas para ninguno de los loci analizados, con excepción de Xdh.

Tabla 4. Valores obtenidos para cada sistema estudiado en el test exacto de Fisher y en tablas de contingencia (χ^2) para poner a prueba la hipótesis de homogeneidad de las muestras Otamendi.

Sistema	Fisher		χ^2		
	probabilidad	desvío estándar	X^2	g. l.	P
Cromosoma	0.140	0.009	4.940	2	0.085
Est-1	0.860	0.004	0.861	2	0.650
Est-2	0.464	0.015	3.064	3	0.382
Lap	0.805	0.004	0.631	2	0.729
Aldox	0.313	0.010	2.010	2	0.366
Pep-1	0.305	0.011	1.930	2	0.381
Pep-2	0.969	0.003	0.129	2	0.938
Xdh	0.005	0.001	11.562	2	0.003

Debido a que éste fue el único caso en el que se detectaron diferencias entre los dos tipos de tratamientos para aislar cromosomas, se decidió realizar un nuevo χ^2 aplicando un criterio de frecuencias esperadas más riguroso. El motivo de esta nueva prueba fue cerciorarse que la diferenciación entre muestras no fuese producto exclusivamente de variaciones en alguna clase con frecuencias esperadas bajas (alelos raros o poco frecuentes), ya que éstas al hallarse en el denominador del estadístico utilizado ($X^2 = (f_{\text{observadas}} - f_{\text{esperadas}})^2 / f_{\text{esperadas}}$) pueden conducir a una sobreestimación del mismo.

Admitiendo entonces valores esperados mayores o iguales a cinco, se agruparon los alelos Xdh^a y Xdh^b en una clase única y esta vez se obtuvo un resultado no significativo ($X^2 = 2.980$; g.l.=1; P=0.084). Estos resultados evidencian que la falta de homogeneidad en los datos de Xdh sería causada principalmente por una representación diferencial del alelo a en ambas muestras (tabla 3), la cual podría ser

atribuida al azar, dada la baja frecuencia del mismo (se detectaron 6 casos en un total de 162 cromosomas analizados) y la ausencia de efectos similares en los otros loci.

Se procedió entonces a agrupar todos los datos en una muestra única y con ella se realizaron las siguientes estimaciones.

FRECUENCIAS CROMOSÓMICAS Y ENZIMÁTICAS

Con la información proveniente de todos los haplotipos obtenidos a partir de la población natural se estimaron las frecuencias cromosómicas totales (tabla 5) y las frecuencias alélicas totales y condicionales (dentro de cada ordenación cromosómica) para cada locus enzimático (Tabla 6).

Tabla 5. Frecuencias cromosómicas población de totales para la Otamendi. N es el número de gametas analizadas.

Ordenación	frecuencia
2st	0.154
2j	0.657
2jz ³	0.183
2jq ⁷	0.006
N	169

Tabla 6. Frecuencias alélicas totales y condicionales para los loci enzimáticos estudiados en la población de Otamendi. N es el número de gametas examinadas.

Locus	Global	2st	2j	2jz ³	2jq ⁷
Est-1					
a	0.121	0.280	0.098	0.034	-
b	0.799	0.680	0.814	0.897	1.000
c	0.080	0.040	0.098	0.069	-
N	174	25	102	29	1
Est-2					
a	0.154	0.320	0.067	0.241	-
b	0.412	0.360	0.462	0.242	1.000
c	0.292	0.040	0.365	0.310	-
c*	0.011	0.080	-	-	-
d	0.131	0.200	0.106	0.207	-
N	175	25	104	29	1

Tabla 6 (continuación). Frecuencias alélicas totales y condicionales para los loci enzimáticos estudiados en la población de Otamendi. N es el número de gametas examinadas.

Locus	Global	2st	2j	2jz ³	2jq ⁷
Lap					
a	0.047	0.040	0.040	0.067	-
b	0.901	0.920	0.901	0.867	1.000
c	0.052	0.040	0.059	0.066	-
N	171	25	101	30	1
Aldox					
a ⁺	0.093	0.048	0.074	0.143	-
a	0.808	0.809	0.820	0.821	1.000
b	0.087	0.143	0.084	0.036	-
c	0.006	-	0.011	-	-
nulo	0.006	-	0.011	-	-
N	161	25	95	28	1
Pep-1					
a	0.105	0.136	0.096	0.138	-
b	0.802	0.818	0.798	0.724	1.000
c	0.087	0.046	0.096	0.138	-
nulo	0.006	-	0.010	-	-
N	172	22	104	29	1
Pep-2					
a ⁺	0.005	-	0.009	-	-
a	0.446	0.400	0.445	0.419	1.000
b	0.495	0.600	0.482	0.516	-
c	0.049	-	0.055	0.065	-
n	0.005	-	0.009	-	-
N	184	25	110	31	1
Xdh					
a	0.037	-	0.021	0.091	-
b	0.833	0.905	0.853	0.682	1.000
c	0.130	0.095	0.126	0.227	-
N	162	21	95	22	1

A partir de esta información (tabla 5) puede observarse que en la población de Otamendi están presentes cuatro ordenaciones del cromosoma 2: 2j, que es la más frecuente (66%), seguida por 2jz³ (18%), 2st (15%) y 2jq⁷ (menos del 1%).

Con respecto a los loci enzimáticos estudiados (tabla 6) todos resultaron ser polimórficos, siendo el número promedio de alelos por loci de 3.6. La presencia de alelos nulos fue detectada únicamente en los sistemas Aldox, Pep-1 y Pep-2, aunque en muy baja frecuencia (menor al 1%).

Cuando se analizaron las frecuencias condicionales resultó llamativo que, para algunos alelos, las frecuencias de éstos dentro de las ordenaciones difirieran de las que resultan al considerar la población total (tabla 6). Un ejemplo de ello lo constituye Est-1^a, cuya frecuencia es mayor dentro de 2st y, por el contrario, menor dentro de 2j y 2jz³ respecto de su frecuencia global. Otro caso es el de Est-2^c donde ocurre el fenómeno opuesto: su frecuencia dentro de 2st y 2j es, respectivamente, menor y mayor a la que se espera de acuerdo al global. Estos datos pueden ser tomados como indicios de la presencia de asociaciones entre algunos alelos y determinadas ordenaciones cromosómicas. Con el objeto de analizar si dichas asociaciones eran el resultado de desequilibrios gaméticos entre los cromosomas y las enzimas, se realizaron las pruebas estadísticas que se presentan a continuación.

DESEQUILIBRIOS GAMÉTICOS CROMOSOMA-ENZIMA

La estimación del grado de desequilibrio entre las ordenaciones del cromosoma 2 y cada locus enzimático se llevó a cabo primero globalmente y después entre cada par posible ordenación-locus enzimático.

