

Tesis de Posgrado

Análisis citológico, ultraestructural y funcional del sistema cromosómico sexual en la clase Aves

Pigozzi, María Inés

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Pigozzi, María Inés. (1997). Análisis citológico, ultraestructural y funcional del sistema cromosómico sexual en la clase Aves. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2963_Pigozzi.pdf

Cita tipo Chicago:

Pigozzi, María Inés. "Análisis citológico, ultraestructural y funcional del sistema cromosómico sexual en la clase Aves". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2963_Pigozzi.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Análisis citológico, ultraestructural y funcional
del sistema cromosómico sexual en la clase Aves”**

María Inés Pigozzi

Director: Prof. Dr. Alberto Solari

**Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones en Reproducción
Facultad de Medicina (UBA)**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas

1997

11
i
hij 2

AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Dr. Alberto Solari, por su Dirección, sus consejos y su ejemplo.
- A la Dra. María Susana Merani, por poner su talento catalítico al servicio de esta becaria siempre que fue necesario, por sus sugerencias profesionales, y por posibilitar la obtención de los “zebra finches”.
- A Mónica Rahn, por soportar mi “abstracción” durante la redacción de la Tesis, y por compartir su experiencia de trabajo . A Pablo Cetica, por su permanente “encouragement” y el desafío de sus preguntas.
- Al CONICET, por permitimos demostrar a diario que, a pesar de todos los intentos, las ideas no se matan.

Por su afecto y presencia incondicional este trabajo está dedicado :

A mis padres

RESUMEN

A partir de un examen global de la bibliografía sobre cariología aviaria, se seleccionaron 5 especies de la clase Aves, pertenecientes a cinco órdenes aviarios diferentes, incluyendo una especie del grupo primitivo Ratitae, y cuatro especies del grupo más evolucionado de las aves carinadas, para realizar un análisis citológico y ultraestructural del cariotipo, y en especial de los cromosomas sexuales Z y W. Se estudió la estructura y comportamiento de los cromosomas, tanto mitóticos como meióticos. Se describen las características morfológicas de los macrocromosomas y las variaciones específicas de los cromosomas Z y W, en *Rhea americana* (Reiformes, Ratitae), *Anas platyrhynchos* (Anseriformes), *Numida meleagris* (Galliformes), *Columba livia* (Columbiformes) y *Poephila guttata* (Paseriformes). El cromosoma W está compuesto predominantemente por heterocromatina C+, con amplia heterogeneidad de distribución y morfología en cada especie de las aves carinadas; en *R. americana* el W es predominantemente eucromático, con bandas C+ sólo en el centrómero y brazo corto.

La conducta del par ZW en la profase meiótica femenina y el par ZZ en la masculina se analizaron en microextendidos de meiocitos para el estudio de complejos sinaptonémicos. En el par ZW, el proceso de sinapsis parcial, y el proceso de igualización de los ejes, están presentes en todas las especies analizadas. Asimismo, en todas las aves del grupo de las carinadas, se observa un único nódulo de recombinación, que tipifica a la zona recombinante. En *R. americana*, en cambio, existe libre recombinación a nivel de casi todo el brazo largo de ambos gonosomas. Se concluye que la conducta del par ZW se ha conservado durante la filogenia aviaria.

El análisis de la frecuencia y distribución de los nódulos de recombinación en los complejos sinaptonémicos de machos y hembras de *C. livia*, demuestra que existen tasas de recombinación similares en ambos sexos en esta especie. Se propone que esta característica puede ser propia de la clase Aves.

El estudio de las células mitóticas y meióticas de *P. guttata* permitió descubrir la presencia de un cromosoma B restringido a la línea germinal. La conducta de este cromosoma B, se analizó mediante microscopía óptica y electrónica en las gonadas masculina y femenina. Se propone una hipótesis para explicar su mantenimiento, y su transmisión de una generación a la siguiente.

En base a las evidencias aportadas por esta Tesis, y de acuerdo con la interpretación de los datos disponibles en la literatura, se propone el primer modelo para la evolución del par ZW aviario desde un estado homomórfico inicial hasta el heteromorfismo que se observa en las aves más evolucionadas.

ABSTRACT

After an extensive revision of the literature, five species of birds, belonging to five different orders, were chosen to perform a cytological and ultrastructural analysis of the karyotype, specially on the features of the Z and W chromosomes. One of these species belongs to the primitive group of ratite birds, while the other four species belong to the more evolved group of carinate birds. Morphological features of macrochromosomes and the specific variations of Z and W chromosomes are described in: *Rhea americana* (Rheiformes, Ratitae), *Anas platyrhynchos* (Anseriformes), *Numida meleagris* (Galliformes), *Columba livia* (Columbiformes) and *Poephila guttata* (Passeriformes). In all carinate birds the C+ heterochromatin is the main component of the W chromosome, showing large variations in morphology and distribution of the C banding material. In *R. americana* the W chromosome is mainly euchromatic, with C+ bands only at the centromere and the short arm.

The behavior of the ZW pair during female meiotic prophase and that of the ZZ pair during male meiosis, were analyzed using microspreads for synaptonemal complex studies. Both partial synapsis and axial equalization processes are present in the ZW pairs of all the examined species. In all carinate birds a single recombination nodule is observed, which is strictly located in a recombining region. In *R. americana*, however, there is free recombination along most of the extension of Zq and Wq. It is concluded that the ZW pair behaviour is conserved throughout avian phylogeny.

The analysis of the recombination nodule distribution and frequency in the synaptonemal complexes in males and females of *C. livia*, shows the existence of similar recombination rates in both sexes of this species. It is proposed that this feature may be distinctive of the class Aves.

The presence of a B chromosome restricted to the germ line was discovered in *P. guttata*, after the analysis of mitotic and meiotic cells in both sexes of this species. The behaviour of this B chromosome was analyzed in male and female gonads, using light and electron microscopy. A hypothesis is proposed to explain the maintenance of this B chromosome, and its transmission from one generation to another.

Finally, the first model for the evolution of the avian ZW pair is proposed, based on the evidence presented in this Thesis and according to the interpretation of related data from the literature. The model explains the transformation of the ZW pair from an homomorphic state to the highly differentiated state observed in the more evolved, living birds.

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1. Antecedentes de la observación de cromosomas sexuales en las aves	1
I.2. Consideraciones generales sobre el cariotipo aviario	2
I.3. El par ZW en la mitosis aviaria	3
I.3.1. El par ZW en las ratites	3
I.3.2. El par ZW en las aves carinadas	4
I.3.3. Variantes morfológicas del par ZW	6
I.4. El estudio de la profase meiótica y la recombinación al microscopio electrónico.....	6
I.4.1. Descripción de la profase meiótica temprana desde el punto de vista de los ejes meióticos	7
I.4.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos	8
I.4.3. Los nódulos de recombinación	9
I.5. La meiosis en las aves y su estudio a través de los ejes meióticos	11
I.5.1. La meiosis masculina en <i>Gallus domesticus</i>	11
I.5.2. La meiosis femenina y el par ZW	11
I.5.2.1. Estudios histológicos de la ovogénesis aviaria	11
I.5.2.2. Microextendidos de ovocitos : sinapsis y recombinación en el par ZW.	
Observaciones previas y su continuidad con este estudio	12
I.5.2.2.a) El par ZW en la meiosis de <i>Gallus domesticus</i>	12
I.5.2.2.b) Sinapsis y recombinación en el par sexual de otros Galliformes	14
I.5.2.2.c) El par ZW en <i>Anas platyrhynchos</i> (Anseriformes)	14
I.5.2.3. El par ZW durante el diplotene : los cromosomas plumulados	15
I.6. Origen de los cromosomas sexuales heteromórficos	16
I.6.1. Características generales de los heteromorfismos extremos en los vertebrados	17
I.6.2. Los cromosomas sexuales menos diferenciados	20
I.7. Del homomorfismo al heteromorfismo : la evidencia citológica en los ofidios	21
I.8. La diferenciación de los cromosomas sexuales : modelos teóricos	22
I.8.1. El trinquete de Muller	23
I.8.2. Modelo del transporte gratuito de genes	25
I.9. Origen de los mecanismos de restricción de la recombinación	26
I.9.1. Genes sexualmente antagonistas	27
I.9.2. Factores múltiples de determinación del sexo	28

1.9.3. Genes modificadores de la recombinación	29
1.9.4. Aplicabilidad de los modelos teóricos	30
II. MATERIALES Y METODOS	
II.1. El material de estudio	31
II.2. Microscopía óptica	33
II.2.1. Cultivo de linfocitos	33
II.2.2. Cultivos cortos de médula ósea	34
II.2.3. Bando G y C	35
II.2.4. Extendidos secados al aire para la observación de células meióticas (Técnica de Evans)	35
II.2.5. Cortes semifinos	36
II.3. Microscopía electrónica	36
II.3.1. Técnica de extendidos en superficies líquidas	36
II.3.2. Técnica de sedimentación y secado	39
II.4. Mediciones y tratamiento estadístico de los datos	40
III. RESULTADOS	
III.1. <i>Rhea americana</i>	43
III.1.1. El cariotipo somático	43
III.1.1.1. Medición el cariotipo somático	43
III.1.1.2. Bando G	44
III.1.1.3. Bando C	44
III.1.2. La profase meiótica femenina al microscopio óptico	45
III.1.3. El cariotipo de complejos sinaptonémicos y su comparación con el cariotipo mitótico	46
III.1.4. El bivalente ZW	47
III.1.4.1. Morfología	47
III.1.4.2. El par ZW y los nódulos de recombinación en <i>Rhea americana</i>	48
III.1.5. Los nódulos de recombinación en los complejos sinaptonémicos autosómicos de <i>Rhea americana</i>	50
III.2. <i>Anas platyrhynchos</i>	52
III.2.1. El cariotipo mitótico de <i>Anas platyrhynchos</i>	52
III.2.2. Los complejos sinaptonémicos y la relación con el cariotipo mitótico	52
III.2.3. El par ZW : el proceso de igualización y la localización del nódulo de recombinación en <i>Anas platyrhynchos</i>	52

III.3. <i>Numida meleagris</i>	55
III.3.1. El cariotipo mitótico de <i>Numida meleagris</i>	55
III.3.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos : comparación con el cariotipo mitótico	55
III.3.3. El par ZW de <i>N. meleagris</i> : presencia de un único nódulo de recombinación cercano al extremo sináptico	56
III.4. <i>Columba livia</i>	58
III.4.1. El cariotipo mitótico y el par ZW	58
III.4.2. El par ZW de <i>C. livia</i> durante la meiosis	59
III.4.2.1. Sinapsis e igualización	59
III.4.2.2. El par ZW de <i>C. livia</i> y el nódulo de recombinación	60
III.4.3. El cariotipo de complejos sinaptonémicos y el par ZZ en el macho de <i>C. livia</i>	61
III.4.4. La distribución de los nódulos de recombinación en machos y hembras de <i>C. livia</i>	62
III.4.5. Relación entre el número de nódulos de recombinación y el número de quiasmas en los espermatozoides de <i>C. livia</i>	65
III.5. <i>Poephila guttata</i>	66
III.5.1. Los cromosomas mitóticos de <i>P. guttata</i>	66
III.5.2. Análisis ultraestructural de la profase meiótica femenina en <i>P. guttata</i>	66
III.5.2.1. El par ZW de <i>P. guttata</i>	67
III.5.2.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos	68
III.5.2.3. Presencia de un eje accesorio y su conducta en los ovocitos de <i>P. guttata</i>	69
III.5.3. La meiosis masculina de <i>P. guttata</i>	71
III.5.3.1. Análisis de la meiosis al microscopio óptico	71
III.5.3.2. La profase meiótica masculina de <i>P. guttata</i> al microscopio electrónico. Presencia de un cromosoma accesorio condensado	72
IV. DISCUSION	
IV.1. Características generales del complemento cromosómico en la clase Aves.....	74
IV.2. Presencia de un único sistema cromosómico sexual en la clase Aves	76
IV.3. Características básicas y características variables del par ZW en la meiosis aviaría	78
IV.3.1.A. Características generales de los ejes meióticos.....	78
IV.3.1.B. Los ejes meióticos en el material aviarío	86
IV.3.2. Sinapsis parcial de los ejes Z y W	87
IV.3.3. El proceso de igualización	91

IV.3.4. Los nódulos de recombinación en el par ZW	95
IV.3.5. Cromatina asociada al par ZW y su relación con la ausencia de compensación de dosis génica	99
IV.4. Comparación de la meiosis masculina y femenina en las aves : los nódulos de recombinación en <i>C. livia</i>	102
IV.4.1. Diferencias generales entre la meiosis masculina y femenina	102
IV.4.2. Ultraestructura de los nódulos de recombinación en <i>C. livia</i>	102
IV.4.3. Frecuencias de recombinación en machos y hembras de aves	104
IV.5. La meiosis en <i>P. guttata</i>	108
IV.5.1. Características generales de los cromosomas B y su presencia en distintos organismos	109
IV.5.2. Repercusión funcional del los cromosomas B en distintos organismos	111
IV.5.3. Transmisión de los cromosomas B. Una hipótesis para el caso de <i>P. guttata</i>	112
IV.5.4. Efectos del cromosoma B en la meiosis de <i>P. guttata</i>	117
IV.5.5. El par ZW en <i>P. guttata</i>	119
IV.6. Modelo de la evolución del par sexual en la clase Aves	119
IV.6.1. Los modelos de evolución de los cromosomas sexuales	119
IV.6.2. La situación en la clase Aves	123
IV.6.3. Distribución de la heterocromatina en el par ZW aviario	124
IV.6.4. Las dimensiones de la zona recombinante en el par ZW aviario	126
IV.6.5. Composición del cromosoma W	127
IV.6.6. Conservación del cromosoma Z aviario	128
IV.6.7. Ubicación de los taxones analizados en la filogenia aviaria	129
IV.6.8. Un modelo para la emergencia del par ZW aviario	131
IV.7. Comparación de los sistemas cromosómicos sexuales de aves y mamíferos	134
IV.8. Areas para futuras investigaciones	136
V. CONCLUSIONES	137
Apéndice	140
BIBLIOGRAFIA	141

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de bandas G en el par ZW de <i>Rhea americana</i>	4i
2	Proceso de igualización y tipos de pares ZW en <i>Gallus domesticus</i>	12i
3	Frecuencia de los tipos de pares ZW en <i>Gallus domesticus</i>	13i
4	Metafase somática de <i>Rhea americana</i> (hembra)	43i
5	Bandas G en <i>Rhea americana</i>	43i
6	Bandas C en <i>Rhea americana</i>	44i
7	Idiograma de bandas C en <i>Rhea americana</i>	44ii
8	Ovocito en paquitene de <i>Rhea americana</i>	46i
9	Idiogramas de cromosomas mitóticos y complejos sinaptonémicos en <i>Rhea americana</i>	46ii
10	Regresión cariotipo mitótico : complejos sinaptonémicos en <i>Rhea americana</i>	46ii
11	El par ZW durante el paquitene en <i>Rhea americana</i>	47i
12	Histograma de la distribución de los nódulos de recombinación en el par ZW de <i>R. americana</i>	49i
13	Distribución de los NRs en los pares ZW de <i>R. americana</i> con dos nódulos	49ii
14	Distribuciones observada y esperada de las distancias entre pares de NRs en el par ZW de <i>R. americana</i>	49iii
15	Regresión longitud de los CS : NRs en <i>Rhea americana</i>	
16	Detalle del CS #1 de <i>Rhea americana</i> y los NRs	51i
17	Histogramas de la distribución de los NRs en los CSs autosómicos de <i>R. americana</i>	51ii
18	Metafase de <i>Anas platyrhynchos</i> (hembra)	52i
19	Bandas C en <i>Anas platyrhynchos</i>	52i
20	Idiogramas de cromosomas mitóticos y complejos sinaptonémicos en <i>Anas platyrhynchos</i>	52ii
21	Regresión cariotipo mitótico : complejos sinaptonémicos en <i>Anas platyrhynchos</i>	52ii
22	Par ZW de <i>A. platyrhynchos</i> (tipo LAS)	53i
23	Gráfico de la variación de longitudes de los ejes Z y W de <i>A. platyrhynchos</i> durante el paquitene	53ii
24	Histograma de la distribución del NR en el par ZW de <i>A. platyrhynchos</i>	54
26	Bandas C en <i>N. meleagris</i>	55i
27	Idiogramas de cromosomas mitóticos y complejos sinaptonémicos en <i>N. meleagris</i>	55ii
28	Regresión cariotipo mitótico : complejos sinaptonémicos en <i>N. meleagris</i>	55ii
29	Par ZW de <i>N. meleagris</i> (tipo MAS)	55iii

30	Histograma de la distribución del NR en el par ZW de <i>N. meleagris</i>	57
31	Metafase somática de <i>Columba livia</i> (hembra)	58i
32	Bandas C en <i>C. livia</i>	58i
33	Esquema del patrón de bandas C del cromosoma W de <i>C. livia</i>	58
34	Ovocito en paquitene de <i>C. livia</i>	58ii
35	Par ZW de <i>C. livia</i> (tipo MAS)	59i
36	Par ZW igualizado de <i>C. livia</i>	59ii
37	Histograma de la distribución del NR en el par ZW de <i>C. livia</i>	61
38	Espermatocito de <i>C. livia</i> en paquitene	61i
39	Idiogramas de cromosomas mitóticos y complejos sinaptonémicos en <i>C. livia</i>	61ii
40	Regresión cariotipo mitótico : complejos sinaptonémicos en <i>C. livia</i>	61ii
41	Regresión longitud de los CSs : NRs en ovocitos de <i>C. livia</i>	63
42	Regresión longitud de los CSs : NRs en espermatocitos de <i>C. livia</i>	64
43	Histogramas de la distribución de los NRs en los CSs autosómicos en machos y hembras de <i>C. livia</i>	64i
44	Espermatocito de <i>C. livia</i> en paquitene	65i
45	Metafases somáticas de <i>Poephila guttata</i> (macho y hembra)	66i
46	Bandas C en <i>P. guttata</i>	66ii
47	Ovocito de <i>P. guttata</i> en paquitene	66iii
48	Par ZW de <i>P. guttata</i> (tipo LAS)	67i
49	Par ZW igualizado de <i>P. guttata</i>	67ii
50	Histograma de la distribución del NR en el par ZW de <i>P. guttata</i>	68
51	Idiogramas de cromosomas mitóticos y complejos sinaptonémicos en <i>P. guttata</i>	68i
52	Regresión cariotipo mitótico : complejos sinaptonémicos en <i>P. guttata</i>	68i
53	Detalle del eje accesorio de <i>P. guttata</i>	70i
54	Metafase espermatogonial de <i>P. guttata</i>	71i
55	Espermatocito de <i>P. guttata</i> en paquitene.....	71i
56	Espermatocito de <i>P. guttata</i> en metafase I	71ii
57	Metafases II de <i>P. gutatta</i>	71ii
58	Túbulo seminífero de <i>P. guttata</i>	71iii
59	Espermatocito de <i>P. guttata</i> en paquitene	72i
60	Histogramas de la distribución de los NRs en los CSs autosómicos en machos y hembras de <i>C. livia</i>	106i

61	Esquema del probable destino del cromosoma B en la meiosis masculina de <i>P. guttata</i>	115
62	Esquema de la segregación preferencial de cromosoma B en la meiosis femenina de <i>P. guttata</i>	117
63	Representación esquemática de la evolución del par sexual en los ofidios	120i
64	Variaciones morfológicas del par ZW aviario	123i
65	Distribución de la heterocromatina en el par ZW aviario	125i
66	Comparación de la longitud de la zona recombinante en distintos pares ZW	126i
67	Arbol filogenético de la clase Aves	130i

INTRODUCCION

I.1. Antecedentes de la observación de cromosomas sexuales en las aves

Aunque las primeras observaciones del complemento cromosómico de un ave se remontan a principios del siglo actual (Loyez, 1906), la fórmula sexual fue un tema controvertido hasta la década del '60. La existencia de un heterogametismo femenino fue sugerida por el análisis de progenies (factores ligados al sexo) ; y los primeros trabajos citológicos propusieron una fórmula sexual en este sentido (Guyer, 1916). La fórmula XX (macho)/X0 (hembra) fue la más aceptada entre las propuestas, aunque se identificó erróneamente al par #1 como el cromosoma sexual (X) en *Gallus domesticus*. En 1938, Miller revisó la literatura sobre cariología aviaria y le acreditó a Susuki (1930) la primera identificación correcta del par cromosómico #5 del pollo como el cromosoma Z. Desde entonces comenzó a utilizarse la denominación Z para el cromosoma sexual en estado doble en los machos, y W para un supuesto cromosoma específico de las hembras (junto con el Z), aunque aún se encontraba instalada la controversia ZZ/Z0 vs. ZZ/ZW (revisado por Bloom, 1974). Recién en 1961, Frederic presentó la primera evidencia citológica sobre la existencia de un cromosoma W en la gallina. Estos resultados fueron confirmados posteriormente, mediante estudios radioautográficos en cromosomas de médula ósea de pollo (Schmid, 1962) , y por la identificación de un cromosoma sin homólogo en células de hembras del psitaciforme *Melopsitacus undulatus* (Rothfels et al., 1963). Adicionalmente, Ohno et al. (1964) demostraron un cromosoma W en hembras de canarios y palomas. Desde estos primeros trabajos todas las observaciones han confirmado la existencia de un mecanismo cromosómico de determinación sexual de tipo ZZ(macho)-ZW(hembra) en las aves, y no se han descrito otras fórmulas gonosómicas ni sistemas de cromosomas sexuales múltiples.

El estudio del par ZW durante la meiosis se ve dificultado debido a que la profase meiótica en la hembra, a semejanza de lo que ocurre en las hembras de los mamíferos, está restringida a un período embrionario previo a la eclosión y al desarrollo del adulto. El estudio del ZW aviario debe realizarse, por lo tanto, a partir del único ovario funcional (izquierdo) antes de la eclosión o pocos días después

de la misma. Además, como se demostrará a lo largo de esta Tesis, el reconocimiento y análisis del par ZW (meiótico) es difícil de realizar mediante los métodos citológicos usuales y utilizando microscopía de luz, debiendo recurrirse al análisis de los ejes meióticos. Por esta razón, la conducta del par sexual recién fue establecida a fines de la década del '70 mediante la observación de los ejes meióticos en ovocitos de pollo en paquitene (Solari, 1977). En éste y otros estudios posteriores se estableció la existencia de sinapsis parcial y recombinación en el par ZW de algunas aves carinadas (reseñado en Solari, 1989), lo que fue confirmado posteriormente en estudios de cromosomas plumulados (Solovei et al., 1993).

I.2. Consideraciones generales sobre el cariotipo aviario

En contraste con las descripciones relativamente completas sobre su historia natural, los estudios cariológicos en las aves se encuentran notablemente retrasados. Menos del 6% de las 9000 especies de aves han sido cariotipadas (Capanna et al., 1987), un porcentaje exiguo cuando se compara con el 18% registrado para los reptiles (Olmo, 1986) y el 40% de los mamíferos. Estas diferencias pueden atribuirse en parte a la dificultad que impone el gran número de microcromosomas, y también a la aparente monotonía del cariotipo aviario que surgió de los primeros estudios. A partir de la década del '70 se registra un gran crecimiento de los estudios citogenéticos, que puso en evidencia variantes respecto del patrón cariotípico usual. En la actualidad 27 de los 28 órdenes de la clase Aves tienen, al menos, una especie cariotipada (Capanna et al., 1987). Teniendo en cuenta estos estudios, se pueden establecer ciertas regularidades del cariotipo aviario :

- **Números cromosómicos elevados :** en el 85% de las especies cariotipadas el número cromosómico supera los 70 cromosomas, llegando a un máximo de 126 en *Upupa epops* (Coraciformes) (Capanna et al., 1987). Con pocas excepciones, hay un número elevado de microcromosomas, que representan alrededor de un 40 % del genoma (Tegelström y Rytman, 1981).
- **Patrón morfológico casi constante en algunos macrocromosomas :** en una muestra de de 112

especies el cromosoma #1 es metacéntrico o casi metacéntrico en el 90% de los casos, y en esa misma muestra, el cromosoma #3 es acrocéntrico en el 80% (Shoffner, 1974).

- Los microcromosomas son en general, acrocéntricos, como fue inicialmente demostrado mediante microscopía electrónica (Solari, 1977), y confirmado posteriormente.
- El cromosoma Z es, en la mayoría de los casos, el cuarto o quinto en tamaño, y representa aproximadamente un 7 % del genoma (lo cual fue establecido primeramente por Beçak et al , 1964).
- El cromosoma W está constituido principalmente por heterocromatina constitutiva, excepto en las Ratitae (ver Sección I.3.1).

La homogeneidad en el cariotipo puede relacionarse con el tamaño relativamente constante del genoma aviario : el contenido de ADN promedio es 2.82 ± 0.33 pg, con un rango entre 2.0 y 3.8 pg, en 135 especies de 17 órdenes (Tiersch y Wachtel, 1991). Este valor representa, aproximadamente la mitad del valor promedio de los mamíferos, y es el menor entre los vertebrados.

I.3. El par ZW en la mitosis aviaria

En las aves carinadas (no ratites), el par sexual está altamente diferenciado : el Z es un macrocromosoma mediano, el W es más pequeño y, en general, su tamaño se aproxima al de los microcromosomas. En la subclase Ratitae, de aves más primitivas, los cromosomas Z y W son casi homomórficos, y sólo pueden distinguirse por diferencias de grado variable en su tamaño (Takagi et al., 1972 ; De Boer, 1980).

I.3.1. El par ZW en las ratites

Las ratites, incluyen sólo diez especies de aves muy primitivas : el ñandú común (*Rhea americana*), la rhea darwiniana (*Pterocnemia pennata*), el avestruz (*Struthio camelus*), tres especies de kiwi (*Apteryx*), tres especies de casuario (*Casuarius*) y el emu (*Dromaius novaehollandiae*). Aunque la monofilia del grupo se ha discutido, el cariotipo de los macrocromosomas está muy

conservado en todas ellas, y los cromosomas Z y W son acrocéntricos y muy similares en tamaño (Takagi et al. , 1972 ; De Boer, 1980) (Figura 1).