Para el primer análisis se utilizaron pruebas de χ^2 a partir de tablas de contingencia (X^2_T) (Weir, 1996). Las clases se agruparon siguiendo los mismos criterios que para las tablas de homogeneidad, de manera tal que las frecuencias esperadas fuesen mayores a uno. En el caso que las diferencias fuesen significativas, se realizaron nuevos agrupamientos admitiendo valores esperados mayores a cinco, para evitar la sobreestimación de los estadísticos por efecto de los alelos poco frecuentes o raros.

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 7 a 13 y ponen de manifiesto que solamente Est-2 exhibe un desequilibrio gamético global altamente significativo ($p=0.0001$, tabla 8).

Tabla 7. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Est-1.

Est-1/Cromosoma	2st	2j	2jz ³ + 2jq ⁷	Total
a	7	10	1	18
b	17	83	27	127
c	1	9	2	12
Total	25	102	30	157

$$X^2 = 9.420 \quad \text{g.l.} = 4 \quad p = 0.051$$

Tabla 8. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Est-2.

Est-2/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a+c*	10	7	7	24
b	9	48	8	65
c	1	38	9	48
d	5	11	6	22
Total	25	104	30	159

$$X^2 = 28.153 \quad \text{g.l.} = 6 \quad p = 0.0001$$

$$X^2 = 20.494 \quad \text{g.l.} = 4 \quad (\text{agrupando c + d}) \quad p = 0.0004$$

Tabla 9. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Lap.

Lap/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a	1	4	2	7
b	23	91	27	141
c	1	6	2	9
Total	25	101	31	157

$$X^2 = 0.551 \quad \text{g.l.} = 4 \quad p = 0.968$$

Tabla 10. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Aldox.

Aldox/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a ⁺	1	7	4	12
a	17	78	24	119
b+c	3	9	1	13
Total	21	94	29	144

$$X^2 = 3.129 \quad \text{g.l.} = 4 \quad p = 0.537$$

Tabla 11. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Pep-1.

Pep-1/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a	3	10	4	17
b	18	83	22	123
c	1	10	4	15
Total	22	103	30	155

$$X^2 = 1.631 \quad \text{g.l.} = 4 \quad p = 0.803$$

Tabla 12. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Pep-2.

Pep-2/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a + a⁺	10	50	14	74
b	15	53	16	84
c	0	6	2	8
Total	25	109	32	166

$$X^2 = 2.134 \quad \text{g.l.} = 4 \quad p = 0.711$$

Tabla 13. Frecuencias absolutas y valor de X^2 para estimar el desequilibrio global entre los cromosomas y el locus Xdh.

Xdh/Cromosoma	2st	2j	$2jz^3 + 2jq^7$	Total
a + b	19	83	18	120
c	2	12	5	19
Total	21	95	23	139

$$X^2 = 1.662 \quad \text{g.l.} = 2 \quad p = 0.436$$

Posteriormente se realizó un análisis de los desequilibrios más detallado, comparando todos los pares posibles ordenación-alelo enzimático, para lo cual se calcularon los estadísticos D y D' junto con su probabilidad asociada.

De los siete loci analizados, solamente tres mostraron desequilibrios significativos entre alelos y ordenaciones cromosómicas (tabla 14). Uno de ellos es Est-2, cuyo desequilibrio con las ordenaciones ya era detectable en el análisis global, y que se ubica cerca del sitio de rotura proximal de la inversión j. Los otros dos loci son Est-1, localizado dentro todas las inversiones, y Xdh, un locus que curiosamente no presenta una asociación física con las inversiones, ya que mapea por fuera de todos los segmentos comprometidos en ellas.

Tabla 14. Pares de alelos y ordenaciones cromosómicas con valores de D significativos.

Locus	Ordenación	Alelo	Gametas	D	D'	P
Est-1	2st	a	7	0.0263	0.2731	0.0047
		Total	157			
Est-2	2st	a	8	0.0286	0.2449	0.0042
		c	1	-0.0412	-0.8675	0.0019
	2j	a	7	-0.0465	-0.5135	0.0004
		c	38	0.0415	0.3977	0.0165
	2jz ³	b	7	-0.0305	-0.4095	0.0425
		Total	159			
Xdh	2jz ³	b	15	-0.0242	-0.1830	0.0356
		Total	139			

Estos loci presentan combinaciones alelo-ordenación que están presentes en la población tanto en frecuencias mayores (desequilibrios “por asociación”, $D > 0$) como menores (desequilibrios “por repulsión”, $D < 0$) a las esperadas por azar. Dentro de las primeras se encuentran las combinaciones Est-1^a/2st, Est-2^a/2st y Est-2^c/2j, mientras que en las segundas se hallan Est-2^c/2st, Est-2^a/2j, Est-2^b/2jz³ y Xdh^b/2jz³.

DESEQUILIBRIOS GAMÉTICOS ENZIMA-ENZIMA

El hecho de encontrar que tres de los loci analizados están asociados con el sistema de inversiones, llevó a la formulación de preguntas respecto de los desequilibrios gaméticos de estos loci entre sí. La primera de ellas fue si existía un desequilibrio total significativo entre dichos loci. La segunda si, dado que podría existir un componente de desequilibrio “entre” alelos enzimáticos, también estaría presente un segundo componente del desequilibrio total, llamado desequilibrio “dentro” de cada ordenación. La tercera pregunta planteada fue referente a si estos desequilibrios “dentro” eran iguales o diferentes para cada ordenación cromosómica.

Para intentar responder estos puntos se realizó un análisis de desequilibrio gamético enzima-enzima entre los loci Est-1, Est-2 y Xdh.

Dado que las ordenaciones 2st y 2jz³ poseen frecuencias en la población que determinan un tamaño muestral bajo para las mismas, no se utilizaron pruebas de χ^2

globales sino que se calcularon directamente los valores de D y D' (tablas 15, 16 y 17).

Tabla 15. Desequilibrios globales y dentro de cada inversión entre los loci Est-1 y Est-2.

Ordenación	Gametas	N	D	D'	P
Global haploide	-	-	-	-	-
	Total	173			
Global diploide	Est-1 ^a /Est-2 ^a	11	0.0142	0.1596	0.0270
	Total	334			
2st	Est-1 ^a /Est-2 ^a	5	0.1104	0.5798	0.0084
	Est-1 ^a /Est-2 ^b	0	-0.1008	-1.0000	0.0194
	Est-1 ^b /Est-2 ^a	2	-0.1376	-0.6324	0.0016
	Est-1 ^b /Est-2 ^b	9	0.1152	1.0000	0.0101
	Total	25			
2jz³	Est-1 ^b /Est-2 ^d	4	-0.0476	-0.5797	0.0379
	Est-1 ^c /Est-2 ^d	2	0.0547	1.0000	0.0041
	Total	29			

Tabla 16. Desequilibrios globales y dentro de cada inversión entre los loci Est-1 y Xdh.