Ansari et al. (1988), estudiaron en detalle el patrón de bandas G y de replicación de los pares ZW de las dos especies de ñandú y del emu. El bandeo pone en evidencia una gran homología en los cromosomas sexuales en las tres especies, siendo casi todo el cromosoma W equivalente a la región distal del brazo largo del Z (Figura 1). Los mismos autores describen al cromosoma W como eucromático y de replicación sincrónica con el Z y los macroautosomas. Todas estas características señalan el estado primitivo de diferenciación del par sexual en este grupo.

1.3.2. El par ZW en las aves carinadas

El par sexual heteromórfico del resto de las aves (carinadas) contrasta con el homomorfismo anteriormente descrito para las ratites. Este dimorfismo se mantiene casi siempre, aunque la morfología del Z y el W puede variar en diferentes taxones.

En general, el cromosoma Z ocupa el cuarto o quinto lugar por orden de tamaño. Según Belterman y de Boer (1984), el tipo primitivo de cromosoma Z habría sido acrocéntrico y del mismo tamaño que el par #4, como se observa en los Anseriformes. Esta hipótesis está sustentada por la similitud del patrón de bandas G entre el Z del pato Pekín y el de las ratites (Ansari et al., 1988) (Figura 1), al tiempo que la gran homogeneidad cariotípica en ambos grupos sugiere que el cariotipo primitivo de las aves carinadas sería similar al de los Anseriformes (Belterman y De Boer, 1984).

Este (propuesto) tipo primitivo de cromosoma Z se repite en los Galliformes, pero únicamente en la familia Megapodidae ; en los demás representantes de este orden el Z es metacéntrico o submetacéntrico, y en el género *Gallus* adquiere una banda C+ en el extremo del brazo largo (Stock y Bunch, 1982). Las derivaciones del cromosoma Z están menos claras o no han podido establecerse en otros órdenes, porque se encuentran estudiados de manera incompleta.

Aunque la morfología del Z varía entre órdenes y dentro de ellos, puede suponerse que el

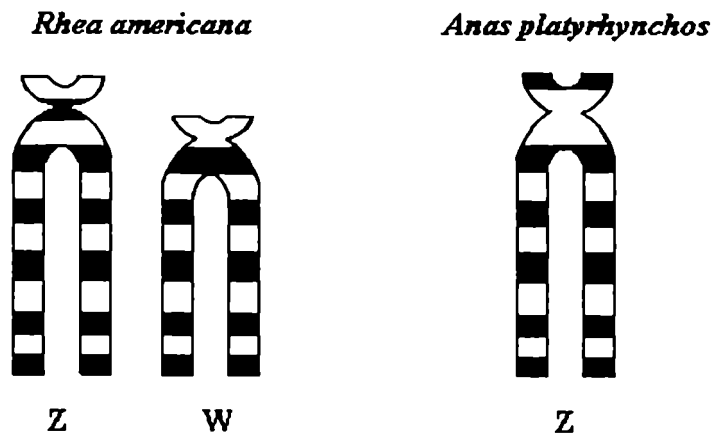


Figura 1. Patrón de bandas G del par sexual de *Rhea americana* (Ratitae) y comparación con el cromosoma Z del pato Pekín (*Anas platyrhynchos*) (Datos de Ansari et al., 1988).

cromosoma Z se ha conservado durante la evolución de la clase aves (Ohno, 1967). Esta hipótesis está sustentada por la constancia del tamaño relativo del Z en distintas especies (Beçak et al., 1964), y el mapeo conservado de genes como el IREBP y el ZOV3 en 6 especies de 5 órdenes diferentes (Saitoh et al., 1993). Sin embargo, debe hacerse notar que si bien el cromosoma Z aparece conservado entre las aves, la suposición de Ohno (1967) de que el Z aviario y el X de mamíferos son homólogos, ha demostrado ser incorrecta (Solari, 1994). Esta diferencia entre el X de los mamíferos y el Z aviario ya fue sugerida por la observación de la ausencia de replicación tardía del Z (Bianchi y Molina, 1964).

El cromosoma W de las carinadas está constituido casi en su totalidad por heterocromatina constitutiva y se replica tardíamente durante la fase S (de síntesis de ADN) del ciclo celular (Stephos y Arrighi, 1971). Sin embargo, se han descrito algunas variantes a este esquema general : en *Gyps fulvus* (Falconiformes) el brazo corto del W es completamente eucromático ; en el pollo el brazo corto del W se replica más tempranamente que el brazo largo (Schmid et al., 1989) ; y el W de *Pandion halietus* (Falconiformes) sólo tiene una banda C pericentromérica (Kohler et al., 1989).

La heterocromatina del W ha sido caracterizada únicamente en *Gallus domesticus*. Está formada por dos familias de ADN altamente repetitivo : la familia *XhoI* y la familia *EcoRI* (Tone et al. 1984 ; Kodama et al., 1987). La familia *XhoI* tiene dos unidades repetitivas principales , de 0.7 y 1.1 kb, definidas por los sitios de cortes de la enzima. Cada una de estas unidades mayores está formada por unidades repetitivas internas de 23 nucleótidos con grupos de (A)_{3.5} y (T)_{3.5} (Kodama et al., 1987). La familia *EcoRI* tiene una unidad principal de 1.2 kb, que también contiene unidades repetitivas internas de unos 21 pb. La alternancia de grupos AT en cada período de la doble hélice provoca una curvatura pronunciada del ADN, de manera similar a lo registrado en otras familias de secuencias repetitivas (Suka et al., 1993). Ambas familias ocupan alrededor del 65% del W, tienen una homología del 68% y están restringidas al género *Gallus* (Tone et al., 1984 ; Saitoh y Mizuno, 1992). Mediante hibridación *in situ* y fluorescencia (FISH) sobre los cromosomas mitóticos (Saitoh y Mizuno, 1992) y el bivalente ZW en paquitene (Solari y Dresser, 1995) se estableció que la familia *XhoI* es

pericentromérica, en tanto que la familia *EcoRI* ocupa la mayor parte del brazo largo y una parte del brazo corto.

I.3.3. Variantes morfológicas del par ZW

En la familia Accipitridae (Falconiformes), el cromosoma Z es el mayor del complemento (De Boer, 1976 ; De Boer y Sinoo, 1984), aunque no varía la proporción del genoma que representa. Esta ubicación se debe a una redistribución de material genético, desde los macrocromosomas más grandes hacia los de menor tamaño, puesto que es característico el escaso número de microcromosomas, aunque el número cromosómico total es relativamente alto (el número modal para la familia es $2n = 66$).

En *Tyto alba* (Tytonidae, Strigiformes) el cromosoma Z es el más grande, y probablemente también lo sea en *Phodilus badius*, perteneciente a la misma familia (Belterman y De Boer, 1984). Esta familia posee altos números diploides, con gran número de microcromosomas, por lo que esta variación no podría explicarse como en los accipitridos, aunque no hay mediciones cariotípicas que lo confirmen.

En las Columbiformes *Claravis pretiosa* y *Scardafella squamata* el cromosoma W es tan grande como el Z (De Lucca, 1984).

También se han registrado pares ZW inusualmente grandes en dos especies de alondras (Alaudidae, Paseriformes) : *Melanocorypha bimaculata* y *Calandrella cinerea* (Bulatova, 1973).

Por cuanto estas variantes se presentan en taxones que no están estrechamente relacionados, no se puede descartar que el número de variantes aumente a medida que se amplien los estudios citogenéticos.

I.4. El estudio de la profase meiótica y la recombinación al microscopio electrónico

El estudio de la meiosis al microscopio óptico nos permite caracterizar la homología

(observando el apareamiento cigoténico), la recombinación (número y distribución de quiasmas) y la segregación (por el análisis de los productos meióticos) en un determinado organismo. Sin embargo, no todos los materiales son igualmente favorables para proveer resultados. Así, las etapas más tempranas de la meiosis son difíciles de visualizar en la mayoría de los organismos, excepto en algunas especies con genomas muy grandes o en los que el material genético se distribuye en pocos cromosomas, como algunos insectos y anfibios o *Lilium* y el maíz, entre las plantas.

El descubrimiento de los complejos sinaptonémicos (Moses, 1956) y el advenimiento de técnicas que permiten visualizar los ejes meióticos y sus estructuras asociadas, durante la profase meiótica temprana, permitieron salvar las dificultades mencionadas, por cuanto la conducta de los ejes meióticos refleja con fidelidad la de los cromosomas correspondientes. Particularmente, en el estudio de los cromosomas sexuales, ha sido de gran utilidad poder disponer de marcadores morfológicos para el apareamiento (complejos sinaptonémicos) y la recombinación (nódulos de recombinación).

I.4.1. Descripción de la profase meiótica temprana desde el punto de vista de los ejes meióticos

El apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica está facilitado por un aparato proteínico que los mantiene yuxtapuestos : el complejo sinaptonémico (Moses, 1956). La primera manifestación de su formación es la aparición, durante el leptotene, de ejes filamentosos delgados a lo largo de cada cromosoma. Estos ejes son simples y sus extremos se orientan hacia la periferia del núcleo, uniéndose a la carioteca mediante placas de adhesión. Los extremos están separados entre sí, lo que indica que los telómeros homólogos no están sinapsados antes de la formación del complejo sinaptonémico (Moses, 1977a). El inicio del cigotene está marcado por la aparición de segmentos apareados de ejes simples, que constituyen el inicio de un complejo sinaptonémico, como consecuencia del alineamiento de los cromosomas homólogos. El paquitene comienza cuando se ha completado el apareamiento de los ejes simples. Cada complejo sinaptonémico corresponde entonces a un bivalente meiótico, y está formado por dos elementos laterales

(correspondientes a los ejes simples del leptocigotene) y un elemento central. Sobre los elementos laterales, como engrosamientos de los mismos, aparecen los cinetocoros, indicando la posición de los centrómeros homólogos. En el diplotene los complejos sinaptonémicos se disocian, los elementos laterales se hacen discontinuos, quedando remanentes axiales y del elemento central, únicamente en las regiones centroméricas y quiasmáticas (Solari, 1970a ; Solari, 1981).

I.4.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos

A cada bivalente meiótico le corresponde un complejo sinaptonémico, es decir, n = número de complejos sinaptonémicos, como fue demostrado por primera vez por Wettstein y Sotelo (1967) a partir de reconstrucciones tridimensionales de núcleos de espermatozoides de *Grillus argentinus*. Las longitudes relativas de los ejes guardan una relación con las respectivas de los cromosomas mitóticos, como fue demostrado primero en el par XY del ratón (Solari, 1970b), y esto fue confirmado para todos los cromosomas en numerosos trabajos posteriores, siendo Gillies (1972) el primer autor que produjo un cariotipo de complejos sinaptonémicos (en *Neurospora crassa*). Las reconstrucciones de cortes, aunque son sumamente informativas, son extremadamente laboriosas y lentas. Por esta razón fueron rápidamente sustituidas por las preparaciones de microextendidos de células meióticas sobre una superficie acuosa (Counce y Meyer, 1973). Mediante este procedimiento el complemento de complejos sinaptonémicos de cada núcleo puede observarse en una preparación donde está el núcleo completo (whole-mount). La técnica original se ha modificado en varias oportunidades (Solari, 1980a) y actualmente los procedimientos de sedimentación y secado (Speed, 1982 ; Croft y Jones, 1986) son ampliamente utilizados, ya que permiten obtener mayor cantidad de material para el análisis.

El procedimiento estándar para la realización del cariotipado de complejos sinaptonémicos se estableció utilizando espermatozoides de hamster chino (*Cricetulus griseus*) como material experimental (Moses, 1977 b y c; Moses et al., 1977). Esta serie de trabajos estableció la constancia de las longitudes relativas y las relaciones de brazos de los complejos sinaptonémicos, indicando así la

ausencia de distorsión física debida a la preparación. Se comprobó, además, la proporcionalidad 1 : 1 entre las longitudes relativas de cada complejo sinaptonémico y cada par cromosómico del cariotipo mitótico.

El cariotipado de complejos sinaptonémicos a partir de microextendidos se ha realizado sobre diversos materiales : espermatoцитos de insectos (Solari y Counce, 1977 ; Solari y Agopian, 1987), de mamífero (Solari, 1980a), de pollo (Kaelbling y Fechheimer, 1983) y microesporocitos de plantas (Sherman y Stack, 1992 ; Jones y d'Azkue, 1993), permitiendo su comparación con el cariotipo mitótico y los bivalentes meióticos.

En algunos casos, la relación entre el cariotipo de complejos sinaptonémicos y el cariotipo somático se aparta en grado variable de la relación directa antes mencionada. Una de las razones propuestas para explicar esta divergencia es la contracción diferencial de los bivalentes en las zonas de heterocromatina, de manera que ésta queda subrepresentada en los complejos sinaptonémicos (Moses, 1977b ; Stack, 1984 ; Solari y Agopian, 1987). En los espermatoцитos humanos la elongación de algunos bivalentes meióticos está correlacionada con la escasez de material de bandas G (cromómeros) en los bivalentes paquiténicos (Solari, 1980a).

La falta de proporcionalidad entre ambos cariotipos en casos particulares, no invalida el uso de los complejos sinaptonémicos con fines de cariotipado, estudios de rearrreglos cromosómicos o mapeo de nódulos de recombinación, siempre y cuando sean establecidas y comprendidas las relaciones con el cariotipo mitótico y otras fuentes de variabilidad cromosómico (Jones y d'Azkue, 1993).

I.4.3 Los nódulos de recombinación

Los nódulos de recombinación fueron descritos por Carpenter (1975) en ovocitos de *Drosophila melanogaster*, como estructuras fuertemente teñidas, y asociadas al espacio central de los complejos sinaptonémicos. La relación entre su presencia y los eventos de recombinación recíproca

está sostenida por evidencias amplias y variadas :

- Los nódulos de recombinación, al igual que los quiasmas, ocurren en la eucromatina, como está demostrado en *Drosophila melanogaster* (Carpenter, 1979a), *Lycopersicon esculentum* (Stack y Anderson, 1986), y *Triatoma infestans* (Solari y Agopian, 1987).
- Su presencia puede alterarse por mutaciones que afectan el entrecruzamiento, como se demostró en mutantes de *Drosophila melanogaster* (Carpenter, 1979b).
- Como los quiasmas, su frecuencia es menor cerca de los centrómeros y otros bloques de heterocromatina. En los extendidos de complejos sinaptonémicos, la ausencia de nódulos de recombinación cerca del centrómero ha sido señalada en varias especies : humana (Solari, 1980), *Zea mays* (Gillies, 1983), *Bombix mori* (Holm y Rasmussen, 1980), *Gallus domesticus* (Rahn y Solari, 1986) y *Lycopersicon esculentum* (Sherman y Stack, 1995), entre otras.
- Como los quiasmas, muestran interferencia (tema revisado en von Wettstein et al., 1984) : los nódulos de recombinación no se distribuyen al azar en las zonas de eucromatina, debido a la interferencia entre eventos de recombinación adyacentes. Así, los nódulos pueden estar altamente localizados, como en *Sordaria macrospora* (Zickler, 1977), y *Allium fistulosum* (Albini y Jones, 1988) ; o pueden distribuirse de manera más homogénea, pero apartándose sustancialmente de una distribución aleatoria, como en *Neurospora crassa* (Gillies, 1979), el hombre (Solari, 1980), *Gallus domesticus* (Rahn y Solari, 1986), el ratón (Glamann, 1986) , y otros.
- En mayoría de los organismos estudiados (más de 20 especies) las frecuencias de nódulos de recombinación y quiasmas son similares (revisado en Stack et al., 1989).

En vista de que el número y localización de nódulos de recombinación y quiasmas están bien correlacionados, puede concluirse que la descripción de su frecuencia y distribución equivale a un mapa físico de la recombinación.

I.5. La meiosis en las aves y su estudio a través de los ejes meióticos

I.5.1. La meiosis masculina en *Gallus domesticus*

La meiosis masculina del pollo fue estudiada tempranamente por varios citólogos mediante secciones de tejido gonadal de *Gallus domesticus* (Hance, 1926 ; Miller, 1938). La calidad de estos trabajos permitió establecer un número cercano a 78 para el complemento del pollo, e identificar al cromosoma Z como el quinto en tamaño. El uso de soluciones hipotónicas y de extendidos secados al aire permitió confirmar los datos anteriores y demostrar que no se observa ningún bivalente heteropicnótico, indicando que el par ZZ es eucromático durante la meiosis (Ohno, 1961 ; Pollock y Fechheimer, 1978). El número promedio de quiasmas en los seis primeros bivalentes es 28.1 ± 0.16 , y el número total de quiasmas está entre 56 y 66 (Pollock y Fechheimer, 1978).

El cariotipo de complejos sinaptonémicos para los primeros 9 bivalentes del pollo muestra una muy buena correlación con el idiograma de los cromosomas mitóticos y los bivalentes meióticos (Kaelbling y Fechheimer, 1983).

I.5.2. La meiosis femenina y el par ZW

I.5.2.1 Estudios histológicos de la ovogénesis aviaria

La ovogénesis del pollo fue estudiada por D'Hollander (1904) mediante secciones de la gonada funcional (izquierda). Este trabajo estableció que el proceso de ovogénesis ya se ha completado en el momento de la eclosión y que, a semejanza de lo que ocurre en los mamíferos, la producción de nuevas células germinales se interrumpe luego del desarrollo embrionario. Los primeros ovocitos en leptotene se observan alrededor del día 16 de incubación, y los ovocitos en paquitene alcanzan un pico máximo al día 1 después de la eclosión. Una semana después de la eclosión casi todos los ovocitos han alcanzado el período de diplotene. Como ocurre en otras especies con ovocitos muy ricos en vitelo, en las aves se desarrollan cromosomas plumulados a partir de la tercera semana post-eclosión (D'Hollander, 1904 ; Hughes, 1963).

I.5.2.2. Microextendidos de ovocitos : sinapsis y recombinación en el par ZW . Observaciones previas y su continuidad con este estudio

a) El par ZW en la meiosis de *Gallus domesticus*

La observación de microextendidos de ovocitos al microscopio electrónico permite seguir la conducta de los ejes meióticos con gran detalle. Durante el paquitene se observan 38 complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes a los bivalentes autosómicos y un bivalente asimétrico, constituido por dos ejes de distinto tamaño, pertenecientes al par ZW (Solari, 1977). La cromatina asociada al par sexual no está condensada, a diferencia de lo observado en relación al par sexual de los mamíferos (tema revisado en Solari, 1974 y 1994). La sinapsis de los ejes del par sexual comienza por un extremo (extremo sináptico) y prosigue hasta completar un complejo sinaptonémico con la longitud aproximada del eje W. La porción remanente del Z se acorta en un proceso de ajuste sináptico (igualización), al tiempo que da vueltas alrededor del W, que permanece lineal. Al final del paquitene la diferencia de longitud de ambos ejes se ha reducido notablemente y el complejo sinaptonémico formado tiene un aspecto ondulante característico (Solari, 1977 ; Solari,1992).

Durante el proceso de igualización pueden distinguirse los siguientes tipos de pares ZW, de acuerdo a las longitudes relativas del segmento libre (asináptico) del eje Z, y del segmento de complejo sinaptonémico formado entre el Z y el W (según Solari, 1992) (Figura 2) :

1. Tipo de segmento asináptico largo (LAS): la porción libre del eje Z es mayor que el 50% de la longitud del complejo sinaptonémico.
2. Tipo de segmento asináptico medio (MAS) : la longitud del eje no sinapsado del Z está entre el 10% y el 50% de la longitud del complejos sinaptonémico.
3. Tipo igualizado (I): el segmento libre es es menos que el 10% del complejo sinaptonémico, o no hay segmento libre.

Otros tipos morfológicos de pares ZW que aparecen antes o después del pico de paquitenes, son : ejes desinápticos, en los que sólo queda un segmento pequeño de CS terminal, y los ejes están

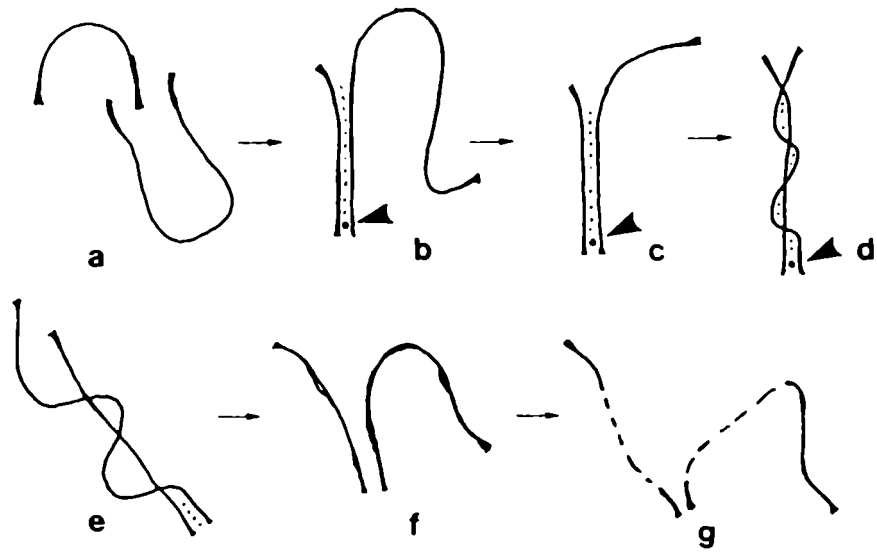


Figura 2. Cambios morfológicos en los ejes Z y W del pollo (*Gallus domesticus*) durante la profase meiótica : a) ejes Z y W separados (subtipo temprano) ; b) segmento asináptico largo ; c) segmento asináptico medio ; d) igualizado ; e) desináptico ; f) separados (subtipo tardío) ; g) ejes diplotémicos. La punta de flecha señala el nódulo de recombinación (Tomado de Solari, 1992).

cercanos entre sí en casi toda su longitud, aunque sin formar un CS ; ejes diploténicos : los ejes son discontinuos, y tienen segmentos más gruesos que los de los ejes simples del leptotene y cigotene ; y ejes separados : pueden ser tempranos o tardíos (ver más adelante).

En la Figura 2 se esquematiza el proceso de igualización del par ZW del pollo y los distintos tipos de pares ZW.

La secuencia temporal de los distintos tipos de pares ZW es : LAS-MAS-Igualizados, como se demostró observando la variación de sus frecuencias en ovocitos de distintos grupos de edad : entre 1 día antes de la eclosión y 3 días post-eclosión (Figura 3). El grupo de ejes separados disminuye hacia el día de la eclosión, desaparece el día +1 y reaparece al día +3, es decir, la frecuencia disminuye a medida que los ejes ZW se sinapsan y vuelve a aumentar cuando la desinapsis marca el final del paquitene (Solari, 1992).

La observación de un nódulo de recombinación localizado en el extremo sináptico del par ZW del pollo constituyó la primera evidencia de recombinación en el par sexual de las aves (Rahn y Solari, 1986). El nódulo de recombinación se encuentra a una distancia promedio de 0.31 μm del extremo y nunca a más de 0.65 μm del mismo, señalando un evento de recombinación obligatorio y la existencia de una región de homología próxima a los telómeros de ambos gonosomas (Rahn y Solari, 1986).

El estudio de los ejes meióticos en dos traslocaciones que involucran al cromosoma Z, y que tienen puntos de ruptura en brazos opuestos, permitió identificar los telómeros que inician el apareamiento y proporcionó evidencia en favor de la existencia de una extensa zona de sinapsis no homóloga entre el Z y el W (Solari et al., 1988). En ambos rearrreglos el W se sinapsa únicamente con uno de los productos de traslocación, por el brazo del Z que no lleva la banda C+ terminal, esto es, por el brazo corto. El brazo del W involucrado en la sinapsis es Wp, según se comprobó por la ubicación del cinetocoro, es decir, que el apareamiento de los gonosomas es específico de brazos. La naturaleza predominantemente heteróloga del apareamiento ZW, como se puede suponer por el predominio de heterocromatina en el cromosoma W, se refleja en la conducta sináptica en los ejes traslocados : a

Frecuencia de los tipos de pares ZW
(antes y después de la eclosión)

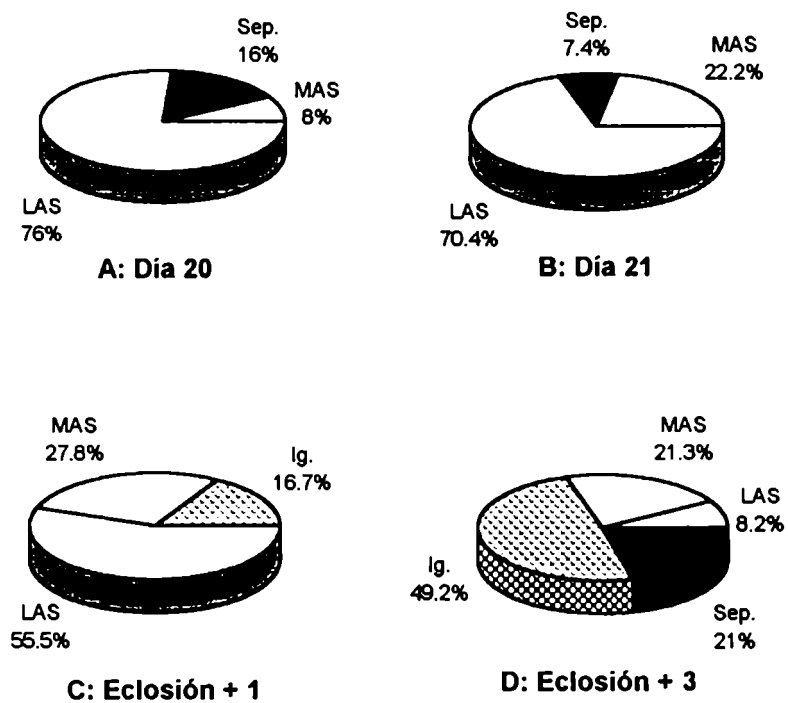


Figura 3. Frecuencia de los tipos principales de pares ZW en ovocitos de pollo pertenecientes a cuatro grupos de edad. LAS=Segmento asináptico largo; MAS=Segmento asináptico medio; Ig.=Igualizados; Sep.=Separados.

diferencia de los pares ZW normales, donde el complejo sinaptonémico se extiende en un 95% de la longitud el eje W y una porción equivalente de Zp, en las traslocaciones mencionadas la sinapsis está restringida, en promedio, al 23.5% del W y al 56% de Zp. Además, en los pares ZW normales el eje Z sigue un trayecto sinuoso en la mayor parte del complejo sinaptonémico, excepto en el extremo que lleva el nódulo de recombinación, donde la porción recta de complejo sinaptonémico no se extiende por más de 1 μm desde los telómeros sinápticos, señalando lo que constituiría la única porción homóloga de los gonosomas (Solari, 1994).

b) Sinapsis y recombinación en el par sexual de otros Galliformes

El estudio de los ejes sexuales se ha realizado también en otros Galliformes : dos especies de codornices, *Coturnix coturnix* (Solari, 1992) y *Colinus virginianus* (Hogan et al., 1992) y en la gallina de Guinea, *Numida meleagris* (Solari y Pigozzi, 1993); el análisis de *N. meleagris* se completa en la presente Tesis.

Estos estudios, y los anteriormente descritos en el pollo, permitieron establecer un comportamiento conservado del par sexual de los Galliformes consistente en :

- a. Sinapsis parcial de los ejes sexuales como un evento breve durante el paquitene temprano.
- b. Ajuste de las longitudes de los ejes hasta alcanzar un estado igualizado.
- c. Existencia de una porción de CS de posición terminal en el extremo sináptico donde se registra la presencia constante de un NR de localización restringida .

Además, el brazo del W correspondiente al extremo sináptico es siempre Wp en *Colinus virginianus* (Hogan et al.,1992) y también en *Numida meleagris*, lo cual apoya la hipótesis de la existencia de un apareamiento específico de brazos, también en estas especies (ver Resultados, p. 56).

c) El par ZW en *Anas platyrhynchos* (Anseriformes)

El orden Anseriformes constituye un grupo filogenéticamente alejado de los Galliformes, y el

cromosoma Z del pato Pekín (*Anas platyrhynchos*) es similar al de las Ratitae (Sección I.3.1). El estudio del par ZW a partir de microextendidos de ovocitos en paquitene (Solari y Pigozzi, 1993), mostró que la secuencia LAS-MAS-Igualizados, está presente también en esta especie. El eje Z del pato Pekín mide 18.6 μm en los pares LAS, o sea al inicio del paquitene, y disminuye a 14.5 μm en el tipo igualizado. En tanto, hay un cambio inverso en el eje W : su longitud aumenta desde un promedio de 8.5 μm en el tipo LAS hasta 13.3 μm en estadio igualizado (Solari y Pigozzi, 1993). Esta característica del W no puede considerarse un rasgo primitivo pues también se observa en *C. coturnix* (Solari, 1992).

La sinapsis en el par ZW de *Anas platyrhynchos* comienza siempre por el telómero del brazo largo de ambos gonosomas (fácilmente identificables por la posición de los cinetocoros en el Z subacrocéntrico y el W acrocéntrico). Cerca del extremo sináptico se observa un nódulo de recombinación a una distancia promedio de 0.69 μm del extremo (Solari y Pigozzi, 1993). Esta localización es estadísticamente diferente de la registrada en *Gallus domesticus*, aunque en el pato Pekín hay una región de 0.4 μm desde el extremo sináptico, donde no se observan nódulos de recombinación, con lo cual la región donde ocurre la recombinación no sería en realidad mayor (ver Resultados p. 53) ; el estudio de Solari y Pigozzi (1993) fue completado en la presente Tesis.

1.5.2.3. El par ZW durante el diplotene : los cromosomas plumulados

La existencia de cromosomas plumulados en el pollo ya había sido señalada a partir de secciones de tejido gonadal (D'Hollander, 1904 ; Hughes, 1963) ; pero el estudio de bivalentes aislados es relativamente reciente (Hutchison, 1987). En estas preparaciones se observan cromosomas plumulados semejantes en estructura a los descritos en reptiles y anfibios, y que corresponden a los macrocromosomas. Los microcromosomas aparecen como cromosomas plumulados en miniatura, unidos por un único quiasma de posición variable. Finalmente, el par sexual se distingue como un elemento asimétrico, que aparenta ser un univalente con la organización típica de lazos laterales

(Solovei et al., 1993). En las 6 especies analizadas por Solovei et al. (1993) (pertenecientes a 3 órdenes distintos), la porción terminal de este elemento muestra un segmento muy condensado, con unos pocos lazos laterales pequeños. En este par, el elemento con organización plumulada típica representa al cromosoma Z, y el cromosoma W es el segmento condensado ; ambos están unidos por un quiasma en la región terminal. En la región quiasmática aparecen unos lazos gigantes que constituyen una unidad de transcripción situada exactamente en el extremo de los gonosomas y cuya significación se ignora hasta el momento (Solovei et al., 1993). Estos estudios son coincidentes con la presencia de un nódulo de recombinación en posición terminal en los cromosomas sexuales durante el paquitene, como se explicó en las secciones previas.

1.6. Origen de los cromosomas sexuales heteromórficos

Los organismos con mecanismos genéticos de determinación sexual a menudo muestran cromosomas sexuales distinguibles entre sí y de los autosomas. El par heteromórfico se encuentra en uno de los dos sexos (heterogamético), que puede ser el masculino (sistemas XX/XY o XX/X0) o el femenino (sistemas ZZ/ZW). Este esquema básico se verifica en la mayoría de las especies en los grupos taxonómicos más estudiados, como los insectos y los vertebrados superiores (White, 1973). Sin embargo, existen casos en los que la diferencia entre los cromosomas sexuales es muy escasa o no aparente citológicamente, lo que condujo a la hipótesis de la existencia de cromosomas sexuales altamente diferenciados por especialización a partir de un estado homomórfico inicial. El estado dimórfico se alcanzaría mediante dos fenómenos sucesivos : la supresión de la recombinación recíproca entre el X y el Y (o Z y W), y la pérdida de función de la mayoría de los genes ligados al Y (Bull, 1983 ; Solari, 1994).

A continuación se consideran las evidencias citológicas y genéticas del proceso de diferenciación de los cromosomas sexuales en las distintas clases de vertebrados, y en las secciones siguientes se describen los modelos teóricos que permitirían explicar el modo en que se alcanza el

estado diferenciado.

I.6.1. Características generales de los heteromorfismos extremos en los vertebrados

El término heteromorfismo se refiere a la existencia de diferencias morfológicas, de contenido génico o de contenido de ADN o cromatina entre los cromosomas sexuales. Las porciones de los cromosomas sexuales que difieren en alguno de los sentidos mencionados, constituyen las regiones diferenciales ; y estas regiones no muestran intercambio genético, en contraposición a las regiones de homología, donde puede verificarse recombinación.

a) Morfología

En general, el cromosoma X (o el Z) tiene el tamaño de un autosoma mediano, mientras que el Y (o el W), es más pequeño y puede distinguirse por técnicas especiales de bandeo, que ponen en evidencia su naturaleza heterocromática. Este rasgo heterocromático está presente entre los mamíferos y las aves (Stephos y Arrighi, 1971 ; Schmid et al., 1989) ; encontrándose también en algunos reptiles (Mengden, 1981), anfibios (Schmid et al., 1988) y peces (Park y Grimm, 1981). Esta heterocromatina está formada por distintas familias de ADN repetitivo, que se han encontrado ocasionalmente en los autosomas ; esto indicaría un evento de invasión del Y por parte del ADN repetitivo, más que la transformación progresiva del ADN original en heterocromatina (Kunkel y Smith, 1982).

b) Contenido génico

La ausencia de combinaciones gonosómicas como Y0 o YY entre los organismos con gonosomas heteromórficos es el reflejo de la escasa actividad génica el cromosoma Y cuando ha alcanzado un cierto grado de diferenciación. Otra evidencia más directa, pero limitada a pocas especies, proviene de los mapas de rasgos ligados al sexo : por ejemplo, en el cromosoma X humano se han descrito unos 1000 loci (Wang et al., 1994), mientras que el Y sólo lleva una docena de genes y pseudogenes (Wolf et al., 1992). Este desbalance de dosis génica, por el cual el sexo heterogamético resulta casi monosómico para el X (o el Z), es afrontado de manera diferente en los mamíferos

placentados con respecto a los demás vertebrados. Hasta el momento, solamente se ha descrito la existencia de compensación de dosis génica en los primeros: uno de los X es inactivado facultativamente en el sexo femenino, donde forma el cuerpo de Barr o cromatina sexual (revisado por Lyon, 1992). El mismo mecanismo génico que desencadena la inactivación del X en las células somáticas femeninas se pone en marcha en los espermatocitos, donde el cuerpo XY heteropícnótico, es la expresión citológica de este fenómeno (revisión en Solari, 1974 y 1994). En las aves, el heterogametismo femenino no implica compensación de dosis en el macho. Baverstock et al. (1982) estudiaron la expresión de distintas variantes alélicas de la enzima aconitasa citoplasmática (ligada al Z), en 5 especies de aves de tres órdenes diferentes. En los híbridos entre gallina de Guinea y pollo, los machos eran heterocigotas para ambos alelos y las hembras eran hemicigóticas (expresaban uno u otro tipo enzimático). Además, la actividad de la enzima era aproximadamente el doble en el macho que en la hembra. Por lo tanto las diferencias de expresión, con respecto al sexo heterogamético, de los genes localizados en el Z no afectarían a las células masculinas en las aves. En los anfibios no hay indicios de que exista una inactivación génica que conduzca a una compensación de dosis, como lo sugiere la replicación sincrónica del par XY en *Gastroteca riobambae* (Schmid et al., 1983) y la ausencia de heteropícnosis asociada al par sexual durante la meiosis en *Oedipina uniformis* (Kezer et al., 1989).

c) Patrón de recombinación

Los cromosomas sexuales heteromórficos de los vertebrados tienen características especiales de recombinación en el sexo heterogamético: pueden mostrar restricción de la recombinación o un incremento localizado de la recombinación (en distintas regiones), o ausencia total de recombinación. En las distintas clases de vertebrados se dispone de evidencias citológicas o genéticas al respecto:

- Peces: los estudios de complejos sinaptonémicos demostraron la existencia de sinapsis e igualización en el par XY heteromórfico de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Oliveira et al., 1995). Esta conducta, similar a la del par ZW de las aves, permitiría suponer la existencia de homología parcial y recombinación restringida, también en este caso.

- Anfibios : en la salamandra *Oedipina uniformis* el apareamiento del par sexual está limitado a a una región distal de Xp e Yp, y durante el diplotene se observa claramente un quiasma subterminal (Kezer et al., 1989). El par sexual de *Gastroteca walkeri* (Anura) forma un bivalente en anillo con un quiasma en cada brazo, quedando una amplia región intersticial libre de quiasmas ; y en *G. riobambae* hay una asociación extremo a extremo durante la metafase I (Schmid et al., 1988).
- Reptiles : en los reptiles no existen datos acerca de la restricción de quiasmas en las especies con cromosomas sexuales bien diferenciados, y la tinción de plata utilizada en los estudios de complejos sinaptonémicos no permite visualizar nódulos de recombinación. Sin embargo, en *Bothrops jararaca* (Ophidia) los cromosomas Z y W se sinapsan en un extremo, probablemente por el brazo largo de ambos cromosomas y segregan en la primera anafase (Beçak y Beçak, 1981) ; y en el saurio *Scincella lateralis* el Y se sinapsa completamente con una parte del X (que es más largo) durante el paquitene (Hedin et al, 1990).
- Aves : la recombinación está muy restringida : sólo ocurre en un extremo del par ZW en todas las aves carinadas estudiadas, de acuerdo con la evidencia de localización quiasmática en los cromosomas plumulados, y la localización del nódulo de recombinación en los bivalentes en paquitene (Secciones 5.2 y 5.3).
- Mamíferos : la evidencia de restricción de la recombinación en los mamíferos es muy amplia, especialmente en los euterianos. El intercambio del par sexual está restringido a una zona con alta incidencia de recombinación en el sexo masculino, denominada región de recombinación o región pseudoautosómica (revisión en Solari, 1994). Entre los datos que han permitido determinar y caracterizar esta zona se encuentran los siguientes : los estudios de los productos de la recombinación en la metafase I de ratones XY_{sxr} (Evans et al., 1982) y los estudios de progenie correspondientes (Cattanach et al., 1982) ; la sinapsis parcial y localización de un NR en el par sexual de ratón (Glamann, 1986), varias especies de hamster (Moses, 1977a ; Solari, 1974b) y el ser humano (Solari, 1980a) ; y la presencia de un quiasma, o la asociación extremo a extremo en esas y otras especies.

Los estudios moleculares han permitido comprobar la existencia de recombinantes para secuencias estrictamente homólogas en el par XY humano (Cooke et al., 1985 ; Weissebach, 1987) y otros primates (Weber et al., 1988 ; Ellis et al., 1990), en el par XY del ratón (Keitges et al., 1985), y en tres especies de musarañas arborícolas (Toder et al., 1993).

I.6.2. Los cromosomas sexuales menos diferenciados

Entre los vertebrados se conocen muchas especies cuyos cromosomas sexuales son muy similares entre sí o no se distinguen morfológicamente. En algunos casos el patrón de herencia de rasgos ligados al sexo, como la coloración en los peces poecilidos, y la conducta meiótica, como la restricción quiasmática en algunas salamandras, han puesto en evidencia heterologías en gonosomas completamente homomórficos. Los ejemplos de cromosomas sexuales con heteromorfismos poco marcados se encuentran especialmente entre los peces, anfibios y algunos reptiles ; y pueden considerarse evidencia de transiciones que han ocurrido múltiples veces en varios taxones de vertebrados, y en forma independiente unas de otras.

- Reptiles : en el lagarto *Cnemidophorus tigris* (Teiidae), el X y el Y son casi idénticos en tamaño, pero difieren ligeramente por la posición del centrómero y por la presencia de una banda C+ pericentromérica en el X . Durante la meiosis se observan quiasmas a ambos lados de la banda C pero no alrededor de la misma o dentro de ella, es decir, la recombinación está inhibida en esta región (Bull, 1978).
- Anfibios : en las salamandras *Triturus a. alpestris* y *T. v. vulgaris*, el X y el Y difieren sólo por la presencia de una banda C terminal en el Y. En la metafase I de *T. v. vulgaris* no se observan quiasmas en el brazo que lleva la banda C, y en *T. alpestris* el 33% de las células carecen de quiasmas en ese brazo. En *T. h. helveticus*, en tanto, no hay heteromorfismo de banda C, pero durante la diacinesis el par #5 (que muy probablemente corresponda al par sexual) muestra restricción quiasmática en el brazo largo (Schmid et al., 1979). En otro urodelo, *Hydromantes italicus*, los cromosomas X e Y

difieren por una inversión pericéntrica : el cromosoma X es subtelocéntrico y el Y es submetacéntrico. Durante la meiosis los quiasmas están restringidos al brazo largo (Nardi et al., 1986).

- Peces : la existencia de recombinación restringida en los peces con cromosomas sexuales homomórficos provienen del estudio de la herencia de factores para el color ligados al sexo en *Oryzias latipes* y *Lebistes reticulatus* (revisado en Bull, 1983). En estas especies el cromosoma Y lleva el alelo dominante para la coloración y esta condición raramente varía, indicando una restricción de la recombinación en el sexo heterogamético. La viabilidad del genotipo YY (macho) en *O. latipes* (Yamamoto, 1963), verifica el estado primitivo de diferenciación en el contenido génico de los cromosomas sexuales, y la existencia de restricción de recombinación previa a la diferenciación morfológica.

I.7. Del homomorfismo al heteromorfismo : la evidencia citológica en los ofidios

La secuencia de diferenciación más completa de los cromosomas sexuales ha sido descrita en los ofidios por Beçak et al., 1964 ; Ohno, 1967 ; y Olmo, 1986, entre otros. Dentro de este taxón se reconocen tres infraórdenes (o superfamilias) : Henophidia (boidos primitivos), Scolecophidia (también considerados primitivos) y el más evolucionado, Cenophidia.

Las serpientes primitivas de los dos primeros infraórdenes tienen cromosomas homomórficos, con una excepción, *Acrantophis dumereli*, un boido en el que los cromosomas Z y W difieren por una inversión pericéntrica (Mengden y Stock, 1980). En las serpientes más evolucionadas (Colubridae, Viperidae y Elapidae), hay 124 especies que muestran cromosomas sexuales diferenciados, todas con heterogametismo femenino.

La posible diferenciación de los cromosomas sexuales en los ofidios ha sido descrita por Beçak et al. (1964) y por Ohno (1967). En todas las especies de este taxón el par sexual es el par #4, por lo que se presume que el tipo primitivo de par ZW habría sido un par #4, con centrómero mediano, presente con esa morfología en ambos sexos. De hecho, en la familia Boidae, de serpientes primitivas,

el par #4 es homomórfico en ambos sexos.

Un paso inicial en la diferenciación de los cromosomas sexuales se encuentra en en la familia Colubridae. En varias especies de esta familia, las hembras tienen un par #4 en el que los homólogos, de igual tamaño, difieren en la posición del centrómero. Mientras que el cromosoma Z retiene la morfología metacéntrica “primitiva”, el W es submetacéntrico (o subacrocentrico). Este cambio se atribuye a una inversión pericéntrica en el cromosoma W.

Esta inversión contribuiría a aislar una región del cromosoma W de la recombinación con la región homóloga del cromosoma Z, puesto que un entrecruzamiento en la región invertida produciría gametas con deleciones y duplicaciones, con una aptitud disminuida. Por lo tanto una inversión favorecería el proceso de diferenciación del W.

Un segundo paso en el proceso de diferenciación del cromosoma W se encuentra en las serpientes venenosas de las familias Crotalidae, Viperidae y Elapidae (Ohno, 1967). En estas serpientes el cromosoma W es un elemento pequeño, acrocéntrico y heterocromático. Para alcanzar esta morfología debieron ocurrir dos eventos: un enriquecimiento en heterocromatina y una disminución en tamaño. Si bien ambos fenómenos pueden estar relacionados, Ohno sugirió que la adquisición de heterocromatina es el resultado de un “deterioro génico”, que a su vez se debe al aislamiento de la recombinación, mientras que el acortamiento se debería a un entrecruzamiento accidental entre el Z metacéntrico y el W invertido. Sin embargo, no hay evidencias de que éste sea el mecanismo de disminución de tamaño del W.

1.8. La diferenciación de los cromosomas sexuales : modelos teóricos

Como se explicó en las secciones anteriores, los cromosomas sexuales carecen de recombinación a nivel de la región diferencial en el sexo heterogamético. Una de las primeras hipótesis para explicar la diferenciación de los cromosomas sexuales fue propuesta por Muller (1918). Muller supuso que inicialmente los cromosomas X e Y tenían el mismo contenido genético, excepto por un par

alélico relacionado al sexo, pero que la recombinación entre los cromosomas sexuales estaba total o parcialmente ausente. La región sin recombinación en el Y se vería en permanente estado de heterocigosis, y tendería a acumular letales recesivos o mutaciones deletéreas. Dichas mutaciones serían protegidas por los alelos funcionales en el X, los cuales recombinan en el sexo homogamético. De esta manera podría producirse un aumento continuo del número de mutaciones que escaparían a la eliminación por selección, y luego de un período evolutivo lo suficientemente largo, se habría fijado un cromosoma Y constituido mayormente por loci ocupados por alelos no funcionales. Este modelo recibió numerosas críticas, entre ellas el no prever que el X primitivo estaba expuesto también a sufrir mutaciones deletéreas, y que la tasa de mutaciones sobre el Y no es significativamente más alta que en el X o los autosomas. Por lo tanto, sería probable que mutaciones medianamente deletéreas entraran en homocigosis y fueran eliminadas por selección (Fisher, 1935 ; Nei, 1975).

En consecuencia se desarrollaron otros modelos tendientes a explicar la existencia de un Y genéticamente inerte, como el trinquete de Muller (Felsenstein, 1974, Charlesworth, 1978) y el transporte "gratuito" de genes (Rice, 1987).

1.8.1. El trinquete de Muller

Este mecanismo, propuesto en forma general por Felsenstein (1974) y aplicado a los cromosomas sexuales por Charlesworth (1978), se basa en un modelo diseñado por Muller (1964) para explicar la evolución de la recombinación genética. La idea original de Muller explicaba que el mecanismo de fijación de mutaciones ventajosas actuaría con mayor celeridad en una población con reproducción sexual que en una población en que no hubiera recombinación. Adicionalmente, el mismo autor señaló un fenómeno que causaría la acumulación de mutaciones *desventajosas* en una población sin recombinación. Este último mecanismo fue descrito por Felsenstein (1974) quien le dio el nombre de trinquete de Muller (Muller's ratchet), y fue desarrollado matemáticamente por Haigh (1978).

Muller (1964) estableció que en una población finita con reproducción asexual, cada individuo

hereda la carga completa de mutaciones (moderadamente) deletéreas presente en su progenitor, siempre que no exista retromutación o ésta sea insignificante (como usualmente lo es). Por efecto moderadamente deletéreo se entiende que el coeficiente de selección es relativamente pequeño ($s < 0.1$).

Si consideramos que las mutaciones ejercen un efecto negativo creciente sobre la aptitud individual a medida que se acumulan, en una población en equilibrio, la entrada de nuevas mutaciones deletéreas está balanceada por la eliminación selectiva de los portadores, por lo que se espera que la distribución de clases (clones) con 0, 1, 2..., etc. mutaciones permanezca constante. Sin embargo, en presencia de deriva genética, en una población relativamente grande pero finita, habrá un riesgo relativamente alto de que la clase con el número mínimo (m) de mutaciones (clase "óptima") muera o no se reproduzca. Este riesgo aumenta si la clase óptima está formada por un número bajo de individuos. Como en la población no hay recombinación, esta clase no puede volver a generarse, por lo tanto la nueva clase óptima será aquella con $(m+1)$ mutaciones, y el trinquete habrá avanzado un punto, irreversiblemente. Este proceso continúa eliminando la clase con menor cantidad de mutaciones, y por lo tanto incrementando la carga promedio de las mismas dentro de la población. El funcionamiento del trinquete depende del tamaño de la clase óptima (n_0): según Maynard Smith (1978) si $n_0 \geq 1000$ el trinquete no funciona, si $n_0 \approx 100$ se moverá lentamente, y si $n_0 \approx 10$ se moverá con bastante rapidez. La tasa de movimiento puede ser simulada en computadoras, para determinados valores de U (tasa de mutación por genoma), y de s (coeficiente de selección); y siempre que el tamaño de la población, y por extensión el tamaño de n_0 , no sea muy grande.

En la aplicación de este mecanismo a la inactivación del cromosoma Y, Charlesworth presume que el Y original es completamente activo y homólogo del X, pero no recombina con él, al menos parcialmente. Así, los loci contenidos en esta porción del Y resultan equivalentes a una población con reproducción asexual. La población de interés está constituida por los individuos que llevan el cromosoma Y (N_m), o sea, la mitad del tamaño total de la población; la tasa de mutación (U) es la correspondiente al segmento diferencial del cromosoma Y, y el coeficiente de selección (s) es el de las

mutaciones ligadas al Y (o sea, las que están en heterocigosis en los individuos XY). Con estos parámetros la ecuación para la clase óptima de los cromosomas Y es

$$n_{Y_0} = N_m e^{-U/s}$$

y este número debería ser menor que 1000 para que la clase óptima de cromosomas Y se pierda y el trinquete funcione, esto es, la tasa de mutación sobre el Y debe ser grande con respecto a la desventaja selectiva de los individuos mutados. Las estimaciones de U y s en las poblaciones reales son difíciles de obtener, por lo que la mayor parte de las evidencias en favor de la relación del trinquete de Muller y la diferenciación del cromosoma Y provienen de simulaciones en computadoras.

El funcionamiento del trinquete es, por lo tanto, muy sensible a parámetros propios de las poblaciones naturales (U y s). Rice (1987) presentó un modelo sobre el deterioro del contenido génico del Y que podría actuar simultáneamente con el trinquete de Muller, o aún funcionar cuando no se dieran las condiciones para este último.

I.8.2. Modelo del transporte gratuito de genes

Este mecanismo presupone las mismas condiciones que el trinquete para funcionar : una población finita, en la que la mitad de los individuos llevan el cromosoma Y, U es la tasa de mutación por cromosoma Y, y s es la desventaja selectiva de una mutación expresada en el estado heterocigótico.

En estas condiciones, la aparición de un alelo favorable sobre el Y ocurriría solamente en baja proporción, y raramente coincidiría con la clase óptima (con el mínimo número de mutaciones moderadamente deletéreas). Si este alelo favorable surge dentro de una clase no óptima, su frecuencia se incrementaría rápidamente porque la selección sobre los cromosomas Y es equivalente a la selección en una población haploide. De esta manera se favorecería la fijación de un tipo particular de cromosoma Y que, muy probablemente, no será el de la clase óptima. Hay dos consecuencias asociadas a este proceso : 1) produce un incremento en la frecuencia de cromosomas Y cargados con

un número mayor de mutaciones y, 2) provoca la fijación de un determinado conjunto de mutaciones dentro de la diversidad presente en la población de cromosomas Y. Este grupo de mutaciones de efecto moderadamente deletéreo ha recibido un impulso (hitch) en su acumulación como consecuencia del aumento en la frecuencia y la fijación del alelo beneficioso. El alelo beneficioso, de cierta manera, “transporta” consigo las mutaciones deletéreas adyacentes, de donde proviene el nombre de “transporte gratuito” (hitchhiking) (Rice, 1987).

Como el mismo Rice (1987) destaca, el principal mecanismo de acumulación de genes deletéreos sobre el Y es probablemente el trinquete de Muller. El transporte de genes acelera la tasa de acumulación en presencia del trinquete, facilita la fijación de mutaciones ligadas al Y y, finalmente, permite explicar el deterioro en los cromosomas Y con segmentos no recombinantes demasiado pequeños como para que actúe el trinquete.

1.9. Origen de los mecanismos de restricción de la recombinación

El trinquete de Muller y el transporte de genes propuestos para explicar la inactivación del cromosoma Y suponen la ausencia previa de recombinación, total o parcial, entre los cromosomas sexuales. La recombinación podría ser restringida por factores genéticos o por rearrreglos estructurales, y resulta difícil evaluar la importancia o el orden de precedencia de estos dos mecanismos. Por ejemplo, la fijación de una diferencia estructural en el par sexual significa que el intercambio ha sido suprimido, pero el rearrreglo podría ser la consecuencia y no la causa de la restricción de la recombinación. Experimentalmente, resulta problemático determinar el grado de intercambio en los cromosomas sexuales homomórficos, puesto que ya de por sí es difícil de identificar al par sexual. Las observaciones en las salamandras del género *Triturus* (Schmid et al., 1979), apoyan la idea de que la supresión de la recombinación puede desarrollarse en ausencia de rearrreglos cromosómicos. Aunque la evidencia experimental es escasa, se reconocen dos situaciones en las que la selección promovería la restricción de la recombinación: 1) La aparición de genes sexualmente antagónicos sobre los

cromosomas sexuales, y 2) la existencia de más de un gen determinante de sexo en los gonosomas.