Ordenación	Gametas	N	D	D'	P
Global haploide	-	-	-	-	-
	Total	140			
Global diploide	-	-	-	-	-
	Total	262			
2st	Est-1 ^c /Xdh ^b	0	-0.0450	-1.0000	0.0021
	Est-1 ^c /Xdh ^c	1	0.0450	1.0000	0.0021
	Total	20			
2jz³	Est-1 ^b /Xdh ^b	13	0.0650	1.0000	0.0422
	Est-1 ^b /Xdh ^c	3	-0.0750	-1.0000	0.0098
	Total	20			

Tabla 17. Desequilibrios globales y dentro de cada inversión entre los loci Est-2 y Xdh.

Ordenación	Gametas	N	D	D'	P
Global haploide	-	-	-	-	-
	Total	141			
Global diploide	Est-2 ^d /Xdh ^b	24	-0.0170	0.0864	0.0368
	Est-2 ^d /Xdh ^c	10	0.0198	0.0192	0.0059
	Total	263			
2j	Est-2 ^c /Xdh ^b	32	0.0440	0.7949	0.0162
	Est-2 ^c /Xdh ^c	1	-0.0355	-0.7576	0.0375
	Est-2 ^d /Xdh ^b	6	-0.0287	-0.2960	0.0169
	Est-2 ^d /Xdh ^c	4	0.0312	0.3143	0.0052
	Total	88			
2jz³	Est-2 ^c /Xdh ^b	3	-0.1100	-0.5238	0.0353
	Total	20			

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguna de las combinaciones posibles entre los tres loci mostró disequilibrios globales significativos entre alelos (“globales haploides”, tablas 15 a 17). Sin embargo también se contaba con la información enzimática (no así la cromosómica) de la otra gameta de cada macho colectado en la población natural, ya que durante las electroforesis se corrieron simultáneamente los padres y sus respectivas F₁. De esta manera, la metodología de trabajo permitió deducir el haplotipo enzimático de la gameta que no fue transmitida al descendiente analizado.

Utilizando esta información en los análisis de disequilibrios globales, se logró duplicar el tamaño muestral, y los resultados obtenidos se presentan bajo el título de “globales diploides” (tablas 15, 16 y 17). Este procedimiento permitió detectar la presencia de disequilibrios significativos, tanto entre Est-1 y Est-2 (tabla 15) como entre ésta última y Xdh (tabla 17).

También puede observarse en estas mismas tablas que todas las asociaciones cuyos disequilibrios globales resultan significativos siempre tienen un componente “dentro” atribuible a una ordenación en particular, que en el caso de Est-1/Est-2 es 2st (tabla 15) y en el de Est-2/Xdh es 2j (tabla 17).

Todos los demás desequilibrios son detectables únicamente dentro de los cromosomas, y son exclusivos de cada inversión, es decir distintas combinaciones están presentes en 2st, en 2j o en 2jz³, pero no simultáneamente en todas ellas (Est-2^c/Xdh^b es el único caso que posee desequilibrios en dos ordenaciones, 2j y 2jz³, pero estos son en un caso por exceso y en el otro por defecto, información compatible con los demás resultados obtenidos, tabla 17).

En la tabla 18 se resumen estos desequilibrios “dentro”, separando los desequilibrios “por asociación”(D>0) y “por repulsión”(D<0) para cada ordenación.

Tabla 18. Resumen de los alelos enzimáticos que exhiben desequilibrios positivos y negativos significativos dentro de las inversiones.

Ordenación	Desequilibrios por asociación	Desequilibrios por repulsión
2st	Est-1 ^a /Est-2 ^a Est-1 ^b /Est-2 ^b Est-1 ^c /Xdh ^c	Est-1 ^a /Est-2 ^b Est-1 ^b /Est-2 ^a Est-1 ^c /Xdh ^b
2j	Est-2 ^c /Xdh ^b Est-2 ^d /Xdh ^c	Est-2 ^c /Xdh ^c Est-2 ^d /Xdh ^b
2jz³	Est-1 ^c /Est-2 ^d Est-1 ^b /Xdh ^b	Est-1 ^b /Est-2 ^d Est-1 ^b /Xdh ^c Est-2 ^c /Xdh ^b

Así, dentro de 2st hay un exceso de gametas con las combinaciones alélicas Est-1^a/Est-2^a, Est-1^b/Est-2^b y Est-1^c/Xdh^c, en j, hay asociaciones positivas significativas entre Est-2^c/Xdh^b y Est-2^d/Xdh^c y en jz³ se detectan desequilibrios positivos para los pares de loci Est-1^c/Est-2^d y Est-1^b/Xdh^b.



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar si existía algún tipo de diferencia en los dos métodos utilizados previamente en el laboratorio para aislar cromosomas salvajes. De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto a partir de un test exacto de Fisher como de tablas de contingencia, las diferencias en la estimación de frecuencias cromosómicas y alélicas fueron no significativas para todos los sistemas analizados, salvo Xdh . No obstante, esta significación se pierde cuando se agrupan las clases alélicas Xdh^a y Xdh^b , poniendo de manifiesto que existe una representación diferencial del alelo a en las dos muestras, con frecuencias observadas de 0.083 en Otamendi A y de 0.000 en Otamendi B, respectivamente.

Una posible causa de esta diferencia es que ocurra selección en el laboratorio. Sin embargo, ambos tratamientos se realizaron bajo las mismas condiciones de cría (medio de cultivo, temperatura, humedad, etc) y de apareamiento (edad de machos y hembras, tiempo de apareamiento, etc) de los individuos, motivo por el cual esta posibilidad puede ser desestimada. Cabría entonces preguntarse si tal diferencia en el contenido alélico proviene de errores en la discriminación de los individuos que fueron cruzados.

Pueden plantearse al respecto dos hipótesis alternativas: o bien existe una sobreestimación de Xdh^a (y por lo tanto una subestimación de Xdh^b) en Otamendi A o, por el contrario, hay una subestimación de este alelo (y una sobreestimación de Xdh^b) en Otamendi B.

Los errores en la estimación de las frecuencias enzimáticas en Otamendi A, de acuerdo al esquema de cruzamientos seguido (ver materiales y métodos), podrían ser atribuidos a un congelamiento incorrecto de algunos individuos F_1 . Si hubiesen existido problemas en la selección de hembras vírgenes, algunos de estos machos podrían poseer el genotipo Ant/Δ^5 en lugar de $Ant/+$. Estos dos tipos de machos son distinguibles fenotípicamente, pero la penetración del carácter Δ^5 es variable, y pueden ocurrir errores en su detección. Sin embargo la cepa Ant/Δ^5 está caracterizada electroforéticamente para los marcadores analizados, y no posee el alelo Xdh^a , sino Xdh^b , por lo cual un error de este tipo conduciría a una sobreestimación de este último alelo, contradiciendo los resultados observados.

La otra posibilidad involucraría errores en la detección de las frecuencias en los cruzamientos de Otamendi B. Si las hembras vírgenes $B\phi H$ no hubiesen sido

seleccionadas correctamente, algunos machos F_1 congelados serían $B\emptyset H / B\emptyset H$ y no $B\emptyset H / +$. En este caso se esperaría un exceso de alelos Xdh^b , que son los que posee la cepa, a expensas del menos frecuente Xdh^a . Esto es precisamente lo que se observa, pero este tipo de error también conllevaría a un exceso de los alelos enzimáticos de la cepa en los otros sistemas ($Est-1^b$, $Est-2^b$, Lap^b , $Aldox^a$, $Pep-1^b$ y $Pep-2^b$), provocando también en ellos una pérdida de los alelos menos frecuentes. No obstante, al comparar las frecuencias alélicas en ambas muestras (tabla 2) se ve que tal pérdida no ocurre y alelos aún menos frecuentes que Xdh^a (por ejemplo $Est-2^c$, Lap^a , Lap^c , $Pep-2^c$) aparecen representados en Otamendi B.

Todas estas consideraciones sugieren que las diferencias para el sistema Xdh no son atribuibles a las dos metodologías de cruzamientos utilizadas, y que la explicación más sencilla para éstas es una cuestión de aleatoriedad en las dos submuestras, dada la baja frecuencia del alelo a (se detectaron 6 casos en un total de 162 gametas analizadas).

La conclusión final con respecto a los dos tratamientos para muestrear cromosomas salvajes, es que pueden ser utilizados alternativamente, ya que no introducen sesgos en las estimaciones de las frecuencias alélicas y cromosómicas. Por esta razón los datos obtenidos a partir de cada uno de ellos permiten tanto la reunión de los mismos en una muestra única como la realización de comparaciones válidas si se los utiliza en análisis conjuntos de poblaciones que fueron sometidas a uno u otro tratamiento.

LOS DESEQUILIBRIOS CROMOSOMAL ENZIMÁTICA

De los sistemas enzimáticos analizados solamente tres presentaron desequilibrios gaméticos significativos con las ordenaciones del cromosoma 2: $Est-1$, $Est-2$ y Xdh , siendo estos resultados consistentes con los obtenidos en otras poblaciones naturales, tanto de Argentina como de áreas de colonización de la especie (Knibb et al., 1987; Betrán et al., 1995; Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación).

$Est-2$ fue el único sistema cuyos desequilibrios resultaron tan importantes y consistentes como para ser detectados en el análisis global (χ^2_T , tabla 8), si bien cabe destacar que el desequilibrio global para $Est-1$ fue marginalmente significativo (tabla 7). También es $Est-2$ el locus que presenta los mayores grados de desequilibrio entre

alelos y ordenaciones, como lo ponen de manifiesto sus elevados valores de D' (tabla 14).

Los desequilibrios alelo-ordenación detectados para los tres sistemas evidencian un contenido genético diferencial entre inversiones: los alelos Est-1^a y Est-2^a tienden a estar asociados con 2st, mientras que Est-2^c lo hace con 2j. Al mismo tiempo, otras combinaciones, como lo es el caso de Xdh^b con 2jz³, están presentes en la población en frecuencias menores a las esperadas por azar.

Los desequilibrios de Est-1 y Est-2 con el cromosoma 2, pueden, en principio, ser explicados por la posición de ambos marcadores en el mismo (figura 1). Est-1 es un locus que se ubica dentro de los segmentos involucrados los reordenamientos 2j, 2jz³ y 2jq⁷. Si se asume un origen único de las inversiones, y si no ha transcurrido suficiente tiempo para que ocurra homogeneización en las frecuencias alélicas de los loci capturados por ellas (por entrecruzamientos dobles, conversión génica y mutación), se espera que la disminución de la recombinación en los heterocariotipos mantenga diferencias genéticas en el contenido de las ordenaciones cromosómicas. Este fenómeno se traduciría en la detección de desequilibrios gaméticos para los marcadores localizados dentro de las inversiones, y este patrón es precisamente el que se observa para el locus Est-1.

En este contexto, resulta llamativo que Aldox, el otro marcador analizado que mapea dentro de las inversiones, no presente desequilibrios gaméticos significativos con ellas. No obstante, estudios más abarcativos, donde se analizaron conjuntamente varias poblaciones argentinas (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación), mostraron la existencia de desequilibrios globales positivos ($D > 0$) significativos para los pares Aldox^a/2j, Aldox^a/2jz³ y Aldox^b/2st. Estas mismas asociaciones exhiben tendencias idénticas en la población de Otamendi, sugiriendo que su falta de significación sería producto de un tamaño muestral insuficiente para detectarlas.

En el caso de Est-2, cuya localización es cercana al sitio de rotura proximal de la inversión j, la presencia de desequilibrios con los cromosomas puede ser interpretada como el resultado de un apareamiento homólogo restringido entre cromosomas portadores de distintas inversiones. Este fenómeno se traduce en la ausencia de quiasmas en regiones cercanas a los puntos de rotura de las mismas, generando una disminución de la recombinación en esos sitios (Dobzhansky y Epling, 1948a y b; Carson, 1953; Grell, 1962), y la presencia de desequilibrios gaméticos.

Hasta aquí se ha propuesto que los desequilibrios entre las esterasas y los cromosomas pueden ser explicados por ligamiento y origen reciente de las inversiones, si bien es posible plantear hipótesis alternativas. Una de ellas es que estos desequilibrios gaméticos sean el resultado de algún tipo de proceso selectivo que esté actuando sobre los loci capturados por los diferentes reordenamientos cromosómicos. En este sentido, estudios de correlación de ambas enzimas con variables geográficas y climáticas tanto en Australia (Knibb y Barker, 1988) como en Argentina (Rodríguez, 1998) han puesto de manifiesto la existencia de patrones clinales diferentes para cada una de ellas. Las clinas detectadas para Est-1 son coincidentes con las de las inversiones y, dado el desequilibrio gamético existente entre ambas, son explicables por el efecto de arrastre de éstas últimas. Est-2, en cambio, exhibe clinas independientes de las cromosómicas y coincidentes con las mismas variables analizadas tanto en Australia como en Argentina. Estos datos sugieren que las mismas podrían ser el resultado de selección natural diferencial en distintos escenarios ecológicos.

No es esta la única evidencia que apoya el papel de la selección como mecanismo responsable del mantenimiento de la variabilidad en el locus Est-2. En primer lugar se ha observado que, al perturbar artificialmente las frecuencias alélicas de este locus en una población natural, éstas retornaron a sus valores originales (Barker y East, 1980); mientras que otros estudios han demostrado que los individuos portadores de diferentes alelos para este locus exhiben respuestas diferenciales a shocks térmicos (Watt, 1981). Finalmente distintos análisis han puesto de manifiesto que los genotipos de Est-2 muestran diferencias tanto en los patrones de oviposición frente al estímulo de distintas especies de levaduras (Barker et al., 1981), como en atracción hacia sustratos y viabilidad en cactus hospedadores de diferentes especies (Fernández-Iriarte, 1999).