En los modelos teóricos formulados al respecto, los cromosomas sexuales, por definición, difieren solamente para un único locus determinante del sexo (x, y), donde x e y son alelos diferentes para la determinación sexual, que se mantienen en heterocigosis en el sexo heterogamético (XY) y en homocigosis en el sexo homogamético (XX).

I.9.1. Genes sexualmente antagonistas

Los genes sexualmente antagonistas son aquellos que en su expresión resultan ventajosos en un sexo pero perjudiciales en el otro. El ejemplo mejor documentado es el de los genes para el color, ligados al sexo en los peces poecilidos. (Kallman, 1970 ; Endler, 1980). En las poblaciones naturales, las coloraciones brillantes en estos peces resultan desventajosas pues aumentan la tasa de predación. Sin embargo, en los machos esta desventaja está balanceada por el aumento del éxito reproductivo de los individuos con colores brillantes y, en consecuencia, por la mayor probabilidad de dejar descendencia. En este caso la selección favorecería el ligamiento estrecho de los genes para el color al alelo y , asegurando con ello la transmisión a la descendencia masculina.

El estudio formal de la supresión del entrecruzamiento en el par sexual por la incorporación de genes antagonistas fue realizado por Rice (1987). El autor considera una población con reproducción sexual y heterogametismo masculino, con cromosomas sexuales no diferenciados excepto en el locus de determinación del sexo (x, y). En un segundo locus (A), inicialmente monomórfico para el alelo A_1 con igual influencia en ambos sexos, surge por mutación otro alelo (A_2) que produce un incremento S en la aptitud de los machos cuando está en homocigosis y un incremento hS cuando está en heterocigosis. En la hembra el alelo A_2 disminuye la aptitud en una cantidad T (homocigosis) o hT (heterocigosis). Cuando $T = 1$ (es letal) en las hembras, y el locus considerado es completamente dominante y está a una distancia R (en unidades de recombinación) del locus de determinación sexual, la frecuencia en el equilibrio de los cromosomas Y que llevan la combinación $y-A_2$ se calcula según la

siguiente ecuación :

$$f(y-A_2) = 1 - R / S(1-R)$$

Es decir, que el alelo A_2 , cuando es letal en las hembras, puede acumularse, aunque la ventaja conferida a los machos no sea muy grande ($S = 0.2$ a 0.02) (Rice, 1987). Cuanto mayor sea la ventaja que proporcione el nuevo alelo a los machos, tanto menor será el ligamiento requerido entre A_2 y el alelo y .

Según Rice (1987), con una ventaja selectiva de 0.1 a 0.05, una parte significativa del cromosoma sexual podría incorporar nuevas mutaciones antagonistas dominantes. Si la reducción de la recombinación en la zona adyacente al locus de determinación del sexo fuera favorecida por la selección natural, esto reduciría la tasa de recombinación entre este locus y genes más distantes. Esta reducción en la tasa de recombinación promovería la acumulación de genes sexualmente antagonistas que, a su vez, producirían selección hacia una restricción de recombinación mayor en una “reacción en cadena”, que ampliaría esta restricción al resto de la longitud del par sexual, o hasta que la longitud que todavía recombina no sea lo suficientemente grande como para generar variación genética suficiente para rasgos antagonistas.

1.9.2. Factores múltiples de determinación del sexo

Este modelo fue propuesto por Charlesworth como un primer paso en la evolución de los cromosomas sexuales en plantas dioicas. Partiendo de un estado cosexual, la evolución hacia el dioicismo requiere al menos dos mutaciones : una que provoque el paso hacia el sexo femenino, y otra hacia el sexo masculino. Una consecuencia de la aparición de hembras primitivas en una población de individuos cosexuales sería el aumento del valor de los machos. Sin embargo, si ocurriera una mutación hacia el sexo masculino (esterilidad femenina) en una hembra primitiva, provocaría esterilidad individual, o sería eliminada por selección si el alelo mutante fuera transferido por

recombinación a un genoma femenino. Por lo tanto, la mutación que provoque esterilidad femenina sería favorecida sólo si estuviera estrechamente ligada al locus de masculinidad normal. Una vez que ambas mutaciones estuvieran presentes en la población, la selección favorecería la restricción de la recombinación entre estos loci. Este modelo implica que el primer paso en la evolución de los cromosomas sexuales involucra la restricción de la recombinación entre los genes que controlan funciones sexuales opuestas, más que una restricción amplia a lo largo de todo el par sexual. Adicionalmente, con la diversificación que se produce en el proceso evolutivo podrían agregarse nuevos factores involucrados con las funciones sexuales, lo que conduciría a una ampliación de la zona de restricción de la recombinación.

I.9.3. Genes modificadores de la recombinación

Otro modelo relacionado con el origen de la reducción de la recombinación en el par sexual fue propuesto por Nei (1969). Este modelo está basado en dos genes (A y B, con los alelos recesivos a y b), que determinan el sexo de un individuo, y un factor "modificador" (M, con el alelo recesivo no funcional m), que regula (disminuye) la recombinación entre los dos genes determinantes de sexo. Si se considera que los individuos homocigotas para uno de los factores sexuales y heterocigota para el otro son intersexos estériles, que el alelo M en dosis única anula la recombinación entre A, B y M, y que las frecuencias iniciales de estos genes en la población son igualmente bajas, entonces el genotipo gamético A-B-M aumenta mucho más rápido que el genotipo a-b-M, y el reductor de la recombinación M permanecerá predominantemente ligado a los genes A y B (masculinos) mientras que el alelo recesivo m permanecerá ligado preferencialmente a los alelos a y b. En el caso extremo de que el alelo M sólo esté desde el inicio ligado a la combinación A-B, la restricción de la recombinación estará presente exclusivamente en el sexo heterogamético. Nei concluye que siempre que existe restricción de la recombinación en el par sexual hay más de dos genes determinantes del sexo. Esta observación puede extenderse al caso en que existan varios genes involucrados en la fertilidad de un sexo, y

localizados en el mismo cromosoma portador del (o los) genes determinantes del sexo.

I.9.4. Aplicabilidad de los modelos teóricos

Todos los modelos descritos más arriba han sido construidos mediante los métodos de la genética de poblaciones. Varios de estos modelos han sido repetidamente probados en programas de computación, resultando ser efectivos, en especial el trinquete de Muller. En algunos casos, se han logrado evidencias experimentales en poblaciones naturales, que apoyan un modelo (Rice, 1991 ; 1994). Más allá de su plausibilidad, estos mecanismos teóricos no son mutuamente incompatibles sino que pueden operar simultánea o coordinadamente, por lo cual todos ellos son posibles de ser aplicados al proceso de diferenciación de los cromosomas sexuales.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. El material de estudio

Para realizar el presente trabajo de Tesis se estudiaron citológicamente 5 especies de la clase Aves : ñandú, *Rhea americana* (Reiformes) ; pato Pekín, *Anas platyrhynchos* (Anseriformes) ; gallina de Guinea, *Numida meleagris* (Galliformes) ; paloma, *Columba livia* (Columbiformes) y pinzón cebrado, *Poephila* (= *Taeniopygia*) *guttata* (Paseriformes). Todas las especies estudiadas provenían de criaderos, excepto los ejemplares de *R. americana*, procedentes de poblaciones naturales de Gral. Campos, provincia de Entre Ríos.

En todos los casos se estudió el cariotipo somático al microscopio óptico y la meiosis femenina al microscopio electrónico, y también con microscopía de luz. Los cromosomas mitóticos se obtuvieron a partir de cultivo de linfocitos de ejemplares adultos (Sección 2.1) o mediante cultivos cortos de médula ósea (Sección 2.2) de los ejemplares utilizados para estudiar la meiosis. El análisis de la meiosis al microscopio electrónico se realizó mediante el procedimiento de extendidos en superficie (Sección 3.1) en *A. platyrhynchos* y *N. meleagris*; en las otras especies se usó, principalmente, la técnica de sedimentación y secado (Sección 3.2). Las preparaciones obtenidas con cualquiera de las dos metodologías pueden colorearse con nitrato de plata, que permite ver los complejos sinaptonémicos y los cinetocoros, o con ácido fosfotúngstico, que además muestra los nódulos de recombinación.

El inicio de la meiosis en el sexo femenino no es sincrónico en todos los ovocitos (Hughes, 1963) por lo cual existe un momento del desarrollo en que se encuentra la frecuencia máxima de ovocitos en paquitene. Para estudiar la sinapsis de los ejes y los nódulos de recombinación es necesario determinar este período, y esto es especialmente crítico cuando se utiliza la técnica de extendidos en superficie, ya que gran parte del material se pierde al realizar las preparaciones.

A continuación se resumen los estudios realizados en cada especie y la metodología utilizada en cada caso.

- *Rhea americana*

Los huevos se retiraron de nidadas naturales una semana antes del día de la eclosión, y se mantuvieron a 37°C, con un 80-90 % de humedad. Las micrografías electrónicas analizadas corresponden a 9 hembras entre el día 7 y el día 1 antes de la eclosión, encontrándose el pico máximo de paquitenes entre los días 6 y 7 antes de la eclosión. El ovario de una hembra en el día de la eclosión se analizó al microscopio óptico, en preparaciones coloreadas con Giemsa (Sección 2.3). Los especímenes que fueron analizados en profundidad con microscopía electrónica y microscopía de luz, y que se describen en esta Tesis, corresponden a un total de más de 100 embriones analizados a lo largo de los años 1993-1996.

- *Anas platyrhynchos*

Para encontrar el momento de mayor frecuencia de ovocitos en paquitene se estudiaron 10 hembras entre 48 horas antes de la eclosión y tres días después de ella, ubicándose el pico máximo 48 horas antes de la eclosión.

- *Numida meleagris*

Se estudiaron 10 hembras en el día de la eclosión que coincide con el pico máximo de paquitenes, y el ovario se procesó según la técnica de extendidos en superficie. Los cromosomas mitóticos se obtuvieron mediante cultivo de linfocitos de un ejemplar adulto.

- *Columba livia*

La meiosis femenina en la paloma se analizó en profundidad en dos ejemplares de entre cuatro y siete días después de la eclosión, seleccionados entre cuatro ejemplares. En ambos casos se encontraron numerosos ovocitos en paquitene, acompañados de estadios tempranos de la profase (cigotenes) en el ejemplar más joven y de estadios tardíos (diplotenes) en el segundo ejemplar. En esta especie también se estudió la meiosis masculina al microscopio óptico (Sección 2.3) y al microscopio electrónico en tres ejemplares adultos, a fin de comparar la recombinación en ambos sexos mediante la observación de los nódulos de recombinación en machos y hembras, y de los quiasmas en el macho.

- *Poephila guttata*

La meiosis femenina se estudió en cinco hembras entre los días 4 y 10 después de la eclosión, encontrándose numerosos ovocitos en paquitene en todos los casos. En dos hembras se estudió la meiosis femenina al microscopio óptico. A fin de comparar la conducta de un cromosoma accesorio en las líneas germinales de ambos sexos (ver Resultados) se analizó también la meiosis masculina al microscopio óptico y al microscopio electrónico en tres ejemplares adultos. La gonada masculina fue estudiada, además, en cortes semifinos con el microscopio óptico (Sección 2.5).

II.2. Microscopía óptica

Los estudios de microscopio óptico están divididos en : estudio de los cromosomas mitóticos y de la división meiótica femenina (profase I) y masculina (meiosis I y II), según se detalló por especie en la sección anterior.

II.2.1. Cultivo de linfocitos

Se realizaron siguiendo la técnica descrita por Belterman y De Boer (1984), con algunas modificaciones.

Medio de cultivo

RPMI 1640	5 ml
Suero fetal bovino	1 ml
Fitohemaglutinina M (Sigma)	0.2 ml (concentración final = 8 µg/ml)

Solución hipotónica

Cloruro de potasio 0.075 M

Fijador

Alcohol metílico (3 partes) : ácido acético glacial (1 parte). Preparar en el momento y usarlo frío.

- Entre 1 y 2 ml de sangre se extrajeron de la vena del ala utilizando jeringas heparinizadas, estériles.

La jeringa se dejó en posición vertical entre 5 y 24 horas y el plasma con los leucocitos fue transferido al medio de cultivo evitando el paso de los glóbulos rojos.

- El cultivo se realizó a 38-39°C durante 72 horas, en frascos de vidrio de 50 ml de capacidad.
- Dos horas antes del sacrificio del cultivo se adicionaron 0.05 ml de colchicina (Sigma), a una concentración final de 0.01 µg/ml. Los cromosomas aviares son muy sensibles a la colchicina, y se contraen fácilmente imposibilitando el estudio de los macrocromosomas. Por esta razón las dosis de colchicina utilizadas son unas 10 veces menores que las recomendadas en los mamíferos.
- El material se transfirió a tubos cónicos de centrifuga y se centrifugó a 700 rpm, en una centrifuga de mesa (diámetro del rotor = 15 cm).
- Luego de descartar el sobrenadante se adicionaron entre 5 y 7 ml de solución hipotónica a 37°C, dejándose actuar durante 10 minutos.
- Se repitió la centrifugación y luego de descartar el sobrenadante, el material se fijó dejando caer el fijador gota a gota, mezclando suavemente con una pipeta para evitar que los eritrocitos formen grumos.
- Después de un cambio de fijador las preparaciones se hicieron goteando el material sobre portaobjetos enfriados en hielo, y secando al calor del mechero, sin flamear.

Las preparaciones así obtenidas se colorearon durante 5 minutos con solución de Giemsa al 3%, (en buffer fosfato pH = 7), o se guardaron sin colorear, a temperatura ambiente, durante una semana (para hacer bandas C) o al menos dos semanas (para bandas G).

II.2.2. Cultivos cortos de médula ósea

La médula ósea se extrajo del fémur o los huesos del ala, inyectando solución de Hanks con colchicina (0.01 µg/ml) a través de la cavidad medular. Luego de resuspender el material para desagregar el tejido, se incubó a 37°C durante una hora. Los pasos siguientes, desde la hipotonía, se realizaron como en el cultivo de linfocitos.

II.2.3. Bando G y C

Bandas G

Se realizaron sobre cromosomas obtenidos por los procedimientos antes descritos, dejando secar las preparaciones a temperatura ambiente durante al menos dos semanas. Las bandas se obtuvieron sumergiendo los preparados en una solución de tripsina (Gibco) al 0.1 % en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} (pH 7) durante 11 a 15 segundos y coloreando con Giemsa al 3 % en buffer fosfato, pH = 7.

Bandas C

Las bandas C se obtuvieron utilizando el método de Sumner (1972) con algunas modificaciones. Las preparaciones se trataron con HCl 0.2 N por 20-30 minutos, y luego con hidróxido de bario (solución saturada en agua bidestilada), a 50°C, durante 1 a 2 minutos. Los portaobjetos se lavaron con un pasaje rápido en HCl 0.2 N, y luego con abundante agua destilada. Seguidamente se incubaron durante una hora en SSC 2 x, y luego de lavar rápidamente con agua destilada, se colorearon con Giemsa al 4 % durante 15 minutos.

Las metafases apropiadas, con los cromosomas bien dispersos y elongados se fotografiaron en un fotomicroscopio Leica DMRB, utilizando película Kodalith (25 ASA), y filtro verde para aumentar el contraste.

II.2.4. Extendidos secados al aire para la observación de células meióticas (Técnica de Evans)

Las preparaciones de ovario y de testículo para microscopía óptica se realizaron utilizando la técnica descrita por Evans et al. (1964), para la observación de espermatocitos de ratón. A continuación se describe el procedimiento empleado con el testículo de ave :

- Disecar la gonada removiendo la túnica albugínea y colocar parte de los túbulos seminíferos (entre 0.5 y 1 cm³) en una placa de Petri con solución isotónica (2.2 %) de citrato de sodio a temperatura ambiente.

- Cortar los túbulos seminíferos con tijeras finas para liberar las células del epitelio, pipetear suavemente y dejar sedimentar inclinando la placa. Con una pipeta tomar la suspensión celular, descartando el sedimento que contiene los restos más grandes de tejido testicular, y transferir a un tubo cónico de centrifuga.
- Centrifugar durante 5 minutos a 700 rpm, descartar el sobrenadante y agregar 7-10 ml de solución hipotónica (citrato de sodio 1 %). Dejar durante 20 minutos a temperatura ambiente (20°C)
- Centrifugar, retirar el sobrenadante y fijar cuidadosamente con metanol : ácido acético glacial (3 : 1), frío, recién preparado.

II.2.5. Cortes semifinos

Para cortes finos y semifinos (para microscopía electrónica y de luz), el material se fijó en glutaraldehído al 2.5 % (Pelco Scientific) en buffer cacodilato de sodio 0.1 N (pH 7) durante 2 horas, y luego fue postfijado en tetróxido de osmio al 1 % por 1 hora, lavado, incluido en Maraglas y cortado en un ultramicrotomo Porter-Blum. Los cortes semifinos (de 0.5 a 1 μm de espesor), preparados de esta manera, se colorean con azul de toluidina al 1 % alcalino (en carbonato de sodio al 1 %), a 50°C durante 20 a 30 segundos, se lavan y se examinan con objetivo de inmersión.

Los cortes finos (0.08 a 0.06 μm de espesor) se colorean primero con acetato de uranilo en solución saturada en metanol por 5 minutos, se lava con etanol y luego se tiñen con citrato de plomo (técnica de Reynolds).

II.3. Microscopía electrónica

II.3.1. Técnica de extendidos en superficies líquidas

Esta técnica, desarrollada inicialmente por Counce y Meyer (1973), está basada en la ruptura celular mediante un choque hipotónico sobre la superficie de una solución salina diluida. Al procedimiento original le siguieron varias modificaciones, que mejoraron sustancialmente la calidad de

las preparaciones ; la descripción que sigue es el procedimiento estándar para ovocitos de ave (Rahn y Solari, 1986).

Portaobjetos con membrana plástica

- Disolver 0.5 gr. de plástico Falcon Optilux en 100 ml de cloroformo puro, al menos durante 12 horas.
- Sumergir portaobjetos limpios, previamente examinados con microscopio de contraste de fase a 400 x para descartar los que tengan superficie irregular, retirar en seguida y dejar secar en estufa a 60°C durante unos minutos. Evitar la humedad en todo momento.
- Antes de ser utilizados, los portaobjetos deben ser ionizados sometiéndolos a una descarga de 2000 voltios, al vacío (1-2 Torr), durante unos 40 segundos. Este procedimiento es imprescindible para lograr la extensión de los núcleos en las técnicas de sedimentación y secado.

Soluciones

En todas las soluciones se emplea agua destilada, preferentemente de destilador de vidrio y cuyo pH no sea < 5. Como indicador de pH para todas las soluciones se utiliza rojo fenol (100 µg/l).

- Solución hipotónica : NaCl 0.5 % p/v.
- Fijador : paraformaldehído, 4 % a pH 8, ajustado con buffer de borato de sodio. Inmediatamente antes de usar agregar dodecilsulfato de sodio (concentración final 0.03 % p/v).
- Solución de detergente : Photoflo 0.4 % a pH 8, ajustado con buffer de borato.

Extendidos

- Disecar el ovario y colocarlo en solución de Hanks a temperatura ambiente. Bajo lupa eliminar el tejido graso que lo acompaña y cortar el ovario en tres partes.
- Macerar con suavidad una de las partes entre los extremos de dos portaobjetos esmerilados con una gota de solución de Hanks.
- Con la punta de los portaobjetos tocar la superficie de solución hipotónica colocada en una placa de teflon con cavidades (Pelco #14501). Previamente limpiar cuidadosamente la superficie acuosa con

papel para lentes.

- Dejar dispersar aproximadamente un minuto y luego apoyar un portaobjetos con membrana sobre la superficie que contiene el material.
- Retirar el portaobjetos verticalmente, y colocarlo en un frasco de Coplin con la solución fijadora durante 5 minutos.
- Colocar el preparado, sin secar, en otro frasco de Coplin con Photoflo durante 1-2 minutos, retirar y dejar secar. El detergente es esencial para preservar las estructuras, por su efecto de disminución de la tensión superficial durante el secado.

Tinción con nitrato de plata (Howell y Black, 1980)

Colocar 2 gotas una solución de nitrato de plata (al 50 % en agua bidestilada), agregar una gota de gelatina (gelatina al 2 % = ácido fórmico 1 %), y cubrir con un cubreobjetos. Colocar sobre una placa térmica a 40°C hasta que la preparación se vuelva color marrón dorado. Quitar el cubreobjetos sumergiendo la preparación en agua destilada y lavar cuidadosamente.

Tinción con ácido fosfotúngstico (PTA) : coloración de los nódulos de recombinación

Esta coloración debe realizarse inmediatamente después del secado para obtener buen contraste de los complejos sinaptonémicos y los nódulos de recombinación. Solución de PTA : ácido fosfotúngstico al 4 % en agua bidestilada, filtrar y guardar en heladera. Antes de usar agregar 3 partes de alcohol etílico absoluto a una parte de solución de PTA. Colorear durante 10 minutos y hacer dos pasajes de lavado de 5 minutos en alcohol etílico absoluto.

Transferecia del material a las grillas de microscopía electrónica

Las preparaciones secas deben examinarse con microscopio de contraste de fase a 400 x para verificar la calidad de los extendidos. Para despegar la membrana plástica se raspa el borde del portaobjetos con una hoja de afeitar, y se apoya un extremo en la superficie de un recipiente lleno con agua destilada. En las preparaciones recientes la membrana se despegar con relativa facilidad y queda

flotando en el agua. Las grillas (Pelco GC100), se tratan con una solución adhesiva (poliestireno 0.01 % en benceno) y se colocan sobre la membrana utilizando pinzas finas. Cubrir las grillas con un trozo de Parafilm, cuidando que no se formen burbujas, retirar el Parafilm con la membrana y las grillas adheridas y dejar secar. Marcar el contorno de las grillas con la punta de una pinza fina, retirar una a una las grillas y colocar sobre un portaobjetos. Los núcleos más adecuados para el examen al microscopio electrónico pueden entonces seleccionarse al microscopio óptico, señalando su ubicación con ayuda de la marca central de las grillas.

Alternativamente, pueden realizarse preparaciones en portaobjetos sin membrana y colorearlas con nitrato de plata ; luego se cubren con la membrana plástica como ya se describió. El material queda entonces entre el vidrio y la capa plástica. La recuperación del material obtenido de esta manera, se realiza despegando la membrana plástica que se lleva los núcleos celulares depositados sobre el vidrio. El proceso se facilita utilizando una solución de ácido fluorhídrico al 1 % para separar la membrana, pasando luego al agua para hacerla flotar. El procedimiento continúa con la colocación de grillas, como se describió antes.

II.3.2. Técnica de sedimentación y secado

Esta técnica consiste en la sedimentación del material celular sobre portaobjetos cubiertos o no con membrana plástica, luego del tratamiento del tejido gonadal con un buffer de extracción (Speed, 1982 ; Croft y Jones, 1986). Las condiciones que se describen a continuación son las estándar para el material de ovario de ave, y se aplicaron también a material testicular con algunas modificaciones que se detallan al final.

Soluciones

- Fijador : paraformaldehído (PFA) 4 % en agua desionizada, a pH 8.5, ajustado con buffer borato + Tritón X-100 (concentración final 0.13 %)

- Buffer de extracción e hipotonía :

1 ml	Tris-HCl 600 mM	pH 8.2
2 ml	sacarosa 500 mM	pH 8.2
2 ml	citrato de sodio 170 mM	pH 8.2
0.238 ml	EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	pH 8.2
14,56 ml	agua desionizada	

- Sacarosa 100 mM, pH 8.2 ajustado con buffer borato.

Extendidos

- Diseñar el ovario y colocarlo en solución de Hanks a temperatura ambiente, luego de quitar el tejido circundante cortarlo en tres partes y pasarlos al buffer de extracción durante 30 minutos.
- Macerar cada trozo entre dos vidrios esmerilados añadiendo una gota de sacarosa 100 mM, agregar más sacarosa hasta que la suspensión celular sea apenas opalescente.
- Colocar los portaobjetos ionizados en posición horizontal en una cámara húmeda y cubrirlos con fijador.
- Dejar caer 2 o 3 gotas de la suspensión que deberán esparcirse inmediatamente en el fijador.
- Dejar secar en la cámara semicerrada durante 2 a 3 horas.
- Una vez secas las preparaciones se pasan por Photoflo 0.4 %, y pueden colorearse con PTA o nitrato de plata.

Para la aplicación de la técnica al material testicular se aumentó la concentración del Triton X-100 del fijador, a 0.2 %, y las preparaciones se dejaron secar durante 5-6 horas.

Las grillas se observaron en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, y los núcleos se fotografiaron con aumentos entre 500 x y 5000 x, utilizando película plana Scientia (Agfa-Gevaert).

II.4. Mediciones y tratamiento estadístico de los datos

Medición de los cromosomas mitóticos

Las mediciones de los cromosomas mitóticos se realizaron sobre fotografías de placas

metafásicas a una ampliación final de aproximadamente 3.000 x. Se escogieron placas metafásicas con cromosomas bien dispersos y en los que se observara la posición del centrómero. Las longitudes relativas se calcularon dividiendo la longitud de cada par cromosómico por la longitud total del lote haploide. Estas mediciones se efectuaron únicamente para los cromosomas #1 a #7 y el par ZW porque los cromosomas de menor tamaño, en general, no pueden agruparse por pares en las metafases mitóticas. De esta manera, la división entre macrocromosomas y microcromosomas se estableció, en este trabajo, a partir de la posibilidad de distinguir a los primeros en pares individuales, en un ordenamiento por tamaño decreciente.

Medición de los ejes meióticos y distribución de los nódulos de recombinación

Los ejes meióticos se midieron sobre micrografías con aumentos finales variables entre 6000 y 12000 X, utilizando un curvímetro HCHB o mediante una placa de digitalización (Sigma Scan, Jandel Sci. Co.). El análisis estadístico de los datos, y los gráficos se realizaron utilizando los programas Stata (Computing Resource Center, Ca) o Microsoft Excel 4.0. Las longitudes relativas se calcularon dividiendo la longitud de cada par cromosómico por la longitud total del complemento de CSs. Las longitudes relativas de los ejes Z y W utilizadas para realizar los idiogramas de complejos sinaptonémicos, fueron las de los ejes separados o de pares ZW en estadio de segmento asináptico largo (ver Introducción sección I.5.2), ya que representan las longitudes originales de los cromosomas meióticos, antes de que progrese la igualización.

El recuento y análisis de la distribución de los NRs en los CSs autosómicos se realizó sobre micrografías electrónicas con aumentos finales entre 6.000 x y 9.000 x coloreadas con PTA. Los histogramas de distribución de los NRs en cada CS se construyeron midiendo la distancia entre cada NR y el cinetocoro del bivalente. Cada histograma representa un bivalente cuya longitud normalizada se ha dividido en intervalos de 1 μm para los cuales se registra el número de NRs observados en el total de núcleos analizados. La normalización de la longitud promedio de los bivalentes es necesaria, porque hay una variación de la longitud absoluta de los CSs entre los distintos núcleos en paquitene, y

se calcula multiplicando la longitud relativa promedio de cada bivalente por la longitud absoluta promedio (en μm) del complemento de complejos sinaptonémicos.

III. RESULTADOS

III.1. *Rhea americana*

El análisis citogenético en esta especie comprendió el estudio del cariotipo somático y la meiosis femenina (al microscopio óptico y al microscopio electrónico) ; los resultados correspondientes se tratarán en el siguiente orden :

- a) Análisis del cariotipo mitótico : mediciones, identificación del par sexual, bandeo C.
- b) La profase meiótica al microscopio óptico : identificación y cuantificación de los distintos estadios en el momento de la eclosión.
- c) Análisis de los ovocitos en paquitene al microscopio electrónico : cariotipado de complejos sinaptonémicos (CSs).
- d) Conducta del par ZW durante el paquitene : sinapsis y recombinación.
- e) Distribución de nódulos de recombinación.

III.1.1. El cariotipo somático

III.1.1.1. Mediciones del cariotipo somático

El análisis de los cromosomas mitóticos se realizó sobre 65 microfotografías de preparaciones coloreadas con Giemsa (Figura 4). La metodología de medición se explica en la sección II.4 de Materiales y Métodos. En ningún caso se encontró un número diploide superior a 80, aunque los recuentos inferiores fueron frecuentes. Estas variaciones son comunes en la determinación de los números cromosómicos de las aves, lo que exige escoger únicamente placas metafásicas con cromosomas bien extendidos para asegurar un mínimo de superposiciones (que suelen ocultar a los microcromosomas). El número cromosómico determinado mediante el recuento de cromosomas mitóticos fue $2n = 80$, lo cual se confirmó a partir del estudio de los CSs al microscopio electrónico (ver más adelante).

La Tabla 1 resume las medidas obtenidas a partir de 12 microfotografías escogidas por

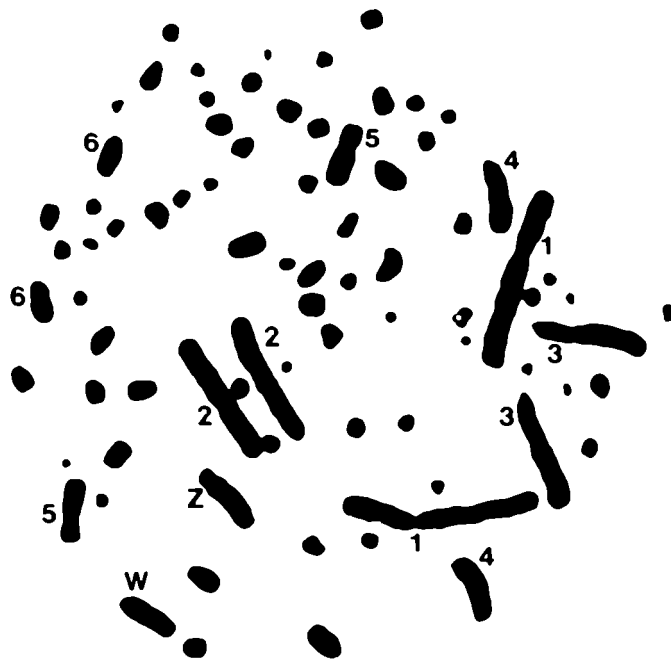


Figura 4. Metafase mitótica de *Rhea americana*. Se señalan los 6 primeros pares autosómicos y el par ZW. 2600 x.



Figura 5. Bando G en *Rhea americana*. En el brazo corto del W se observa una banda terminal ausente en el Z. 2200 x.

mostrar el complemento completo y permitir la identificación del par ZW y la ubicación de los centrómeros en los macrocromosomas. Las longitudes relativas y los índices centroméricos se calcularon para los pares #1 a #7 y el par ZW; los restantes elementos se consideraron microcromosomas, porque los homólogos no pueden ser identificados de manera inequívoca, ya que casi todos son acrocéntricos y sus longitudes disminuyen en forma muy gradual. Cerca del 50% del genoma (48.1%), está contenido en los pares #8 a #39.

Tabla 1. Longitudes relativas e índices centroméricos de los macroautosomas y el par ZW en las metafases somáticas de *Rhea americana*.

Cromosoma #	1	2	3	4	5	6	7	Z	W
l.r. (%)	13.7	9.9	8.5	5.5	4.7	3.2	3.0	5.8	4.4
DS	0.96	0.59	0.48	0.42	0.27	0.28	0.27	0.49	0.39
IC	0.38	0.44	0.05	0	0.38	0.10	0.10	0.16	0.14

l.r.=longitud relativa); DS=desviación estandar; IC=índice centromérico

El cromosoma Z tiene un tamaño muy semejante al #4, pero tiene un brazo corto pequeño, aunque bien visible, que lo distingue. El cromosoma W es casi una cuarta parte menor que el Z, y también tiene un brazo corto pequeño. En ambos cromosomas el brazo corto se colorea más débilmente que el resto, por lo que resulta difícil de apreciar si los cromosomas están algo contraídos, de manera similar a lo que ocurre con el brazo corto del par #3.

III.1.1.2. Bando G

Los cromosomas Z y W muestran el mismo patrón de bandas a nivel del brazo largo: en ambos cromosomas hay una banda telomérica y otras 4 bandas regularmente espaciadas hasta el centrómero. En el brazo corto del W hay una banda telomérica ausente en el Z (Figura 5).

III.1.1.3. Bando C

El bando C se realizó en 3 hembras analizándose las microfotografías de unas 40 metafases (Figura 6). En los macroautosomas la heterocromatina C+ más notable se encuentra a nivel



Figura 6. Bando C en *Rhea americana*. Los cromosomas sexuales tienen una banda C+ en posición centromérica, y el brazo corto del W también es heterocromático. 2600 x.

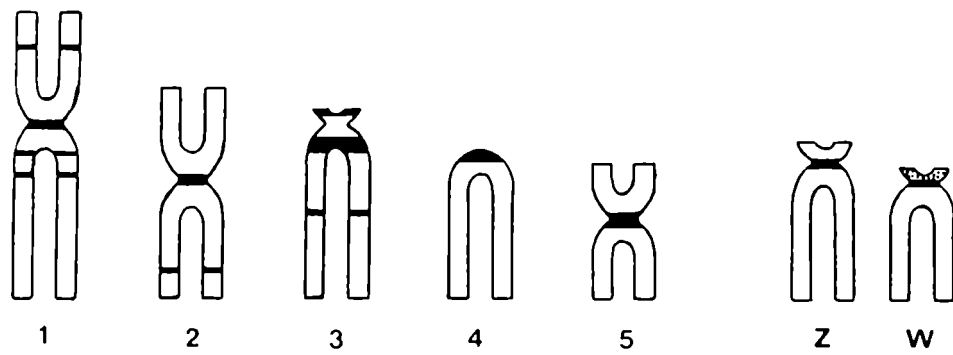


Figura 7. Idiograma de bandas C en los macrocromosomas de *Rhea americana*. El bandeo C+ del brazo corto del W (punteado) es más débil que la banda centromérica.

centromérico, aunque en algunos pares se pueden identificar bandas intersticiales de menor tamaño. El par #3 tiene una banda pericentromérica grande en el brazo largo y otra, menor, en el extremo del brazo corto.

Tanto el cromosoma Z como el W tienen heterocromatina centromérica C+, y esto se observó consistentemente en todas las metafases analizadas. El brazo corto del W, que se colorea débilmente en las preparaciones convencionales, es también C+.

Estos resultados permiten realizar un idiograma de bandas C para los cromosomas #1 a #5 y el par ZW que difiere significativamente del publicado en la literatura (ver Discusión), especialmente en lo referente a los cromosomas sexuales (Figura 7).

III.1.2. La profase meiótica femenina al microscopio óptico

La profase meiótica de los ovocitos de *Rhea americana* se observó en preparaciones secadas al aire y coloradas con Giemsa, obtenidas del ovario de una hembra al término del período de incubación. De un total de 136 núcleos, un 28.7 % correspondió a los estadios más tempranos de leptotene y cigotene, donde se observan filamentos cromatinicos delgados, y sin un obvio ordenamiento dentro del núcleo. En el cigotene tardío los microcromosomas se localizan en la periferia y su grosor es el doble de los correspondientes a los macrocromosomas, indicando que los homólogos más pequeños ya están apareados. Durante el paquitene, los bivalentes están más separados y se observan cromómeros a lo largo de los filamentos gruesos, aunque no es posible individualizar cada elemento. Sólo el 2.2 % de los núcleos observados correspondieron al estadio de diplotene, reconocible por la formación de "ojales" característicos (debido a la separación de los bivalentes), que permanecen unidos únicamente a nivel de los quiasmas.

La principal información proveniente de estas preparaciones es la homogeneidad del grado de condensación de todos los bivalentes, corroborándose la ausencia de heteropicnosis asociada a los cromosomas sexuales.

III.1.3. El cariotipo de complejos sinaptonémicos y su comparación con el cariotipo mitótico

La Figura 8 ejemplifica el complemento de CSs a partir de los cuales se realizaron las mediciones como se explicó en la sección II.4 de Materiales y Métodos. Los núcleos en paquitene muestran 39 CSs autosómicos y el bivalente sexual, lo que confirma el número diploide de 80. Los resultados que se muestran en la Tabla 2 se obtuvieron promediando las mediciones de 41 núcleos teñidos con AgNO_3 o con PTA, en los que los cinetocoros se distinguen como espesamientos de los elementos laterales.

Tabla 2. Longitudes relativas de los SCs autosómicos en 41 núcleos de ovocitos en paquitene de *Rhea americana*.

SC #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
l.r.(%)	11.6	8.8	7.5	5.3	4.3	3.1	2.8	2.7	2.5	2.3
DS	0.65	0.45	0.46	0.29	0.20	0.37	0.16	0.12	0.12	0.07
l.a. (μm)	24.7	18.7	15.9	11.3	9.2	6.7	6.1	5.8	5.2	4.9
DS	3.19	2.54	2.05	1.37	1.20	0.97	0.76	0.71	0.66	0.58
IC	0.38	0.45	0.04	0	0.36	0.14	0.13	0.12	0	0

l.r.=longitud relativa promedio; l.a.=longitud absoluta; DS=desviación estandar ;
IC=índice centromérico.

La longitud promedio total del complemento de CSs en los ovocitos de *R. americana* es $211.2 \mu\text{m} \pm 26.05$, y aproximadamente el 50 % corresponde a los microbivalentes (#11-39).

Las longitudes absolutas de los CSs en distintos núcleos tiene una variación mayor que la de las longitudes relativas, que permanecen casi constantes. Esta fluctuación es un proceso común durante el paquitene, y afecta en la misma proporción a todos los CSs dentro de un mismo núcleo ; por esta razón las medidas relativas se mantienen.

En la Figura 9 se muestran los idiogramas de los cromosomas mitóticos y de CSs contruidos a partir de las longitudes relativas y los índices centroméricos respectivos. La prueba de regresión que compara las longitudes relativas de los primeros 7 macroautosomas y los CSs respectivos muestra la proporcionalidad 1 : 1 entre ambos cariotipos. La ecuación de regresión es $y = 0.475 + 0.83 x$ y el

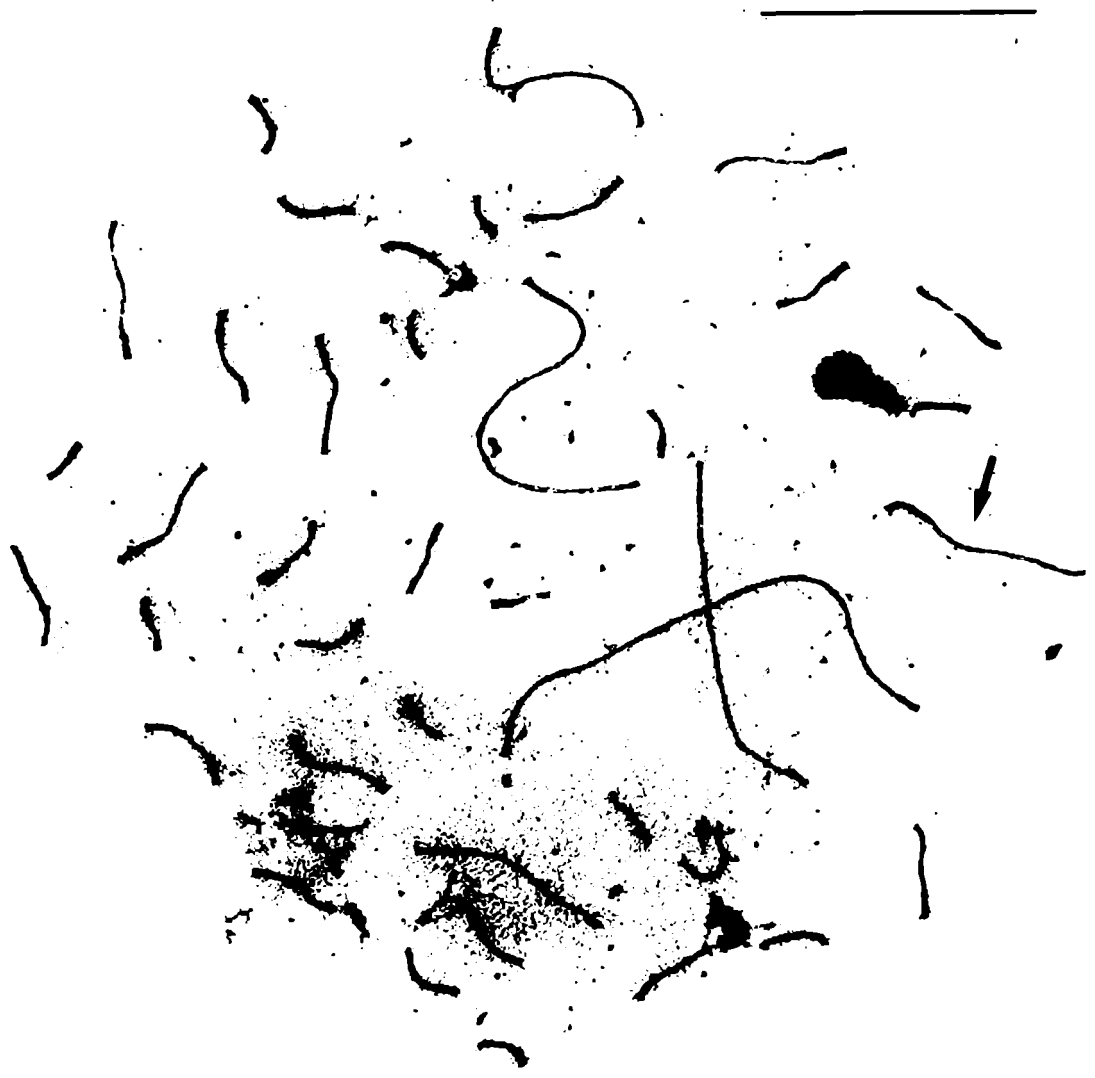


Figura 8. Ovocito en paquitene de *Rhea americana* que muestra los 39 complejos sinaptonémicos autosómicos y el par ZW (flecha). 3600 x. Barra = 10 μ m.

Comparación del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos en *Rhea americana*

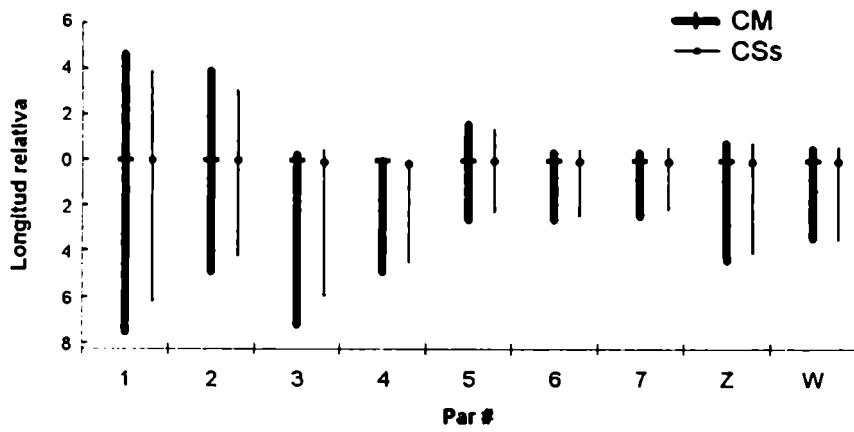


Figura 9. Comparación del idiograma de los macrocromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes en *Rhea americana*. Las longitudes relativas están expresadas en porcentaje del lote haploide.

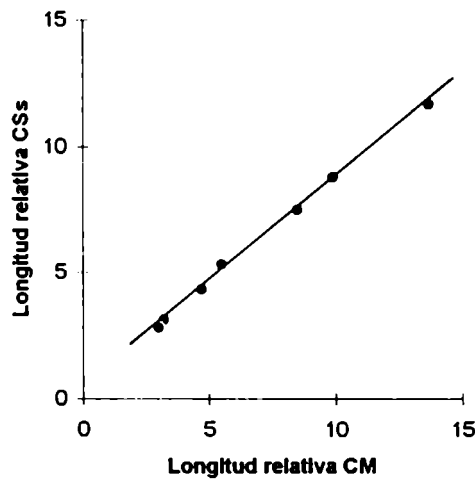


Figura 10. Gráfico de regresión que muestra la proporcionalidad 1 : 1 de las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) en *Rhea americana*. El coeficiente de regresión es $r = 0.998$ y la ecuación de la recta de regresión es $y = 0.83x + 0.47$.

coeficiente de regresión (r) es 0.998 (Figura 10).

III.1.4. El bivalente ZW

III.1.4.1. Morfología

El par sexual forma un CS asimétrico, con un elemento lateral algo más largo y otro más corto, que corresponden, respectivamente, a los cromosomas Z y W. En este bivalente se observa el mismo proceso de ajuste de longitudes durante el paquitene (“igualización”) descrito en varias especies de aves carinadas (Introducción Sección 5.2). En *R. americana*, como en todas las ratites, la diferencia de tamaño entre el Z y el W no es tan pronunciada como en las aves carinadas, y esto también ocurre en los ejes meióticos.

La sinapsis del par ZW comienza por los extremos del brazo largo de ambos ejes, identificados por la ubicación de los cinetocoros, y se extiende en un 85-100 % de la longitud del W. La porción correspondiente al brazo largo del W forma un CS de aspecto normal con el segmento respectivo de Zq, en tanto que el segmento del eje W perteneciente al brazo corto, aparece engrosado y, en ocasiones, no interviene en la sinapsis. El brazo corto del eje Z permanece libre en toda su longitud, y también está engrosado. Los pares ZW con la morfología recién descrita, ilustrada en la Figura 11a, serán referidos como “pares con segmento diferencial libre”, pues la porción asináptica del eje Z es la que no tiene contraparte homóloga en el W. En esta etapa, el porcentaje del complemento de CSs representado por cada uno de los ejes Z y W es 5.1 ± 0.28 y 4.3 ± 0.2 , respectivamente, siendo esta proporción muy semejante a la proporción de cada cromosoma en el cariotipo mitótico.

En etapas posteriores de la igualización, el segmento asináptico del eje Z se acorta y se vuelve sinuoso, girando alrededor del W, en especial en el extremo opuesto al del inicio de la sinapsis. Cuando la diferencia de longitudes de los ejes es mínima, esto es, cuando ha finalizado el proceso de igualización, el CS tiene un aspecto regular en casi toda su extensión y los cinetocoros de ambos gonosomas están alineados (Figura 11b).

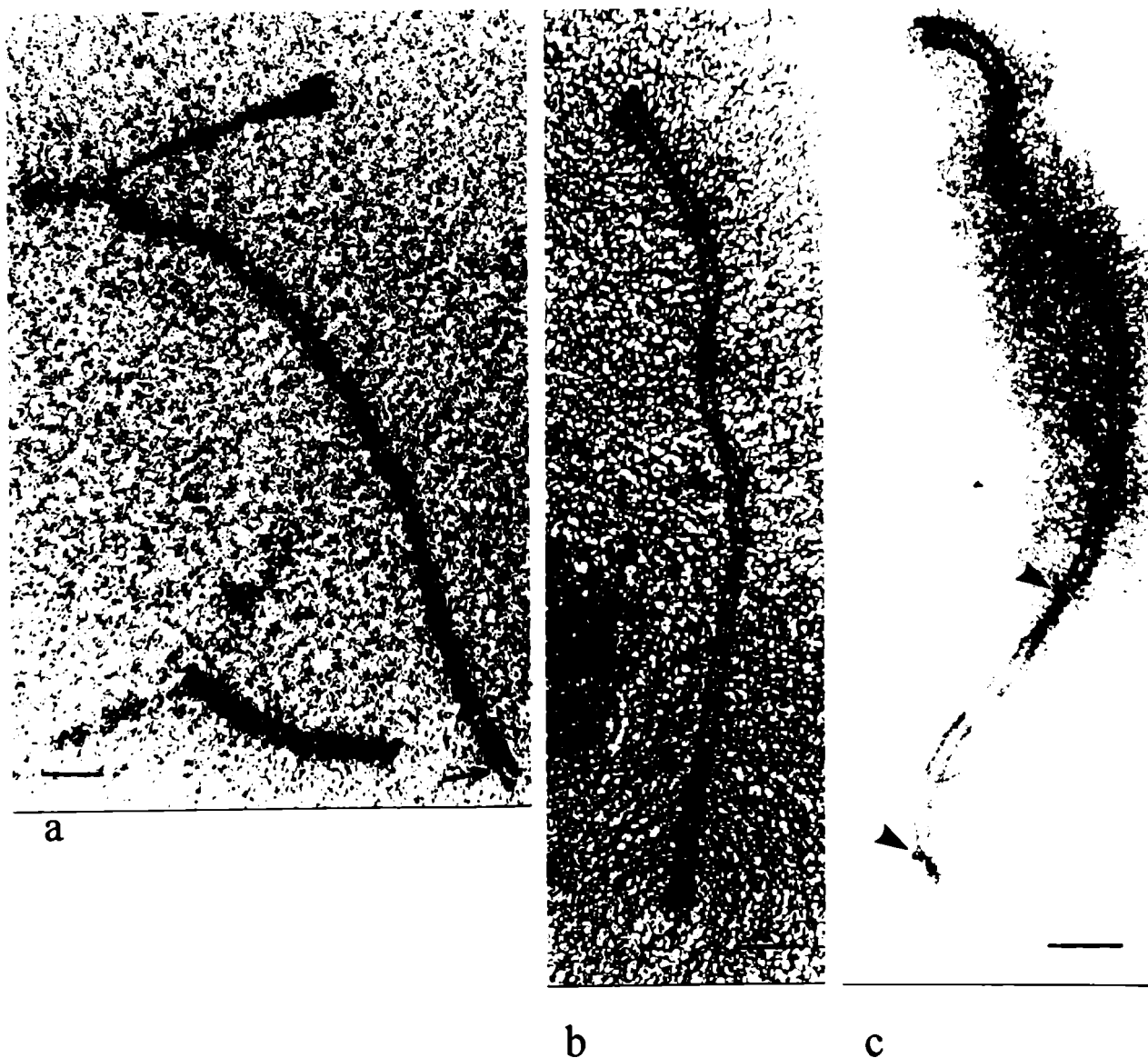


Figura 11. El par ZW en *Rhea americana*. a) Par ZW con segmento diferencial libre : las flechas pequeñas marcan los segmentos diferenciales de los ejes, no sinapsados. La flecha larga señala el extremo del inicio de la sinapsis. c : cinetocoro del eje Z ; c' : cinetocoro del eje W. 9000 x. b) Par ZW igualizado : los cinetocoros del eje Z (c) y del eje W (c') están alineados. Las puntas de flecha señalan los nódulos de recombinación en el brazo largo. 9000 x. c) Par ZW igualizado, con tres nódulos de recombinación (puntas de flecha) ; el eje Z da vueltas en el segmento correspondiente al brazo corto. 11000 x. Barras = 1 μ m.

En la Tabla 3 se resumen las variaciones de las longitudes de los ejes sexuales durante el ajuste sináptico. La longitud inicial del eje Z, en los pares ZW con segmento diferencial libre, es significativamente diferente de la longitud del eje en los pares ZW igualizados, mientras que la del eje W no varía sustancialmente.

Tabla 3. Longitudes absolutas en de los ejes Z y W en los ovocitos en paquitene de *R. americana*.

	Con segmento diferencial libre	Igualizados	Valor P
Longitud (Z)	18.7	14.07	< 0.0001
DS	2.86	1.74	
n	16	59	
Longitud (W)	14.69	13.36	NS
DS	1.97	1.62	
n	16	59	
IC (Z)	0.159	0.163	NS
DS	0.027	0.027	
n	11	14	
S. dif. Libre + Igualizados			
IC (W)	0.142		
DS	0.026		
n	18		

IC= índice centromérico . Longitudes en μm .