Todas estas evidencias indicarían que el desequilibrio gamético detectado entre Est-2 y las inversiones no debería explicarse únicamente en términos de la historia del polimorfismo cromosómico, ya que parte del mismo podría ser atribuido a algún tipo de proceso selectivo. Esto explicaría las razones por las cuales Est-1, pese a mapear dentro del sistema de inversiones, presenta un grado de desequilibrio con ellas mucho menor que Est-2.

Por otra parte, los desequilibrios observados permiten hacer inferencias sobre el contenido alélico ancestral de las ordenaciones derivadas a partir de 2st. Si los desequilibrios presentes en las ordenaciones son producto principalmente de eventos históricos únicos, la ordenación 2j podría haberse originado a partir de un cromosoma 2st que contenía a los alelos Est-1^b o Est-1^c y Est-2^c. Estudios en poblaciones argentinas (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación) y australianas (Knibb et al., 1987) han detectado no solamente los mismos desequilibrios registrados en Otamendi, sino también un exceso de haplotipos Est-1^b / 2j. Toda esta información sugiere que el contenido alélico de la ordenación 2st que originó a 2j sería Est-1^b y Est-2^c. En lo que respecta a la ordenación 2jz³, los resultados de estos mismos trabajos permiten inferir que el contenido alélico ancestral habría sido Est-1^b y Est-2^{c/d}, información compatible con la del presente trabajo donde sólo se detecta una deficiencia del alelo Est-2^b en dicha inversión.

Finalmente, el desequilibrio de Xdh^b con 2jz³ no puede ser explicado por ligamiento con los reordenamientos, ya que este locus se localiza por fuera de todos los segmentos comprometidos en los mismos.

Xdh es una enzima compleja que forma parte del ciclo de degradación de las purinas (Glassman, 1965) y que requiere de la actividad de por lo menos otros tres loci que mapean en otros cromosomas: *cin*, *lxd* y *mal* (Glassman et al., 1968). También presenta interacciones con otras enzimas localizadas en el mismo brazo cromosómico. Por ejemplo, O'Brien y MacIntyre (1978) observaron que la presencia de mutaciones en Xdh tenían efectos pleiotrópicos sobre los loci Aldox y pyridoxal oxidasa (Po). No se conoce la naturaleza de estas interacciones pero se sabe que las tres enzimas requieren la presencia de molibdeno como cofactor para su actividad normal (Browder y Williamson, 1976; Bentley y Williamson, 1982).

Debido a que Aldox mapea dentro del sistema de inversiones y Po se localiza en el cromosoma 3R de *D. melanogaster* (Nelson y Szauter, 1992), que es elemento homólogo al cromosoma 2 de *D. buzzatii* (Wasserman, 1982; Ranz, et al., 1997), los desequilibrios detectados entre Xdh y las inversiones, podrían ser el resultado de la presencia de interacciones entre Xdh y alguno de estos dos marcadores.

Por último resulta importante destacar que, el hecho de encontrar desequilibrios significativos entre los cromosomas y las enzimas en poblaciones colonizadas tanto de Australia (Knibb et al., 1987) como de España (Betrán et al., 1995) coincidentes con

los de Otamendi (Est-2^a/2st, Est-2^c/st y Est-2^b/jz³) y los de otras poblaciones del área de origen (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación) pone de manifiesto que estos desequilibrios son previos a la expansión de la especie a otros continentes y que los individuos colonizadores poseían una muestra representativa de las gametas presentes en el área de origen (y por lo tanto no se produjo un aumento de combinaciones poco frecuentes por efecto fundador como fue sugerido por los autores en dichos trabajos).

LOS DESEQUILIBRIOS ENZIMA-ENZIMA

De los tres loci que mostraron desequilibrios gaméticos significativos con las ordenaciones solamente los pares Est-1/Est-2 y Est-2/Xdh presentaron desequilibrios globales significativos entre sí.

Brown (1975) demostró que el tamaño muestral necesario para detectar desequilibrios gaméticos es una función tanto de las frecuencias alélicas de los loci involucrados en los mismos como del parámetro D , requiriéndose tamaños muestrales mayores cuanto menores son D y/o las frecuencias alélicas. En este contexto, las diferencias en los tamaños muestrales para los desequilibrios enzima-enzima respecto de los desequilibrios cromosoma-enzima podría atribuirse a la presencia de frecuencias menos extremas para el polimorfismo cromosómico cuando se lo compara con el de los loci enzimáticos (tablas 1, 2 y 3), junto con valores menores de D' para estos últimos, al menos en el caso de los loci Est-2/Xdh (tabla 17).

Para proseguir con la discusión de los desequilibrios enzima-enzima, resulta conveniente analizar la diferencia entre los dos componentes posibles de los mismos cuando los loci se encuentran asociados a un sistema de inversiones. Con tal objeto se podría pensar, a modo ilustrativo, que las inversiones son “vehículos” que transportan distintos “pasajeros” (los alelos de los diferentes loci). Se pueden encontrar dos causas por las cuales dos de dichos pasajeros están juntos. La primera de ellas es que ambos, por causas diferentes, toman con mucha frecuencia el mismo vehículo, por lo cual aumenta la probabilidad de encontrarlos juntos. Éste es el desequilibrio “entre” (o desequilibrio por covarianza), que mide la probabilidad de encontrar dos alelos asociados dado que ambos presentan desequilibrios con una inversión o con varias de ellas. La segunda posibilidad es que ambos pasajeros tengan algún vínculo entre sí, (por ejemplo son amigos) y por eso los encontramos juntos a bordo de algún(nos)

vehículo(s). Éste componente es el desequilibrio “dentro” y mide las asociaciones de los alelos dentro de cada inversión. A su vez, las distintas ordenaciones pueden mostrar asociaciones “dentro” iguales (encontramos frecuentemente a los dos alelos en cualquier ordenación) o diferentes (ambos alelos viajan juntos sólo en alguna ordenación en particular).

Bajo esta óptica, de los loci analizados cuyos desequilibrios globales resultan significativos, la única combinación alélica que posee un componente significativo “entre” cada locus y alguna ordenación es Est-1^a/Est-2^a, debido a la asociación de cada uno de estos marcadores con 2st (tabla 15).

En cambio, el componente de desequilibrio “dentro” de las inversiones, está presente en todos los desequilibrios globales significativos ya sea por una contribución diferencial de 2st (caso de Est-1^a/Est-2^a, tabla 15), o de 2j (caso de Est-2^d/Xdh^b y Est-2^d/Xdh^c, tabla 17). También existen desequilibrios “dentro” significativos para alelos de los pares de loci Est-1/ Est-2, Est-1/Xdh y Est-2/Xdh (tablas 15, 16 y 17) pero que no determinan desequilibrios globales.