III.1.4.2. El par ZW y los nódulos de recombinación en *R. americana*

En el CS formado entre el Z y el W se observan 1 a 3 nódulos de recombinación (NRs), distribuidos en el brazo largo (Figura 11b y c). Las posiciones de los nódulos de recombinación en cada par ZW, se establecieron midiendo la distancia desde los telómeros que inician la sinapsis hasta cada NR, y se expresan como fracciones de la longitud total del eje W en ese par. En ningún caso se observaron NRs en el brazo corto del CS ; el nódulo de recombinación más alejado del telómero sináptico se encuentra a 0.8 unidades de la longitud del eje W. Teniendo en cuenta la constancia del índice centromérico del W (0.14), el NR más proximal está ubicado a 0.06 unidades (de longitud del W) del cinetocoro, lo que constituye un segmento libre de NRs en el brazo largo, que mide

aproximadamente un 5 % de W_q . De esta manera hay dos segmentos libres de NRs : W_p y la región proximal de W_q . La Figura 12 muestra la distribución del total de NRs ($n = 134$) en los 63 pares ZW analizados. La distribución se aparta claramente de una distribución normal, asemejándose a una distribución bimodal, con un pico más pronunciado hacia el extremo del brazo largo. Esta acumulación hacia el telómero se debe a que en los pares ZW con un único NR ($n = 9$), éste se ubica preferencialmente en el tercio distal del brazo largo (distancia promedio al telómero = 0.16 ± 0.09).

En los pares ZW con dos NRs, el nódulo más cercano al telómero (NR 1) y el nódulo más alejado (NR 2), muestran distribuciones distintas (Figura 13), y la prueba estadística t demuestra que la diferencia entre sus medias es altamente significativa ($p < 0.0001$). Las distancias promedio al telómero del NR 1 y el NR 2 son 0.16 ± 0.08 y 0.52 ± 0.11 , respectivamente. A fin de evaluar la influencia de un evento de recombinación sobre otro evento similar dentro del mismo brazo cromosómico (es decir, la interferencia), se midieron las distancias de separación entre NR 1 y NR 2 (en cada par ZW con dos nódulos), y su distribución se comparó con la distribución de las distancias esperadas, suponiendo una localización independiente y al azar de cada par de nódulos (Figura 14). Los pares de NRs observados se agruparon según la distancia de separación, expresada en fracción de la longitud total del W. La frecuencia esperada de los pares de NRs dentro de cada intervalo de distancia, se calculó utilizando la fórmula $1 - (1-d)^2$, donde d es la distancia máxima entre nódulos en cada intervalo (Sherman y Stack, 1995). Las frecuencias esperadas de pares (NR 1;NR 2) dentro de cada intervalo de separación se detallan en la Tabla 4.

El gráfico comparativo de las frecuencias de pares de nódulos esperadas y observadas (Figura 14), muestra que el número de pares de NRs separados por un intervalo < 0.25 de la longitud del W, es mucho menor que el esperado ; mientras que cuando la separación está en el intervalo 0.25-0.50, las frecuencias observadas son mayores que las esperadas. Esto puede interpretarse como interferencia positiva (interferencia quiasmática usual) en el intervalo 0-0.25, e interferencia negativa (“facilitación”) en el intervalo 0.25-0.5.

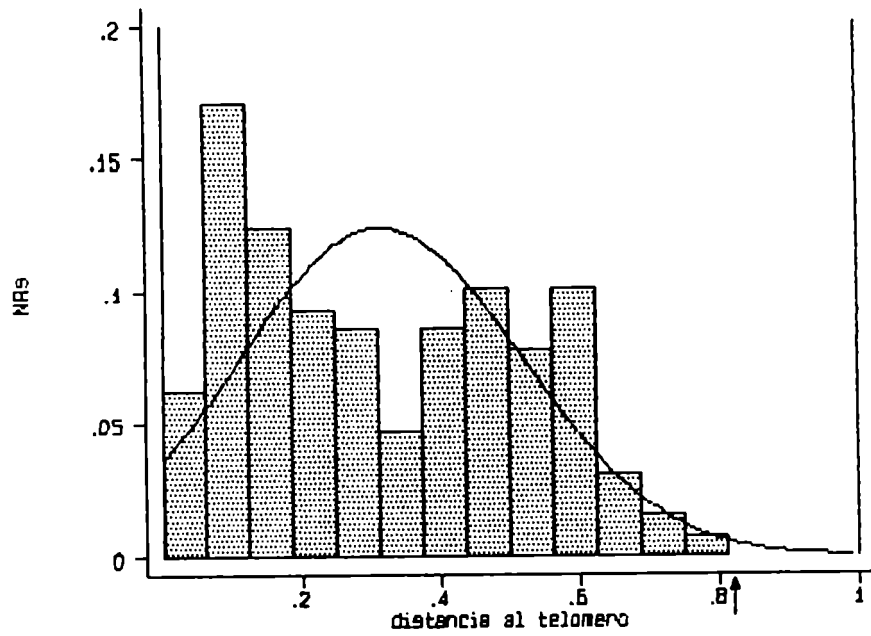


Figura 12. Distribución de los nódulos de recombinación totales ($n = 134$) en 63 pares ZW de *Rhea americana*. El histograma muestra la distribución de frecuencias de las distancias entre el telómero del brazo largo del par ZW y cada nódulo de recombinación, expresadas en fracciones de la longitud total del eje W. El cinetocoro del W se encuentra en 0.86 (índice centromérico promedio = 0.14). La flecha señala la posición del cinetocoro del W.

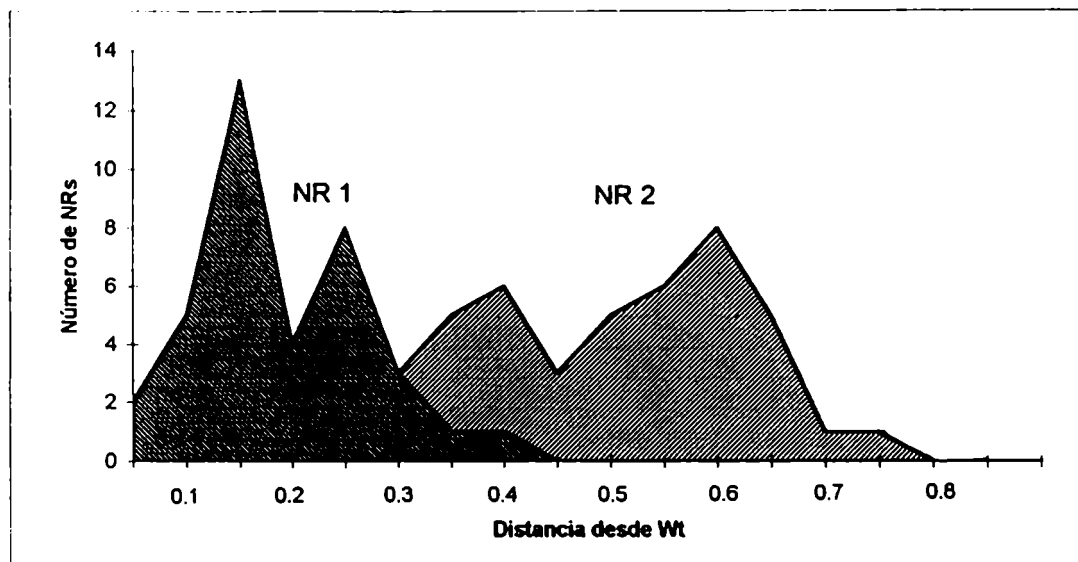


Figura 13. Distribución de los nodulos de recombinación en los pares ZW de *Rhea americana* con dos nodulos. El gráfico muestra el rango de distribución y la frecuencia del nódulo de recombinación mas cercano (NR 1) y el nódulo más alejado (NR 2) del telómero del brazo largo del par sexual. Las distancias desde el telómero (Wt) están expresadas en fracciones de la longitud total del W.

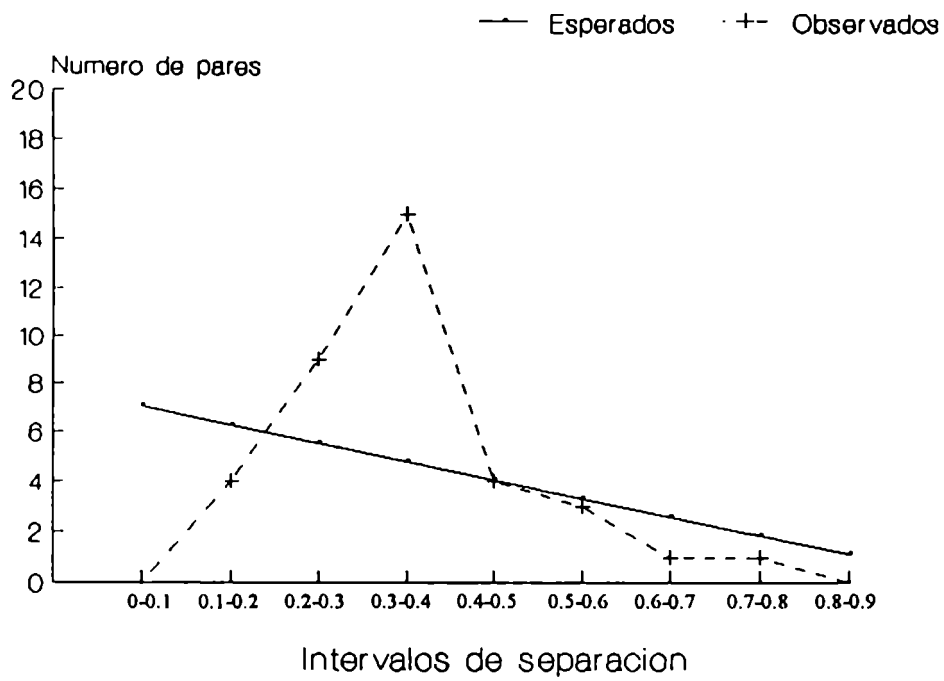


Figura 14. Distribuciones observada y esperada de los intervalos de separación entre los nódulos de recombinación en 37 pares ZW con dos nódulos en *Rhea americana*. Los intervalos están expresados en fracciones de la longitud total del eje W. La distribución esperada está basada en la ubicación al azar e independiente de ambos nódulos (ver el texto).

Tabla 4. Frecuencias esperadas de los intervalos de separación entre NR 1 y NR 2 en los pares ZW con dos NRs. Los intervalos están expresados como fracciones de la longitud del eje W. Frecuencias esperadas, calculadas según $F = 1-(1-d)^2$ (Sherman y Stack, 1995).

Intervalo entre NR 1 y NR 2	Frecuencia esperada de pares de NRs/intervalo
0-0.1	0.19
0.1-0.2	0.17
0.2-0.3	0.15
0.3-0.4	0.13
0.4-0.5	0.11
0.5-0.6	0.09
0.6-0.7	0.07
0.7-0.8	0.05
0.8-0.9	0.03
0.9-1.0	0.01

III.1.5. Los nódulos de recombinación en los complejos sinaptonémicos autosómicos de *R. americana*

El número promedio de NRs por ovocito es 57.8 ± 5 , de los cuales un 50.6 % se encuentran en los bivalentes #1 a #10. Se analizó la asociación entre NRs y la longitud de cada CS. La prueba de regresión muestra que el número de NRs está directamente relacionado con la longitud de los CSs en los macrobivalentes más largos, siendo el coeficiente de regresión $r = 0.96$ (Tabla 5 ; Figura 15). Esta relación no se mantiene en los microbivalentes que, casi siempre, tienen un único NR.

Tabla 5. Distribución de los nódulos de recombinación en los complejos sinaptonémicos #1 a #5 en *Rhea americana*, calculada a partir de 16 ovocitos en paquitene.

Bivalente #	1	2	3	4	5	6
NRs (<i>m</i>)	7.1	6.0	4.5	3.1	3	1.8
DS	1.3	1	0.82	0.7	0.53	0.58

m = valor promedio ; DS=desviación estándar

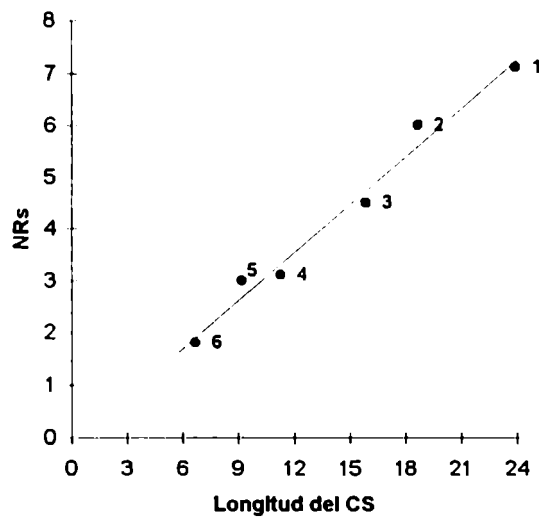


Figura 15. Gráfico de correlación entre la longitud del CS (en μm) y el número de nódulos de recombinación. El coeficiente de regresión (r) es 0.96, y la ecuación de la recta de regresión es $y = 0.307x - 0.147$. Los números sobre la recta de regresión identifican a los primeros seis CSs autosómicos.

Esta relación entre longitud de CS y número de nódulos queda ilustrada por el número de NRs en los brazos cromosómicos de distinto tamaño : por ejemplo, en el CS #1, el brazo corto muestra, en general, entre 1 y 3 NRs, mientras que en el brazo largo hay entre 3 y 4 (Figura 16).

La longitud de CS entre dos NRs, considerando todos los bivalentes (también interpretada como la distancia media de CS correspondiente a un NR), es, en promedio, $3.65 \mu\text{m}$, y no se observan diferencias significativas con respecto a esta distancia media considerada en los bivalentes #1-#10 ($3.74 \mu\text{m}$) y la misma distancia media considerada en los microbivalentes ($3.58 \mu\text{m}$). Sin embargo, los NRs no están regularmente espaciados a lo largo de los CSs : su frecuencia es menor cerca del cinetocoro, y aumenta hacia los telómeros. Esta distribución puede observarse en los histogramas construidos para los macrobivalentes #1 a #5, en los que el eje horizontal representa la longitud del bivalente dividida en segmentos de $1 \mu\text{m}$, y el eje vertical representa el número de NRs (Figura 17).

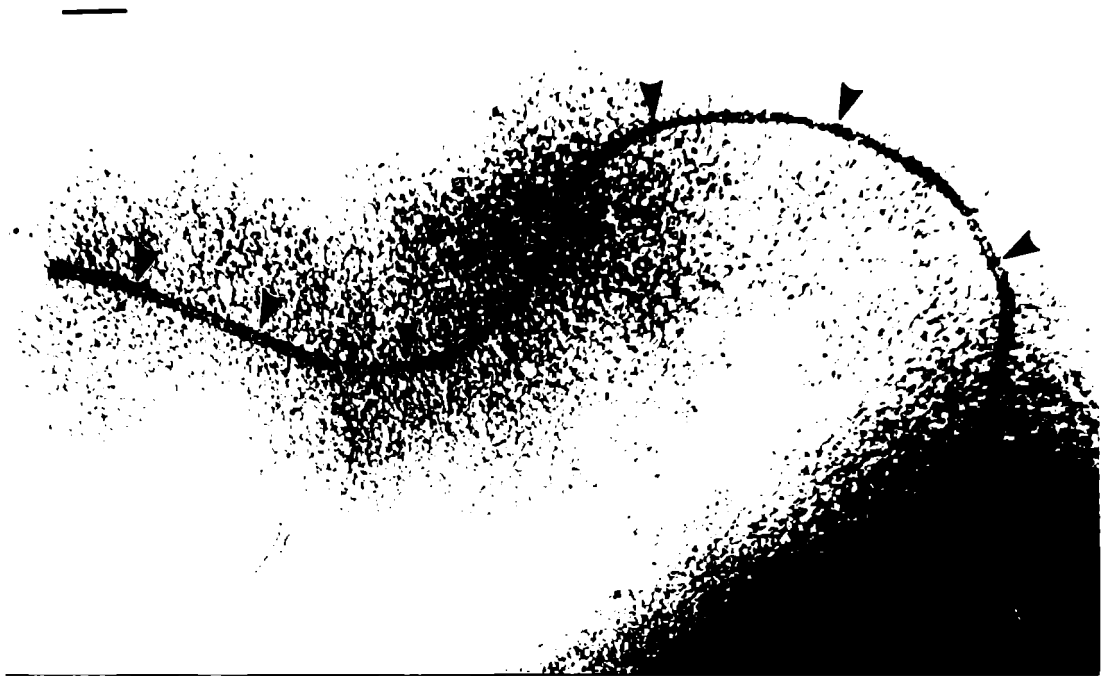


Figura 16. Detalle del complejo sinaptonémico del par autosómico #1 de *Rhea americana* en el que se observan tres nódulos de recombinación (puntas de flecha) en el brazo corto y cuatro en el brazo largo. c : cinetocoro. 8000 x. Barra = 1 μ m.

Distribución de los nódulos de recombinación en los macrobivalentes de *Rhea americana*

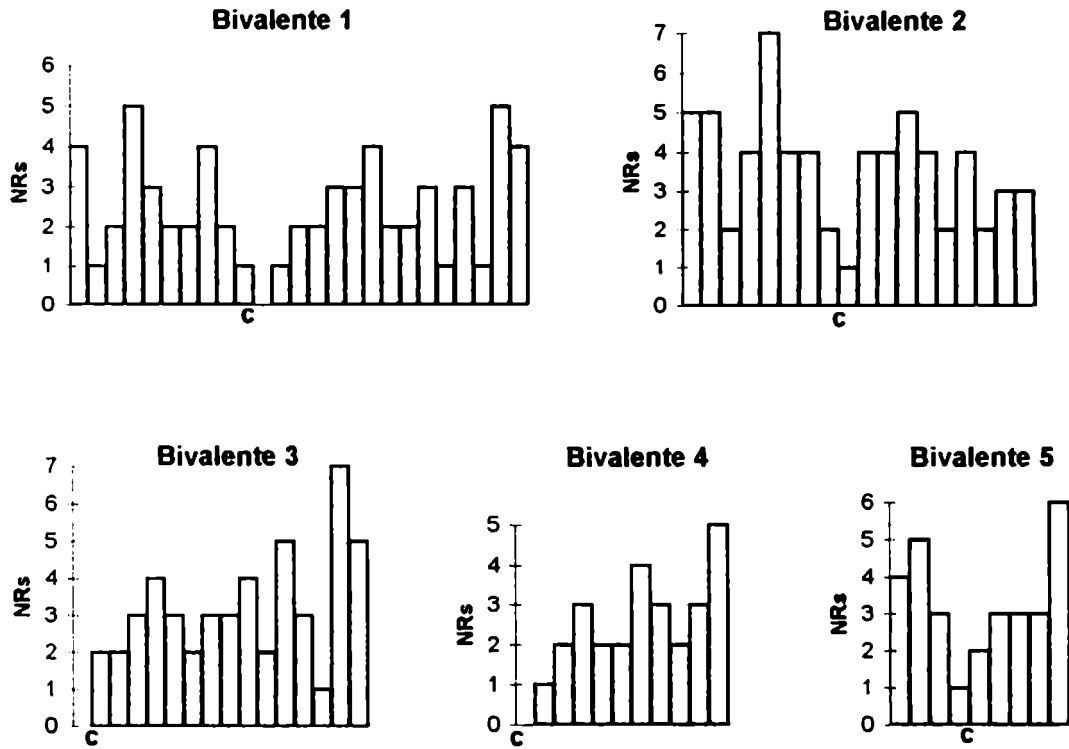


Figura 17. Histogramas de la distribución de los NRs en los cinco primeros complejos sinaptonémicos de *Rhea americana*. El eje horizontal de cada histograma representa la longitud absoluta del bivalente dividida en segmentos de 1 μm. La escala del eje vertical representa el número de nódulos de recombinación. El segmento hacia la derecha del cinetocoro (c) corresponde al brazo largo. La frecuencia de los nódulos de recombinación es muy baja en la zona centromérica y aumenta cerca de los telómeros.

III.2. *Anas Platyrhynchos*

III.2.1. El cariotipo mitótico de *A. platyrhynchos*

El número diploide de *Anas platyrhynchos* es $2n = 80$: los pares #1 y #2 son bibraquiados y los demás autosomas son telocéntricos (Figura 18). El cromosoma Z es subacrocentrico y el cuarto en tamaño, mientras que el W es acrocentrico, con un brazo corto que no se manifiesta claramente en todas las metafases, y su tamaño se aproxima al de los microcromosomas. El cromosoma W se identificó mediante bandeado C, ya que es fuertemente heterocromático (Figura 19). Es decir que, a diferencia de lo observado en *Rhea americana*, el Z y el W son obviamente desiguales en tamaño, y el W es muy rico en heterocromatina constitutiva, aún cuando hay una gran similitud en el patrón de bandas G del cromosoma Z de ñandú y el cromosoma Z del pato Pekín (ver Introducción).

III.2.2. Los complejos sinaptonémicos y la relación con el cariotipo mitótico

El cariotipo de CSs del pato Pekín se construyó a partir de las mediciones realizadas sobre 10 núcleos seleccionados, obtenidos mediante la técnica de microextendidos en superficie. Al igual que en *Rhea americana*, se observó una excelente correspondencia entre las longitudes relativas e índices centroméricos del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos (Figuras 20 y 21). Para evaluar cuantitativamente esta similitud se realizó una prueba de regresión utilizando las longitudes relativas de los 7 primeros elementos mitóticos y sus correspondientes CSs, confirmándose una proporcionalidad directa entre ambos cariotipos (coeficiente de regresión $r = 0.99$) (Figura 21).

III.2.3. El par ZW : el proceso de igualización y la localización del nódulo de recombinación en *A. platyrhynchos*

El análisis del par ZW de *A. platyrhynchos* al microscopio electrónico muestra que la sinapsis se inicia por el extremo del brazo largo de ambos gonosomas, que puede identificarse por la posición de los cinetocoros (Figura 22). Al comienzo del paquitene, cuando los ejes Z y W están separados o



Figura 18. Metafase de *Anas platyrhynchos* (hembra). Se indican los seis primeros pares autosómicos y el cromosoma Z. La identificación del W se verifica por bandeo C. 3000 x.



Figura 19. Bando C en *Anas platyrhynchos*. El cromosoma W es fuertemente heterocromático, y también hay un par de microcromosomas C+.

Comparación del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos en *Anas platyrhynchos*

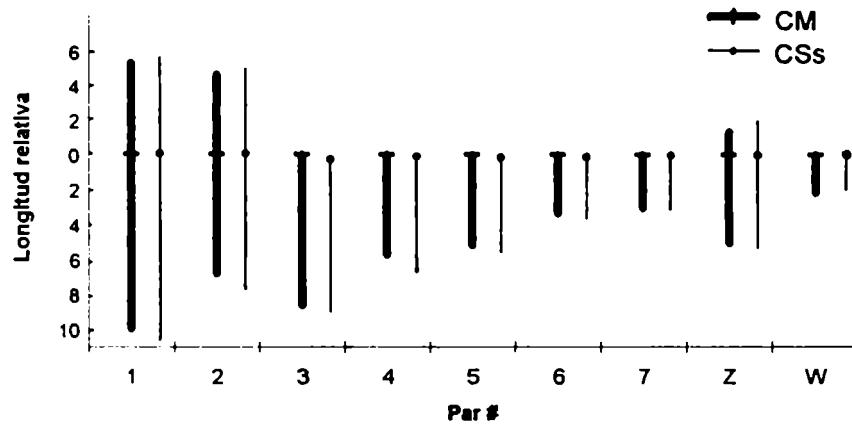


Figura 20. Comparación del idiograma de los macrocromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes en *Anas platyrhynchos*. Las longitudes relativas están expresadas en porcentaje del lote haploide.

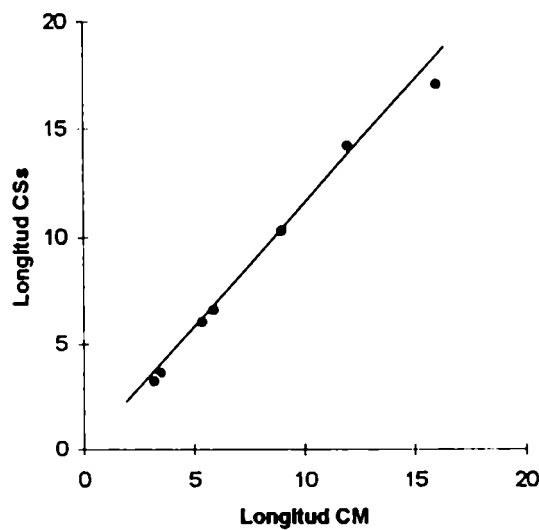


Figura 21. Gráfico de regresión que muestra la proporcionalidad 1 : 1 de las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) en *Anas platyrhynchos*. El coeficiente de regresión es $r = 0.99$ y la ecuación de la recta de regresión es $y = 1.12x - 0.09$.

cuando la sinapsis es muy temprana, la longitud del eje W es una 3 veces menor (2.4 % del lote haploide) que la del eje Z (7.3 %) ; estas longitudes relativas se corresponden con las del cariotipo mitótico, y se utilizaron para construir el idiograma de CSs de la Figura 20. La reducción progresiva de esta diferencia de longitudes de los ejes luego de la sinapsis da lugar a distintas morfologías del par ZW, dependiendo de la longitud del segmento libre (no sinapsado) del eje Z, como fue descrito inicialmente en el pollo (Introducción, Sección 5.2). En *A. platyrhynchos* el proceso de ajuste de longitudes (igualización) se produce por el acortamiento del eje Z, y simultáneamente, por el alargamiento del eje W. La longitud media del eje Z es 18.6 μm , cuando el segmento no sinapsado de este eje es mayor que el 50 % de la longitud del CSs formado entre el Z y el W (par ZW de tipo LAS) ; en tanto que en los pares ZW igualizados el eje Z tiene una longitud de 14.5 μm . Al mismo tiempo, el eje W se alarga, y las longitudes promedio van de 8.5 μm , en el tipo LAS, a 13.3 μm en los pares ZW igualizados. Este proceso hace que las longitudes tengan un amplio rango de variación dentro de cada tipo morfológico, aunque las longitudes promedio sean características para cada tipo (Figura 23).