Si se analizan conjuntamente todos estos desequilibrios “dentro”, puede verse que estos nunca fueron independientes de las ordenaciones cromosómicas, es decir que no se registraron simultáneamente en 2st, 2j y 2jz³, sino solamente dentro de alguna de ellas, sugiriendo que en los desequilibrios de alelos alozímicos existiría algún tipo de efecto de los cromosomas. A partir de estos resultados no podemos saber si estos desequilibrios son sólo atribuibles a razones históricas o están mantenidos por algún tipo de selección, pero, en caso de estar actuando esta última, los pares alélicos tendrían un valor adaptativo que dependería del ambiente genómico (la ordenación) en que se encuentran presentes.

Integrando todos los resultados obtenidos, tanto a partir de los desequilibrios enzima-enzima, como de las asociaciones cromosoma-enzima, podemos concluir que los mismos reflejan la presencia de diferencias en el contenido genético de las inversiones del cromosoma 2 en la población de Otamendi. Sin embargo, este no sería un caso aislado, ya que este mismo tipo de análisis en otras poblaciones del área de origen ha arrojado resultados similares (Rodríguez, 1998; Rodríguez et al., en preparación). Esta presencia de desequilibrios significativos comunes a poblaciones de diferentes regiones fitogeográficas de Argentina ha llevado a plantear dos hipótesis con respecto a las diferencias genéticas detectadas entre inversiones. O bien la especie

atravesó un cuello de botella poblacional previo a su expansión a otros continentes, (como ya se había sugerido en trabajos anteriores; Rossi et al., 1996) o bien el origen del polimorfismo cromosómico de *Drosophila buzzatii* es reciente.

CONCLUSIONES

- 1) Las dos metodologías utilizadas son igualmente idóneas para aislar cromosomas salvajes y estimar frecuencias alélicas y cromosómicas.
- 2) En esta población de *Drosophila buzzatii* existen diferencias en el contenido genético de las inversiones del cromosoma 2, como lo ponen de manifiesto los disequilibrios gaméticos detectados para los loci Est-1 y Est-2.
- 3) El disequilibrio de Xdh con las ordenaciones podría ser el resultado de interacciones con loci que mapean dentro de ellas, como Aldox y Po.
- 4) El par de alozimas Est-1^a/Est-2^a es el único cuyo disequilibrio global posee un componente de disequilibrio por covarianza significativo, debido a las asociaciones de estos alelos con las inversiones (disequilibrio “entre”).
- 5) Todos los otros disequilibrios significativos entre pares de alozimas presentan únicamente un componente de disequilibrio “dentro”.
- 6) No obstante este disequilibrio “dentro” no es independiente de la ordenación cromosómica en que se hallan presentes los pares de loci enzimáticos.



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS



DISCUSIÓN



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA CITADA Y CONSULTADA

- Aquadro, C. F., A. L. Weaver, S. W. Schaeffer and W. W. Anderson. 1991. Molecular evolution of inversions in *Drosophila pseudoobscura*: the *amylase* gene region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 305-309.
- Babcock, C. S., and Anderson. 1996. Molecular evolution of sex-ratio inversion complex in *Drosophila pseudoobscura*: analysis of *esterase-5* gene region. *Mol. Biol. Evol.* 13: 297-308.
- Barker J. S. F., and P. D. East. 1980. Evidence of selection following perturbation of allozyme frequencies in a natural population of *Drosophila*. *Nature* 284: 166-168.
- Barker, J. S. F. 1982. Population genetics of *Opuntia* breeding *Drosophila* in Australia. In: *Ecological Genetics and Evolution*. J. S. F. Barker; W. T. Starmer (eds). Academic Press, Australia. pp. 209-224.
- Barker, J. S. F. 1994. Sequential gel electrophoretic analysis of *esterase-2* in two populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 92: 165-175.
- Barker, J. S. F., and J. C. Mulley. 1976. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 30: 213-233.
- Barker, J. S. F., D. C. Vacek, P. D. East and W. T. Starmer. 1986. Allozyme genotypes of *Drosophila buzzatii*. Feeding and oviposition preferences for microbial species and habitat selection. *Aust. J. Biol. Sci.* 39: 47-58.
- Barker, J. S. F., G. L. Toll, P. D. East and P. R. Widders. 1981. Attraction of *Drosophila buzzatii* and *Drosophila aldrichi* to species of yeasts isolated from their natural environment. II. Field experiments. *Aust. J. Biol. Sci.* 34: 613-624.
- Bentley, M. M. and J. H. Williamson. 1982. The developmental analysis of aldehyde oxidase activity in *cin* allelic heterozygotes of *Drosophila melanogaster*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 24: 1-9.
- Betrán, E., J. E. Quezada-Díaz, A. Ruiz, M. Santos & A. Fontdevila. 1995. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXII. Linkage disequilibrium between allozymes and chromosome inversions in two colonizing populations. *Heredity* 74: 188-199.

- ④ Browder, L. W., and J. H. Williamson. 1976. The effects of cinnamon on xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase activity during development in *Drosophila melanogaster*. *Devel. Biol.* 53: 241-249.
- ④ Brown, A. H. D. 1975. Sample sizes required to detect linkage disequilibrium between two or three loci. *Theoret. Pop. Biol.* 8: 184-201.
- ④ Cabrera, A. 1976. *Regiones Fitogeográficas de la Argentina*. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería. Fasc. 1. Ed. ACME. S.A.C.I. Buenos Aires.
- ④ Carson, H. L. 1953. The effects of inversions on crossing over in *Drosophila robusta*. *Genetics* 38: 168.
- ④ Cavalli-Sforza, L. L., and W. F. Bodmer. 1971. *The Genetics of Human Populations*. Freeman, San Francisco.
- ④ Charlesworth, B., and D. Charlesworth. 1973. A study of linkage disequilibrium in a population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 73: 351.
- ④ Charlesworth, B., D. Charlesworth and M. Loukas. 1979. A study of linkage disequilibrium in British populations of *Drosophila subobscura*, with an appendix by K. Morgan. *Genetics* 92: 983.
- ④ Darlington, C. D., and Mather, K. 1949. *The Elements of Genetics*. Allen and Unwin, London.
- ④ David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions. *Dros. Inf. Serv.* 36: 128.
- ④ Dobzhansky, Th. 1949. Observations and experiments on natural populations in *Drosophila*. (*Proc. Eight Internat. Congr. Genet.* 1948), *Hereditas* (suppl. vol.) pp. 210-224.
- ④ Dobzhansky, Th. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia, University Press, New York.
- ④ Dobzhansky, Th. and C. Epling. 1948a. The suppression of crossing over in inversion heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 34: 137-141.
- ④ Dobzhansky, Th. and C. Epling. 1948b. The suppression of crossing over in inversion heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 34: 137.
- ④ Dobzhansky, Th., and A. H. Sturtevant. 1938. Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 23: 28.
- ④ Engels, W. R. 1983. The P family of transposable elements in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 17: 315.