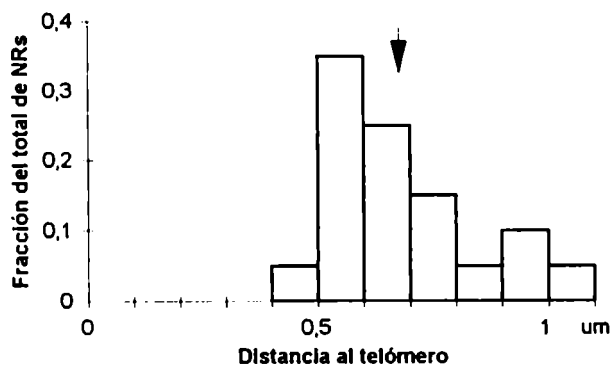


Figura 24. Distribución de las distancias entre los telómeros del par ZW y el nódulo de recombinación en 20 ovocitos de *Anas platyrhynchos*. La flecha señala la media de la distribución (0.69 μm).

Como se mencionó previamente, los telómeros del brazo largo inician la sinapsis, y cerca del extremo sináptico se encuentra un NR, de presencia constante (Figura 22). La distancia promedio



Figura 22. Par ZW de *Anas platyrhynchos* en estadio de segmento asináptico largo (LAS). Las flechas señalan el segmento diferencial no sinapsado del eje Z. Cerca del extremo del brazo largo se observa un nódulo de recombinación (punta de flecha). En el espacio central de los complejos sinaptonémicos se observa el elemento central. c : cinetocoro del eje Z. 11000 x. Barra = 1 μ m.

Variaciones de longitud
en los ejes Z y W

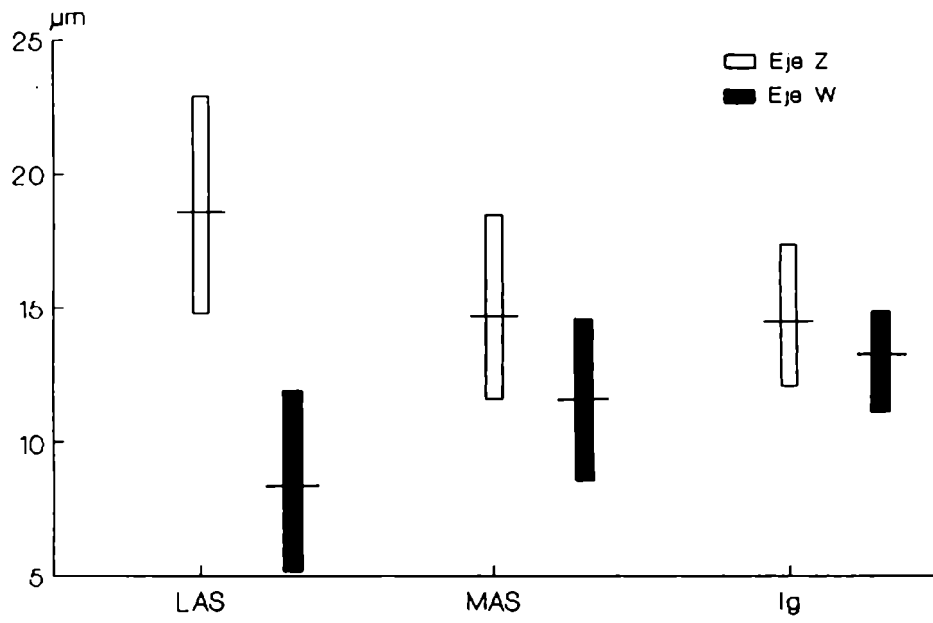


Figura 23. Variaciones en las longitudes de los ejes Z y W de *Anas platyrhynchos* durante el proceso de igualización. Las líneas horizontales en cada barra marcan la longitud promedio (en µm) de los ejes y la altura de las barras indica el rango de variación de la longitud del eje en cada grupo.

entre el NR y el extremo sináptico es $0.69 \mu\text{m}$, con un rango de $0.49 \mu\text{m}$ a $1.06 \mu\text{m}$, quedando una zona terminal de alrededor de $0.4 \mu\text{m}$ donde no se observan NRs (Figura 24).

A diferencia de lo observado en el par ZW de *R. americana*, en ninguno de los pares ZW de *A. platyrhynchos* estudiados pudo observarse más de un nódulo de recombinación a lo largo de todo el par ZW.

III.3. *Numida meleagris*

III.3.1. El cariotipo mitótico de *N. meleagris*

El número diploide de *N. meleagris* es $2n = 76$. Los pares #1, #2 y #4 son submetacéntricos ; el par #5 es casi metacéntrico y los restantes autosomas son telocéntricos, registrándose una marcada diferencia de tamaño a partir del par #7 (Figura 25). El cromosoma Z es submetacéntrico, es el cuarto en tamaño y representa un 6.7 % del lote haploide. El cromosoma W puede individualizarse como un microcromosoma acrocéntrico, casi 2.7 veces menor que el Z, que aparece fuertemente heterocromático con bandeo C (Figura 26).

III.3.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos : comparación con el cariotipo mitótico

Las mediciones de los CSs en 6 núcleos de ovocitos en paquitene permitieron comparar las longitudes relativas e índices centroméricos de los CSs autosómicos con los cromosomas mitóticos. En general, se observa una buena correspondencia entre ambos cariotipos, excepto para el par #3 (telocéntrico), que aparece subrepresentado en los ejes meióticos, de manera que la longitud relativa del CS #3 (7.7 %) resulta menor que la longitud relativa del CS #4 (9.4 %), que se reconoce como tal por la posición submediana del cinetocoro (Figuras 27 y 28).

Como se explicó en la Sección II.4 de Materiales y Métodos, las mediciones de los ejes sexuales (en especial el eje Z) utilizadas para construir los idiogramas, deben realizarse en estadios tempranos, cuando no se ha iniciado el proceso de igualización y se conserva la proporcionalidad con los cromosomas sexuales mitóticos. En los núcleos utilizados para obtener las longitudes relativas de los CSs en *N. meleagris*, los pares ZW estaban igualizados, o el eje Z se presentaba distorsionado por estiramiento, impidiendo registrar la proporción del eje Z con respecto al lote haploide. La longitud relativa del eje W (2.4 %) es muy similar a la del cromosoma mitótico (2.5 %).

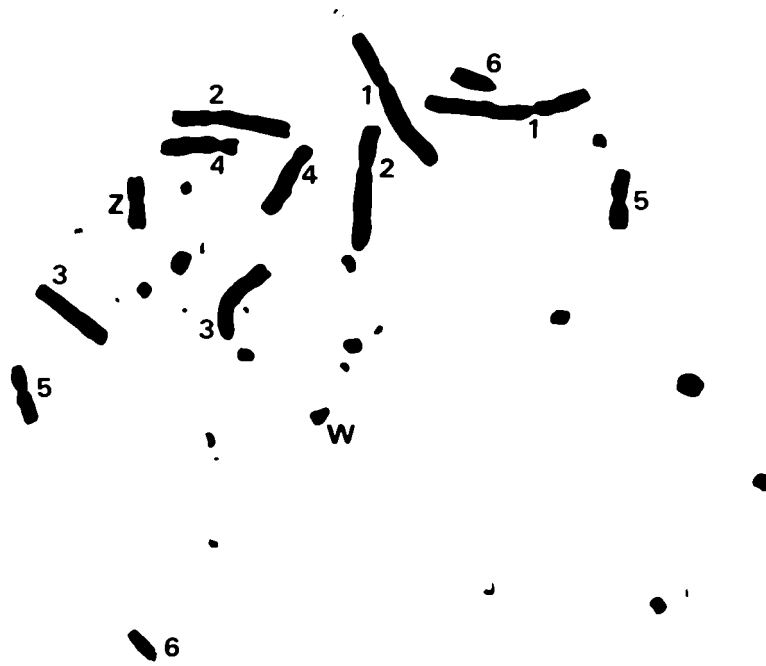


Figura 25. Metafase de *Numida meleagris* (hembra). Se señalan los seis primeros pares autosómicos y el par ZW. 2500 x.



Figura 26. Bandas C en *Numida meleagris*. El cromosoma W es un microcromosoma acrocéntrico fuertemente heterocromático. 2500 x.

Comparación del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos en *Numida meleagris*

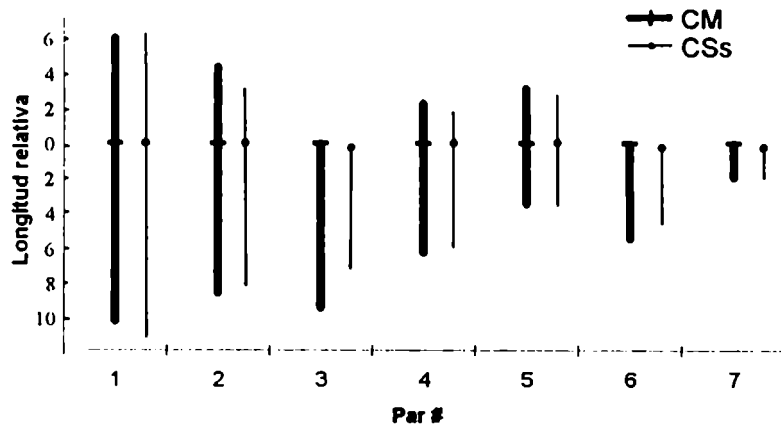


Figura 27. Comparación del idiograma de los macrocromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes en *Numida meleagris*. Las longitudes relativas están expresadas en porcentaje del lote haploide.

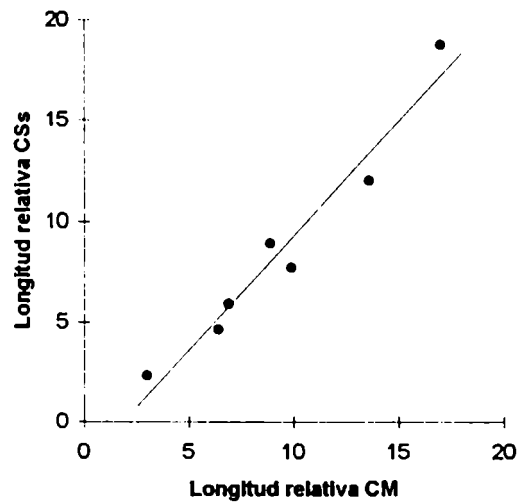


Figura 28. Gráfico de regresión que muestra la proporcionalidad 1 : 1 de las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) en *Numida meleagris*. El coeficiente de regresión es $r = 0.95$ y la ecuación de la recta de regresión es $y = 1.14x - 2.08$.



Figura 29. Par ZW de *Numida meleagris* en estadio de segmento asináptico medio (MAS). Las flechas señalan el segmento no sinapsado del eje Z. c : cinetocoro del eje Z. La punta de flecha señala en nódulo de recombinación cercano al extremo que inicia la sinapsis. 8500 x . Barra = 1 μ m.

III.3.3. El par ZW de *N. meleagris* : presencia de un único NR cercano al extremo sináptico

El par ZW de *N. meleagris* forma un CSs asimétrico, y se verifica el mismo proceso de igualización, encontrándose la secuencia LAS-MAS-Igualizados descrita en otras aves carinadas. El eje Z muestra el cinetocoro en posición submediana (índice centromérico 0.41), lo que permitió identificar al brazo corto como el responsable del inicio de la sinapsis con el brazo corto del W (Figura 29). Como consecuencia de la igualización, el índice centromérico del eje Z varía sustancialmente en los distintos tipos de pares ZW, porque la disminución de la longitud se realiza principalmente a expensas del brazo largo, que se reduce en un 60 % de su longitud original, mientras que el brazo corto sólo disminuye un 10 % en su longitud absoluta. En los pares ZW igualizados, la longitud del brazo largo es menor que Z_p y el índice centromérico promedio es ahora 0.55.

Cerca del extremo que inicia la sinapsis, es decir, el telómero de Z_p y el de W_p , se observa de manera constante un NR, y al igual que en el par ZW del pato Pekín (y en contraste con *R. americana*), en ningún par ZW se observa más de un NR (Figura 29). La distribución del NR se analizó en 18 pares ZW coloreados con PTA : la distancia promedio al telómero que inicia la sinapsis es 0.4 μm , y la posición del nódulo varía en un rango de 0.15 μm a 0.66 μm del extremo.

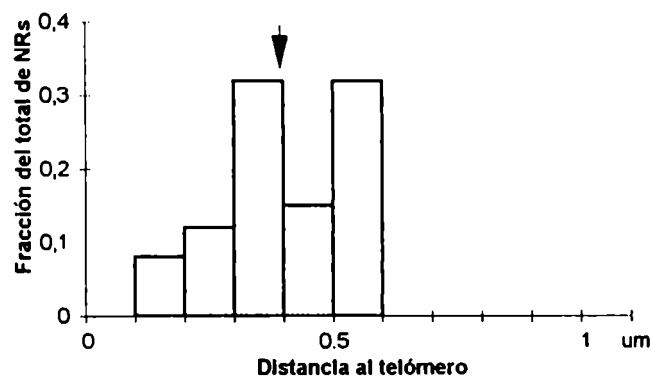


Figura 30. Distribución de las distancias entre el nódulo de recombinación y el telómero sináptico en 18 pares ZW de *Numida meleagris*. La flecha señala la media de la distribución (0.4 μm).

La comparación entre la distribución de localizaciones del NR en el par ZW de *N. meleagris* es significativamente diferente de la distribución observada en el pato Pekín (Figuras 24 y 30), siendo la primera de estas distribuciones más cercana al telómero de iniciación sináptica, mientras que la de *Anas platyrhynchos* es claramente intersticial.

III.4. *Columba livia*

III.4.1. El cariotipo mitótico y el par ZW

El análisis de los cromosomas mitóticos se realizó a partir de metafases obtenidas a partir de cultivo de linfocitos y de la médula ósea de los ejemplares utilizados para los estudios meióticos ; el número cromosómico modal es $2n = 80$, lo que posteriormente se confirmó en los estudios de CSs. Los pares #1 a #5 son bibraquiados ; los microcromosomas son telocéntricos y representan un 48.8 % del genoma (Figura 31). El cromosoma Z es un cromosoma metacéntrico (índice centromérico = 0.47), el cuarto en orden de tamaño, y su longitud relativa es el 5.7 % del lote haploide. El cromosoma W de *C. livia* también es metacéntrico, es el sexto par en longitud y la relación de tamaño entre el Z y el W es 1.5 : 1, es decir que el W es relativamente grande cuando se lo compara con el W de *N. meleagris* o el de *A. platyrhynchos*. Aunque el índice centromérico de ambos cromosomas sexuales está cercano a 0.5, el brazo corto del W puede distinguirse casi siempre, mientras que el Z es con más frecuencia exactamente metacéntrico. Con bandeo C, el W aparece heterocromático, aunque no por completo (Figura 32) : hay una banda C+ centromérica intensamente coloreada, similar pero de un tamaño significativamente mayor que la de los centrómeros autosómicos ; en el brazo corto hay un bloque heterocromático menos coloreado que el centromérico y una banda eucromática de posición terminal, y en el brazo largo hay una banda de eucromatina proximal ; y la heterocromatina, que ocupa el resto del brazo, se colorea menos intensamente que la del brazo corto, excepto por una banda terminal más marcada (Figura 33).



Figura 33. Representación esquemática del bandeo C del cromosoma W de *C. livia*. Las zonas en blanco corresponden a eucromatina ; las zonas sombreadas son heterocromáticas y se colorean con distinta intensidad. La región centromérica tiene una banda muy marcada.



Figura 31. Metafase de *Columba livia* (hembra). Se indican los cinco primeros pares autosómicos y el par ZW. 2600 x.



Figura 32. Bando C en *Columba livia*. El cromosoma W tiene una banda centromérica de heterocromatina muy marcada. El telómero del brazo corto es eucromático y hay una zona intersticial eucromática en el brazo largo (ver el esquema de la Figura 33). El cromosoma Z muestra una banda C telomérica. 2700 x.



Figura 34. Ovocito en paquitene de *Columba livia*. Se observan los 39 bivalentes autosómicos y el par ZW (flecha). Las flechas pequeñas señalan algunos nódulos de recombinación y las líneas marcan los cinetocoros de algunos bivalentes. 3600 x. Barra = 10 μ m.

III.4.2. El par ZW de *C. livia* durante la meiosis

III.4.2.1. Sinapsis e igualización

El análisis ultraestructural de la meiosis femenina en *C. livia* se realizó sobre una muestra de más de 80 micrografías electrónicas de ovocitos en paquitene, coloreados con nitrato de plata o PTA (Figura 34). En los ovocitos en paquitene, el par ZW aparece como el único bivalente que forma un CS de elementos laterales desiguales (Figura 35), comprobándose la existencia del mismo proceso de ajuste de longitudes descrito en otros pares ZW aviaros (ver Introducción y Secciones III.1, 2 y 3). La longitud del eje Z disminuye en promedio un 30 %, al tiempo que da vueltas alrededor del eje W, que permanece lineal, y las porciones no apareadas de los ejes están engrosadas (Figura 36). La variación de longitud del eje Z permite identificar la secuencia de los tipos morfológicos LAS-MAS-Igualizados (ver definiciones previas), mientras la longitud del eje W no varía de manera significativa (Tabla 6). En etapas muy avanzadas del paquitene el eje Z no muestra ya un trayecto sinuoso y su longitud es casi idéntica a la del W, por lo cual en ocasiones resulta difícil identificar al par sexual dentro del complemento, en estos estadios tardíos.

Tabla 6. Longitudes absolutas (en μm) de los ejes Z y W de *C. livia* durante el proceso de igualización.

	LAS	MAS	Igualizados	Valor P ^(a,b)
Longitud (Z)	22.8 ^a	18.8	15.7 ^b	0.0001
DS	1.97	1.52	2.10	
n	13	9	12	
Longitud (W)	14.9	14.6	14.1	NS
DS	1.57	1.17	1.70	
n	14	9	12	
IC (Z)	0.41	0.41	0.43	NS
DS	0.03	0.04	0.02	
n	10	7	10	
IC (W)	0.41	0.43	0.42	NS
DS	0.04	0.02	0.03	
n	6	6	8	

IC = índice centromérico.

La longitud relativa del eje Z (7.8 % del total del complemento de CSs) y la del eje W (5 %) son algo mayores que las longitudes relativas respectivas en los cromosomas mitóticos. Esto puede



Figura 35. Par ZW de la célula de la Figura 32, en estadio de segmento asináptico medio (MAS). Las flechas señalan las regiones diferenciales no apareadas de los ejes Z y W. Las puntas de flecha marcan los nódulos de recombinación particulados en los complejos sinaptonémicos autosómicos y en el extremo sináptico del par ZW. c y c': cinetocoros del Z y del W. 9000 x. Barra = 1 μ m.

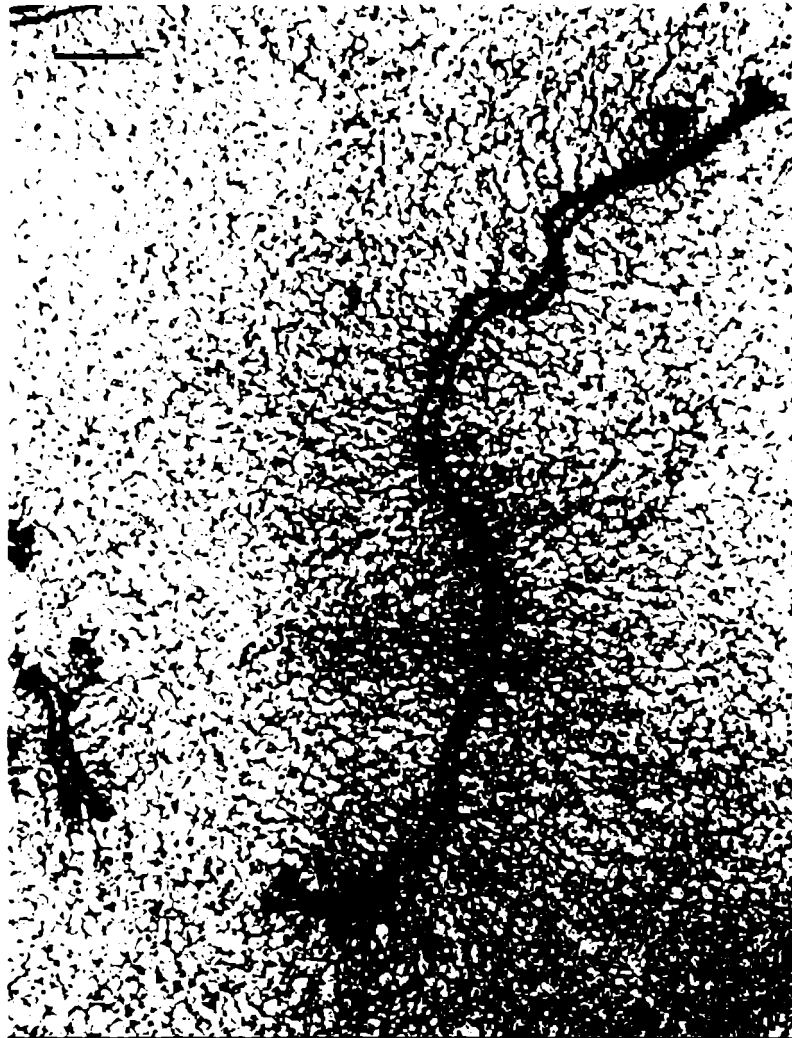


Figura 36. Par ZW de *Columba livia* en estado intermedio entre MAS e igualizado. El eje Z sigue un trayecto sinuoso alrededor del eje W. Cerca del extremo sináptico se observa el único nódulo de recombinación del par sexual. c y c': cinetocoros del Z y del W. 11000 x. Barra = 1 μ m.

deberse a que en el material analizado de paloma, la mayoría de los pares ZW de tipo LAS estaban incompletamente apareados, es decir, se encontraban en etapas tempranas de la sinapsis, quedando sometidos a estiramiento los segmentos libres de los ejes sexuales. Sin embargo, esta distorsión no fue muy pronunciada, puesto que el diámetro del eje no está afectado (es sabido que el diámetro se adelgaza cuando el estiramiento es muy violento). Además, la longitud y el índice centromérico correspondientes al bivalente ZZ en el macho de la paloma tiene una correspondencia muy buena con las medidas del Z mitótico (ver Sección 4.3), apoyando la idea de que, al menos en el eje Z, la desviación en las medidas se debe al estiramiento de los segmentos no sinapsados. En ambos ejes sexuales hay una diferencia clara de longitud entre los brazos, siendo siempre el más corto en ambos gonosomas el que inicia la sinapsis. Este brazo podría corresponder efectivamente al brazo corto del cromosoma W, que frecuentemente puede identificarse en las metafases mitóticas ; además la longitud del eje W es relativamente constante durante el proceso de igualización, y también lo es su índice centromérico (Tabla 6).

III.4.2.2. El par ZW de *C. livia* y el nódulo de recombinación

En los pares ZW teñidos con PTA, se observa un único nódulo de recombinación cerca del telómero que inicia la sinapsis (Figuras 35 y 36). Los NRs en los ovocitos de *C. livia* son muy notables, tanto en el par sexual como en los CSs autosómicos, y tienen una morfología muy particular que se describirá en la sección III.4.4. En el par ZW las distancias entre el NR y el telómero sináptico varían entre 0.42 μm y 1.17 μm , con una media de 0.82 μm (Figura 37).

Los nódulos de recombinación en el par ZW de la paloma se distribuyen exclusivamente en una zona intersticial subterminal, y en ningún caso se observa más de un NR. La distribución de los NRs en una zona intersticial es similar a la observada en el pato Pekín (Figura 24), y en ambas especies hay una distancia de aproximadamente 0.4 μm entre el extremo distal del segmento que lleva los NRs y el telómero sináptico, que está libre de nódulos.

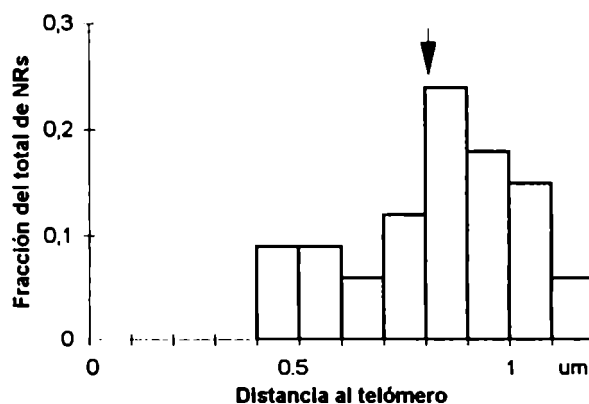


Figura 37. Distribución de las distancias entre el nódulo de recombinación y el telómero sináptico en 33 pares ZW de *Columba livia*. La flecha señala la distancia media al telómero sináptico (0.82 μm).

III.4.3. El cariotipo de complejos sinaptonémicos y el par ZZ en el macho de *C. livia*

El estudio de meiótico en *C. livia* incluyó también el análisis de la meiosis masculina mediante microscopía electrónica y de luz. En los núcleos de espermatocitos en paquitene examinados al microscopio electrónico (Figura 38), se observan los CSs de los 39 autosomas y el CS del par ZZ; este último es el cuarto en longitud (5.9 % del conjunto de CSs), y tiene el cinetocoro en posición mediana ($IC = 0.49$), siendo estos valores muy similares a los registrados en el Z mitótico.