- Engels, W. R. and C. R. Preston. 1984. Formation of chromosome rearrangements by P factors in *Drosophila*. *Genetics* 105: 657.
- Fanara, J. J. 1995. *Explotación diferencial de los recursos en especies cactófilas de Drosophila*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Fanara, J., E. Hasson and A. Fontdevila. 1998. Oviposition preference and life history traits in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural host. Enviado.
- Fanara, J., E. Hasson, C. Rodríguez, M. Santos and A. Fontdevila. 1996. Are *Opuntia* hosts a selective factor for the inversion polymorphism? *Heredity* 77: 500-508.
- Fernández Iriarte, P. J. 1999. *Bases genéticas de la adaptación de Drosophila buzzatii al uso de los recursos*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fontdevila, A. 1989. Founder effects in colonizing populations. The case of *Drosophila buzzatii*. In: *Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations*. A. Fontdevila (ed). Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 74-95.
- Fontdevila, A., A. Ruiz, G. Alonso and J. Ocaña. 1981. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. I. Natural chromosomal polymorphism in colonized populations of the Old World. *Evolution* 35: 148-157.
- Fontdevila, A., A. Ruiz, J. Ocaña and G. Alonso. 1982. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. II. How much has chromosomal polymorphism changed in colonization? *Evolution* 36: 843-851.
- Fontdevila, A., C. Zapata, G. Alvarez, L. Sanchez, J. Mendez and I. Enriquez. 1983. Genetic coadaptation in the chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Seasonal change of gametic disequilibrium in a natural population. *Genetics* 105: 935-955.
- Garcia, M. P., and A. Prevosti. 1981. Association between allozyme alleles and chromosomal arrangements of the O chromosome in *Drosophila subobscura*. I. Data of natural populations. *Genet. Iber.* 33: 151.

- Glassman E., T. Shinoda, E. J. Duke, J. F. Collins. 1968. Multiple molecular forms of xanthine deshydrogenase and related enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151: 263-273.
- Glassman, E. 1965. Genetic regulation of xanthine dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Federation Proc.* 24: 1243-1251.
- Goldschmidt, R. 1939. Mass mutation in the Florida stock of *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 73: 547.
- Green, M. M. 1980. Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. *Annu. Rev. Genet.* 14: 109.
- Grell, R. F. 1962. A new model for secondary non distribution: the role of disruptive pairing. *Genetics* 47: 1737.
- Hasson, E. and W. F. Eanes. 1996. Constrasting histories of three gene regions associated with *In(3L)Payne* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1565-1575.
- Hasson, E., C. Rodríguez, J. J. Fanara, H. Naveira, O. A. Reig and A. Fontdevila. 1995. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVI. Macrogeographic patterns in the inversion polymorphisms in New World populations. *J. evol. Biol.* 8: 369-384.
- Hasson, E., H. Naveira and A. Fontdevila. 1992. The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (*subgenus Drosophila-repleta* group). *Rev. Chilena de Hist. Nat.* 65: 319-326.
- Hasson, E., J. C. Vilardi, H. Naveira, J. J. Fanara, C. Rodríguez, O. A. Reig and A. Fontdevila. 1991. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XVI. Fitness components analysis in a natural population from Argentina. *J. evol. Biol* 4: 209-225.
- Hedrick, P. W. 1983. *Genetics of Populations*. Science Books International, Boston.
- Hedrick, P., S. Jain and L. Holden. 1978. Multilocus systems in evolution. In: *Evolutionary Biology*. Vol 11. M. K. Hecht, W. C. Steer and B. Wallace (eds). Plenum Press, New York.
- Ishii, K., and B. Charlesworth. 1971. Association between allozyme loci and gene arrangements due to hitch-hiking effects of new inversions. *Genet. Res.* 30: 93.

- Knibb, W. R. and J. S. F. Barker. 1988. Polymorphic inversion and esterase loci complex on chromosome 2 of *Drosophila buzzatii* II. Spatial Variation. *Aust. J. Biol. Sci.* 41: 239-246.
- Knibb, W. R., P. D. East and J. S. F. Barker. 1987. Polymorphic inversion and esterase loci complex on chromosome 2 of *Drosophila buzzatii*. I. Linkage disequilibria. *Aust. J. Biol. Sci.* 40: 257-269.
- Kojima, K. I., J. H. Gillespie, and Y. N. Tobari. 1970. A profile of *Drosophila* species enzymes assayed by electrophoresis. *Biochem. Genet.* 4: 627.
- Krimbas, C. B. and J. R. Powell. 1992. *Introduction*. In: *Drosophila Inversion Polymorphism*. C. B. Krimbas and J. R. Powell (eds). C. R. C. Press. Boca Ratón, Florida.
- Krimbas, C. B., and M. Loukas. 1980. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Evol. Biol.* 12: 163.
- Lewontin R. C., and K. Kojima. 1960. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 14: 450-472.
- Lewontin, R. C. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49: 49-67.
- Lewontin, R. C. 1974. *The Genetic Basis of the Evolutionary Change*. Columbia University Press, New York.
- Loukas, M., and C. B. Krimbas. 1975. The genetics of *Drosophila subobscura* populations. V. A study of linkage disequilibrium in natural populations between genes and inversions of the E chromosome. *Genetics* 80: 331.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press. Cambridge, Massachussets.
- Muller, H. J. 1950. Our load of mutations. *Amer. J. Hum. Genet.* 2: 111-176.
- Nair, P. S., and D. Brnic. 1971. Allelic variations within identical chromosomal inversions. *Am. Nat.* 105: 291.
- Nei, M., and W. -H. Li. 1975. Probability of identical monomorphism in related species. *Genet. Res.* 26: 31.
- Nei, M., and W. -H. Li. 1980. Non-random association between electromorphs and inversion chromosomes in finite populations. *Genet. Res.* 26: 65.

- Nelson, C. R., and P. Szauter. 1992. Cytogenetic analysis of chromosome region 89A of *Drosophila melanogaster*: isolation of deficiencies and mapping of Po, Aldox-1 and transposon insertions. *Molec. gen. Genet.* 235: 11-21.
- Norry, F. M., J. C. Vilardi, J. J. Fanara and E. Hasson. 1995b. Courtship success and multivariate analysis of sexual selection on morphometric traits in *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae). *J. Insect. Behav.* 8: 219-229.
- Norry, F. M., J. C. Vilardi, J. J. Fanara, C. Rodríguez and E. Hasson. 1995a. An adaptative chromosomal polymorphism affecting size-related traits and longevity selection in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 96: 285-291.
- O'Brien, S. J. and R. Mc Intyre. 1978. Genetics and biochemistry of enzymes and specific proteins of *Drosophila*. In: *Genetics and Biology of Drosophila*. Vol 2. M. Ashburner and T. R. F. Wright (eds). Academic Press.
- Prakash, S. 1974. Gene differences between the sex ratio and standard gene arrangements of the X chromosome and linkage disequilibrium between loci in the standard gene arrangement of the X chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 77: 795.
- Prakash, S., and M. Levitan. 1973. Association of alleles of the Esterase-1 locus with gene arrangements of the left of the second chromosome in *Drosophila robusta*. *Genetics* 75: 371.
- Prakash, S., and M. Levitan. 1974. Association of alleles of the malic dehydrogenase locus with a paracentric inversion in *Drosophila robusta*. *Genetics* 77: 565.
- Prakash, S., and R. C. Lewontin. 1968. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. III. Direct evidence of coadaptation in gene arrangement of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59: 398.
- Prakash, S., and R. C. Lewontin. 1971. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. V. Further evidence of coadaptation of inversion in *Drosophila*. *Genetics* 69: 405.
- Prevosti, A., M. P. García, L. Serra, M. Aguadé, G. Ribo, and E. Sagarra. 1983. Association between allelic isozyme alleles and chromosomal arrangements in European populations and Chilean colonizers of *Drosophila subobscura*. In: *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*. Vol 10. M. C. Ratazzi, J. G. Scandalios and G. S. Whitt (eds). Alan R. Liss, New York.

- Prigogine, I. 1983. *La lectura de lo complejo*. En: ¿Tan sólo una ilusión? Una exploración del caos al orden. Colección Metatemas 3. Tusquets Editores.
- Ranz, J. M., C. Segarra and A. Ruiz. 1997. Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* 145: 281-295.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J. Heredity* 86: 248-249.
- Ridley, Mark. 1996. *Evolution. Second Edition*. Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts.
- Rodríguez, C. 1998. *Por qué es adaptativo el polimorfismo cromosómico de Drosophila buzzatii (grupo repleta, Drosophilidae)*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Rodríguez, C., E. Levy; R. Piccinali y E. Hasson. En preparación a. Population structure on enzymatic loci and chromosomal polymorphism in *Drosophila buzzatii*.
- Rodríguez, C., J. J. Fanara and E. Hasson. 1999. Inversion polymorphism body size and longevity in a natural population of *Drosophila buzzatii*. En prensa.
- Rodríguez, C., R. Piccinali, E. Levy y E. Hasson. En preparación b. Desequilibrio de ligamiento entre ordenaciones del cromosoma 2 y 7 loci isoenzimáticos en poblaciones de *Drosophila buzzatii* de diferentes regiones fitogeográficas.
- Rossi, M. S., E. Barrio, A. Latorre, J. Quezada-Díaz, E. Hasson, A. Moya and A. Fontdevila. 1996. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA polymorphism in original and colonizing populations. *Mol. Biol. Evol.* 13: 314-323.
- Ruiz, A. and M. Wasserman. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* 70: 582-596.
- Ruiz, A., A. Fontdevila, M. Santos, M. Seoane and E. Torroja. 1986. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. VIII. Evidence of endocyclic selection acting on the inversion polymorphism in a natural population. *Evolution* 40: 740-755.
- Ruiz, A., H. Naveira and A. Fontdevila. 1985. La historia evolutiva de *Drosophila buzzatii*. IV. Aspectos citogenéticos de su polimorfismo cromosómico. *Genét. Ibér.* 36: 13-35.

- Ruiz, A., M. Santos, A. Barbadilla, J. Quezada-Díaz, E. Hasson and A. Fontdevila. 1991. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XVIII. Genetic variance for body size in a natural population. *Genetics* 128: 739-750.
- Sanchez, A. 1986. *Relaciones filogenéticas en los clusters martensis y buzzatii de Drosophila*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Santos, M., A. Ruiz, J. E. Quezada-Díaz, A. Barbadilla and A. Fontdevila. 1992. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XX. Positive phenotypic covariance between field adult fitness components and body size. *J. Evol. Biol.* 5: 403-422.
- Schafer, D. J., D. K. Fredline, W. R. Knibb, M. M. Green and J.S. F. Barker. 1993. Genetics and linkage mapping of *Drosophila buzzatii*. *Journal of Heredity* 84: 188-194.
- Schneider, S., J. Kueffer, D. Roessli, and L. Excoffier. 1998. *Manual ARLEQUIN ver. 1.1*. URL: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>
- Smith-McBride, Z., A. Moya and F. J. Ayala. 1988. Linkage disequilibrium in natural and experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 120: 1043.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1981. *Biometry* (2nd edition). Freeman, San Francisco.
- Strobeck, C. 1983. Expected linkage disequilibrium for a neutral locus linked to a chromosomal arrangement. *Genetics* 103: 545.
- Sturtevant, A. H. 1917. Genetics factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3: 555.
- Sturtevant, A. H. and C. R. Plunkett. 1926. Sequence corresponding third chromosome genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Biol. Bull.* 50: 56.
- Sturtevant, A. H. and G. W. Beadle. 1936. The relation of inversions in the X chromosome of *Drosophila melanogaster* to crossing-over and disjunction. *Genetics* 21: 554.
- Sturtevant, A. H. and Th. Dobzhansky. 1936a. Inversions in the third chromosome of wild race of *Drosophila pseudoobscura*, and their use in the study of the history of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 22: 448.

- Sturtevant, A. H. and Th. Dobzhansky. 1936b. Geographical distribution and cytology of sex-ratio in *Drosophila pseudoobscura* and related species. *Genetics* 21: 473.
- Thomson, G. 1977. The effect of a selected locus on linked neutral loci. *Genetics* 85: 753-788.
- Wasserman, M. 1962. Cytological studies of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. V. The *mulleri* subgroup. *Studies in Genetics*. II. Texas University Publishers 6205: 119-134.
- Wasserman, M. 1972. Factors influencing fitness in chromosomal strains in *Drosophila subobscura*. *Genetics* 72: 691-708.
- Wasserman, M. 1982. Evolution of the *repleta* group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3b. M. Ashburnes, H. L. Carlson and J. N. Thompson (eds). Academic Press, London.
- Watt, A. W. 1981. The genetics of temperature tolerance in *Drosophila*. In: *Genetic Studies of Drosophila populations*. J. B. Gibson and J. G. Oakeshott (eds). Aust. Nat. Univ. Canberra.
- Weinberg, S. 1994. *Los tres primeros minutos del universo*. Alianza Editorial, Madrid.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Weir, B. S., and C. Cockerham. 1978. Testing hypothesis about linkage disequilibrium with multiple alleles. *Genetics* 88: 633-642.
- Wesley, C. S., and W. F. Eanes. 1994. Isolation and analysis of the breakpoint sequences of chromosome inversion *In(3L)Payne* in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3132-3136.
- Wright, S. 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proc. Sixth Int. Congr. Genetics* 1: 356-366.
- Wright, S. 1968-1978. *Evolution and Genetics of Populations*. 4 vols. University of Chicago Press, Chicago.