La longitud media del conjunto de los CSs autosómicos en los espermatocitos es $248 \pm 21.2 \mu\text{m}$, mientras que en los ovocitos esta longitud es en promedio $227 \pm 21.8 \mu\text{m}$, y esta diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.005$), aunque no representaría la existencia de una disparidad real entre los complementos de CSs sino que podría atribuirse a causas técnicas. En los espermatozoides de paloma, la cromatina no se dispersa tan fácilmente como en los ovocitos, por lo cual fue necesario aumentar la concentración del detergente (ver Sección II.3.2). Esta variación puede haber provocado una elongación más pronunciada en los bivalentes de los espermatocitos, afectando en mayor medida a los CSs más largos. Esto explicaría que más del 90 % de la diferencia de longitudes entre los CSs del macho y de la hembra se concentra en los tres primeros bivalentes. Además, esta diferencia no se

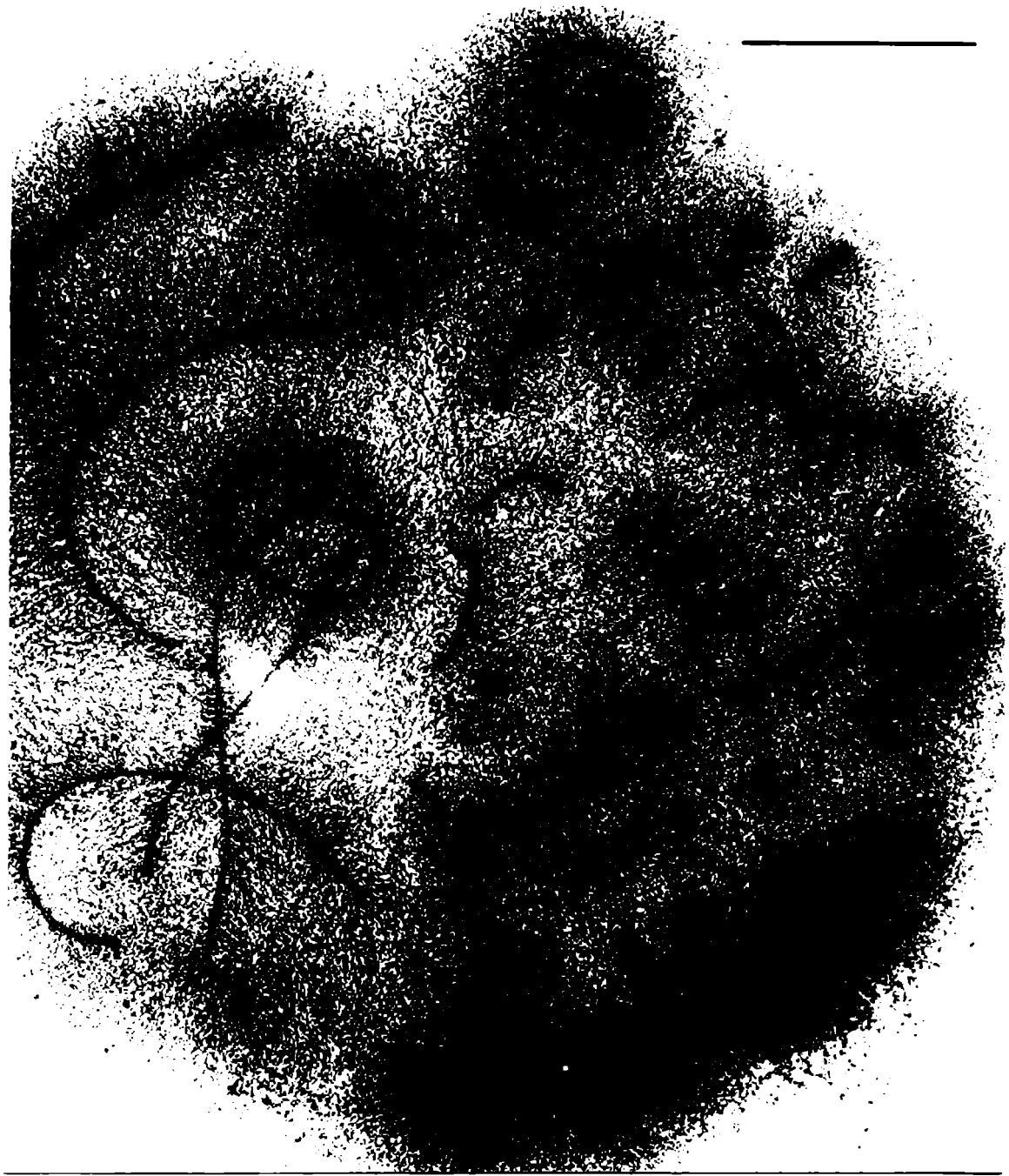


Figura 38. Espermatocito en paquitene de *Columba livia*. Se observan los 39 bivalentes autosómicos y el par ZZ (flecha). Tinción : PTA. 3600 x. Barra = 10 μ m.

Comparación del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos en *Columba livia*

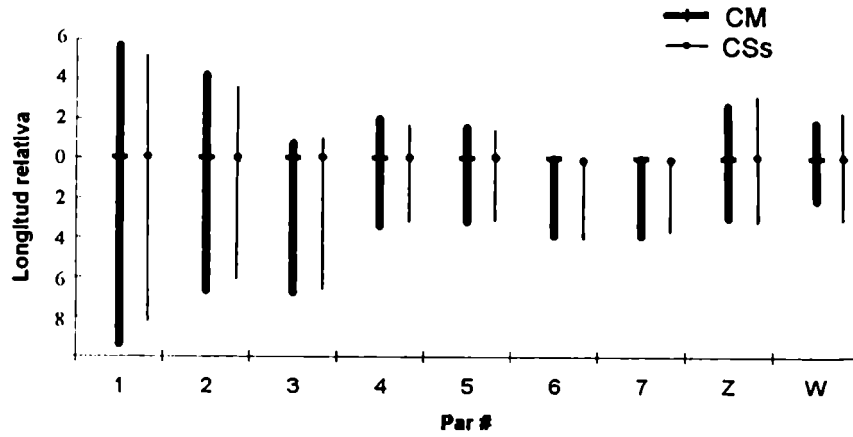


Figura 39. Comparación del idiograma de los macrocromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes en *Columba livia*. Las longitudes relativas están expresadas en porcentaje del lote haploide.

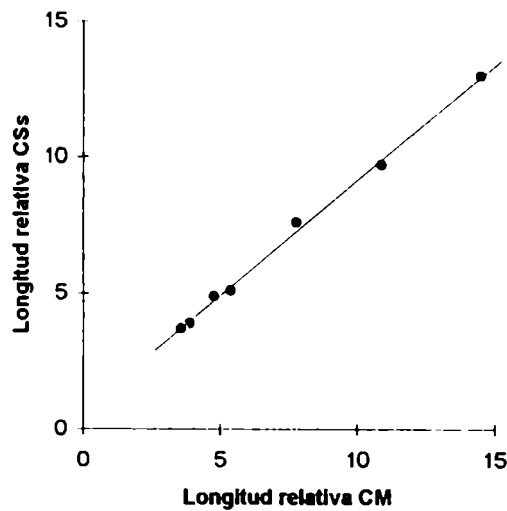


Figura 40. Gráfico de regresión que muestra la proporcionalidad 1 : 1 de las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) en *Columba livia*. El coeficiente de regresión es $r = 0.99$ y la ecuación de la recta de regresión es $y = 1.19x - 0.9$.

traduce en modificaciones de fenómenos biológicos, como la recombinación, que están relacionados con la longitud de los CSs (ver Sección 4.4).

El cariotipo de complejos sinaptonémicos de *C. livia* se construyó a partir de las longitudes relativas de los siete primeros CSs y del eje W, medidos en 20 ovocitos seleccionados, mientras que la longitud relativa promedio del Z corresponde a la longitud promedio del CS del par ZZ en los núcleos de espermatoцитos, por su excelente correspondencia con el Z mitótico, como se explicó al comienzo de esta sección (Figura 39).

Cuando se comparan, mediante una prueba de regresión las longitudes relativas de los 7 primeros autosomas en el cariotipo mitótico con la longitudes relativas de los CSs correspondientes, se observa una relación 1:1 entre ambas, siendo en coeficiente de correlación $r = 0.99$ (Figura 40), a semejanza de lo descrito previamente en las otras tres especies de aves en estos Resultados.

III.4.4. La distribución de los nódulos de recombinación en machos y hembras de *C. livia*

Los nódulos de recombinación de la paloma, son muy conspicuos y se observan claramente en las preparaciones de ovocitos en paquitene inclusive en microfotografías a bajo aumento (Figuras 34 y 38). A diferencia de los nódulos de recombinación observado en otras aves, que son elipsoides y no revelan ninguna subestructura, en *C. livia* cada NR está constituido por una o más partículas muy electrodensas que en general se agrupan en forma de "rosetas" constituidas por 3 a cinco de estas partículas (Figura 35).

Esta circunstancia hace especialmente favorable el análisis comparativo del número y distribución de los NRs en ambos sexos, a partir de micrografías de ovocitos y espermatoцитos teñidos con ácido fosfotúngstico (Figuras 34 y 38). El recuento de nódulos de recombinación revela que no existen diferencias significativas en el número promedio total de NRs en machos (64.7) y hembras (63) de *C. livia* ($P = 0.22$) (Tabla 7).

Tabla 7. Número de nódulos de recombinación y longitudes promedio del complemento de complejos sinaptonémicos en 20 ovocitos y 22 espermatocitos de *C. livia*.

	CSs :Longitud total ± DS (µm)	NRs totales ± DS	Longitud de CS/NR (µm)	CSs (1-10) Longitud ± DS	NRs (CSs 1-10) ± DS
Hembra	227.5 ± 21.8	63.0 ± 4.9	3.6 ± 0.35	137.5 ± 12.9	31.8 ± 4.3
Macho	248.0 ± 21.2	64.7 ± 4.8	3.8 ± 0.30	164.2 ± 14.7	35.1 ± 3.7

La distancia media entre NRs en los bivalentes #1 a #10, es 4.4 µm en los ovocitos y 4.7 µm en los espermatocitos, mientras que en los bivalentes #11 a #39 es de sólo 2.9 µm en los ovocitos y 2.8 µm en los espermatocitos. Esto significa que, en promedio, se producen más eventos de recombinación en los bivalentes más cortos, y esto es así en ambos sexos.

Cuando se grafica el número promedio de NRs en los diez primeros CSs contra las longitudes absolutas promedio de los bivalentes se observa una relación lineal entre ambos, tanto en la hembra (Figura 41), como en el macho (Figura 42).

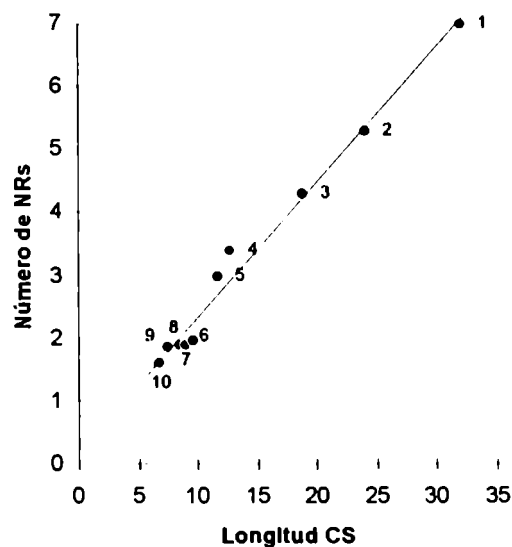


Figura 41. Relación entre la longitud promedio de los diez primeros CSs (µm) y el número promedio de nódulos de recombinación en 20 ovocitos de *C. livia*. La ecuación de la recta de regresión es $y = 0.21x + 0.19$, y el coeficiente de regresión $r = 0.98$. Los números sobre la recta de regresión identifican a los CS #1 al #10.

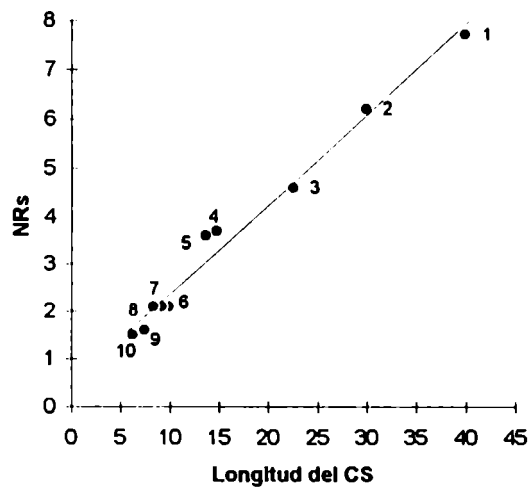


Figura 42. Relación entre la longitud promedio de los diez primeros CSs (μm) y el número promedio de nódulos de recombinación en 22 espermatocitos de *C. livia*. La ecuación de la recta es $y = 0.18x + 0.57$, y $r = 0.98$.

En los microcromosomas esta relación cambia: el número promedio de NRs por microcromosoma (CSs #11 a #39) es 1.02 en el macho y 1.07 en la hembra, lo que refleja la presencia de un sólo NR en la mayoría de los microcromosomas, y que sólo ocasionalmente se observan dos NRs en los microbivalentes más largos.

Las distribuciones de los NRs en los macrobivalentes del macho y la hembra se representan en los histogramas de la Figura 43. Cada bivalente está representado por un histograma en el que el eje horizontal constituye la longitud normalizada del bivalente (ver Sección II.4), dividida en segmentos de $1 \mu\text{m}$ desde el cinetocoro hasta los telómeros; el valor se redondeó al entero más cercano al llegar al telómero. En cada histograma se marca la posición del cinetocoro, de manera que hacia la derecha del mismo se sitúa el brazo largo del bivalente. La posición de cada NR fue definida dentro de los bivalentes individuales en 20 ovocitos y 22 espermatocitos, y posteriormente se representaron las frecuencias totales en los histogramas. En ambos sexos se observa un número relativamente bajo de NRs cerca de los cinetocoros, en tanto que su frecuencia crece hacia los telómeros. El bivalente ZZ del macho tiene, en promedio 3.8 NRs, observándose casi siempre dos NRs en cada brazo.

Comparación de la distribución de nódulos de recombinación en machos y hembras de *Columba livia*

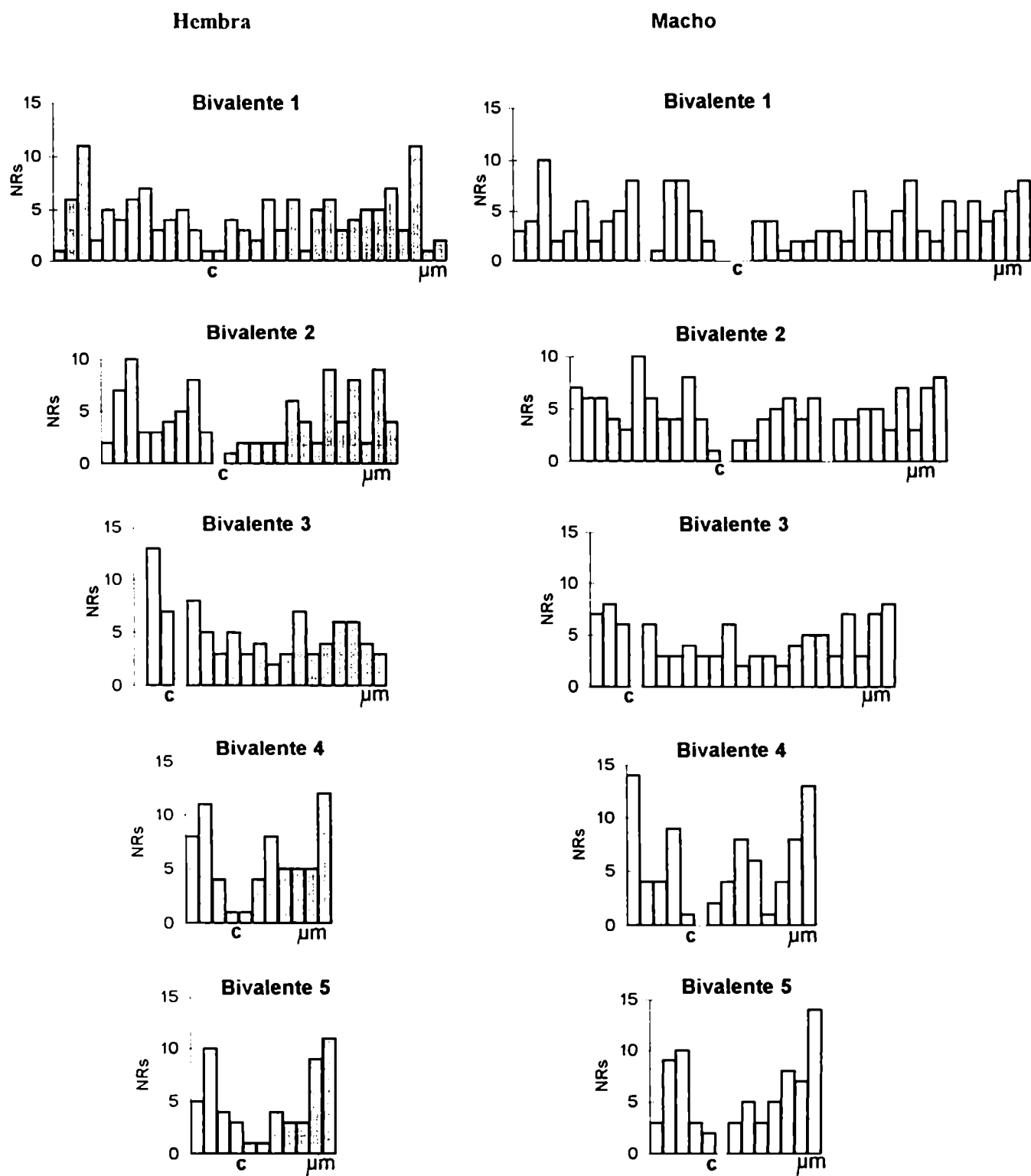


Figura 43 (1ª parte). Histogramas de la distribución de los NRs en machos y hembras de *Columba livia* (continúa en la página siguiente).

Comparación de la distribución de nódulos de recombinación en machos y hembras de *Columba livia*

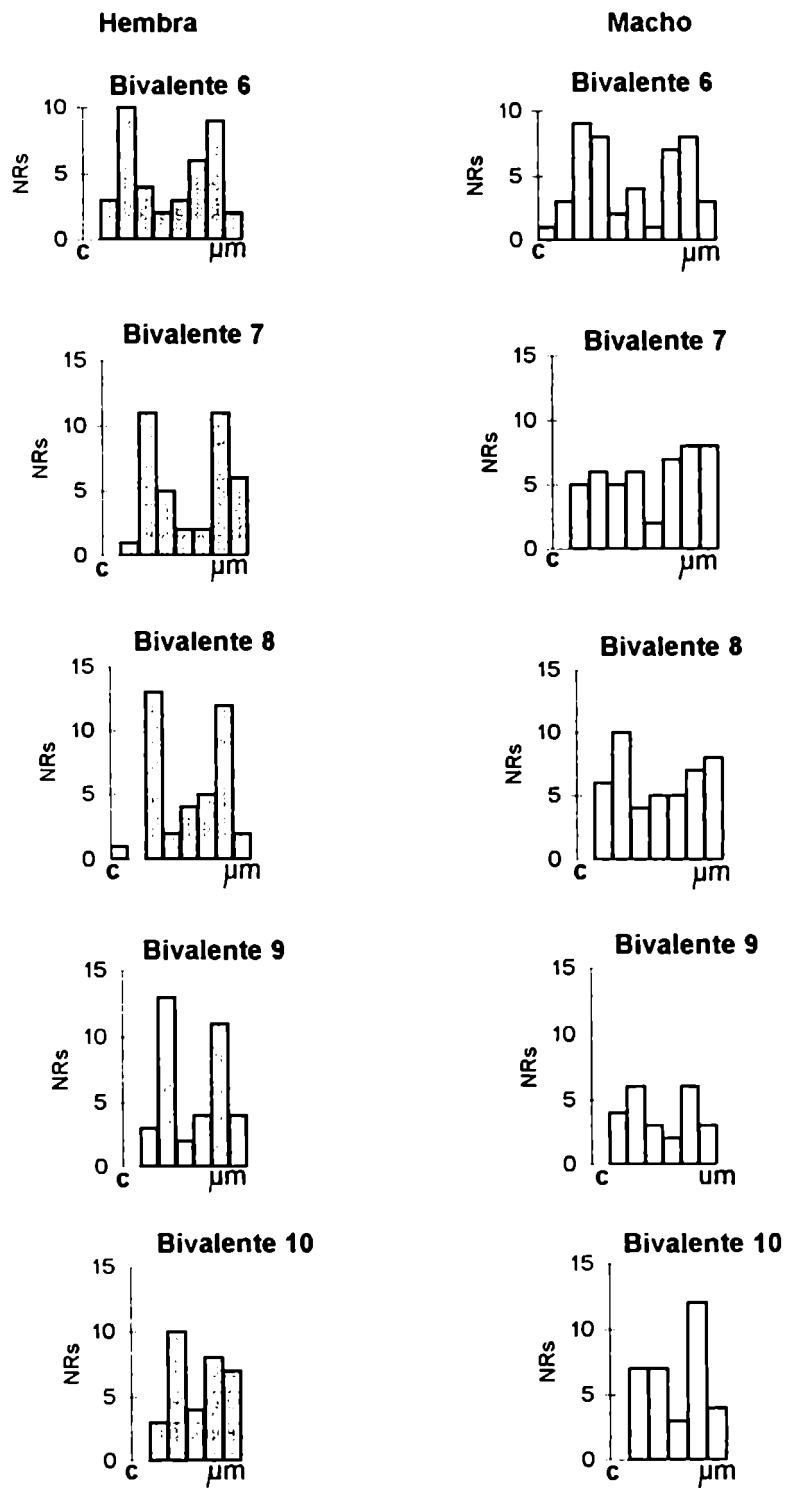


Figura 43 (2ª parte). Histogramas de la distribución de los NRs en machos y hembras de *Columba livia*. El eje horizontal de cada histograma representa la longitud absoluta del bivalente dividida en segmentos de 1 μm . La escala del eje vertical representa el número de nódulos de recombinación. El segmento hacia la derecha del cinetocoro (c) corresponde al brazo largo. La frecuencia de los nódulos de recombinación es muy baja en la zona centromérica y aumenta cerca de los telómeros.

III.4.5. Relación entre el número de NRs y el número de quiasmas en los espermatoцитos de *C. livia*

Los quiasmas de los diez primeros bivalentes autosómicos se contabilizaron a partir de microfotografías de 40 espermatoцитos en diacinesis - metafase I (Figura 44). El número promedio de quiasmas en los diez primeros bivalentes es 34.8 ± 3.3 . Este número no difiere significativamente del número promedio de NRs en los diez primeros CSs ($P = 0.65$) (Tabla 8).

Tabla 8. Número promedio de quiasmas observados en 40 espermatoцитos en diacinesis, comparado con el número promedio de nódulos de recombinación en 22 espermatoцитos en paquitene de *C. livia*.

Par #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ZZ
Quiasmas	8.0	6.4	4.5	3.4	3.0	2.3	1.9	1.9	1.6	1.2	
DS	1.2	0.9	0.7	0.7	0.7	0.5	0.7	0.5	0.6	0.4	
NRs	7.7	6.2	4.6	3.7	3.6	2.1	2.1	2.1	1.6	1.5	3.8
DS	1.1	0.9	0.7	0.6	0.7	0.3	0.5	0.4	0.7	0.5	0.4

En las metafases I, la configuración quiasmática de los microbivalentes sólo se reconoce en los de mayor tamaño, debido a que la mayoría de estos microbivalentes son puntiformes. Sin embargo, de los recuentos se deduce que todos están apareados, y considerando la igualdad del número de quiasmas y el número de NRs en los macrobivalentes, puede generalizarse esta relación de igualdad a los microcromosomas, y por lo tanto, habrá un quiasma por cada microbivalente.



Figura 44. Espermatocito de *Columba livia* en diacinesis. Se observan 39 bivalentes autosómicos y el par ZZ (flecha) que no muestra restricción quiasmática. 2500 x.

III.5. *Poephila guttata*

III.5.1. Los cromosomas mitóticos de *P. guttata*

El análisis del cariotipo mitótico de *P. guttata* se realizó a partir de metafases obtenidas por cultivos cortos de médula ósea, extraída de ejemplares machos y hembras utilizados en los estudios meióticos (Figura 45 a y b). En los recuentos de estas metafases el número cromosómico modal fue $2n = 80$, y en ningún caso se encontró un número superior. El cromosoma Z se identificó por comparación de los cariotipos de machos y hembras como el cuarto par, con un índice centromérico promedio de 0.36, y con una constricción secundaria en el tercio distal del brazo largo. El bandeo C pone en evidencia un bloque heterocromático terminal en el brazo largo del cromosoma Z, y también en el centrómero, mientras que el W aparece como un microcromosoma acrocéntrico, muy heterocromático (Figura 46).

Las longitudes relativas e índices centroméricos promedio de los siete primeros pares autosómicos y de los cromosomas Z y W se calcularon en 12 metafases seleccionadas, a fin de compararlos con los CSs correspondientes. El cromosoma Z representa el 6.1 % del lote haploide y el W un 2.5 %, de manera que la relación de tamaño de los gonosomas es semejante a la encontrada en *A. platyrhynchos* y *N. meleagris*.

III.5.2. Análisis ultraestructural de la profase meiótica femenina en *P. guttata*

El análisis de la meiosis femenina de *P. guttata* al microscopio electrónico se realizó utilizando la misma técnica de sedimentación y secado para procesar el ovario de cuatro hembras de entre tres y siete días de edad (posterior a la eclosión). En los ovocitos en paquitene, se observan los CSs de los bivalentes más largos completamente sinapsados, el par ZW que forma un CS asimétrico y, sorprendentemente, un eje adicional muy largo, sin contraparte homóloga ; además se observa un número variable de ejes no apareados correspondientes a microbivalentes (Figura 47). La conducta de este eje adicional y su relación con la sinapsis de los microbivalentes se describen en detalle en la

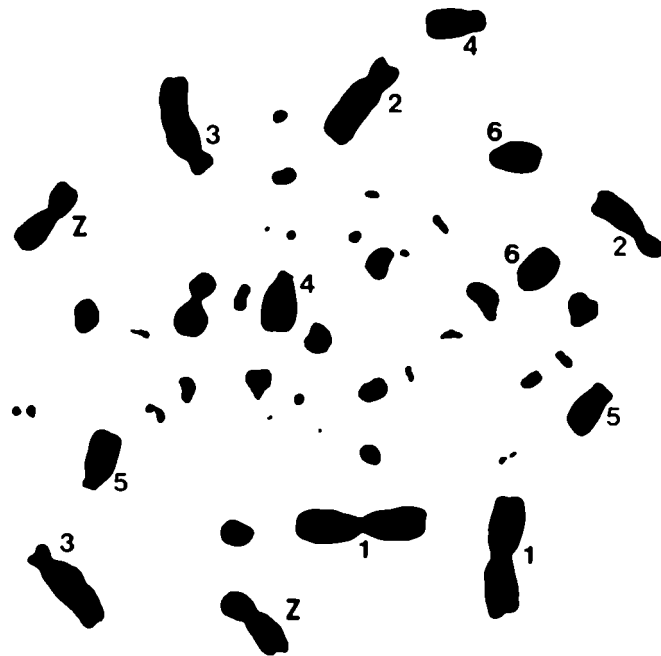
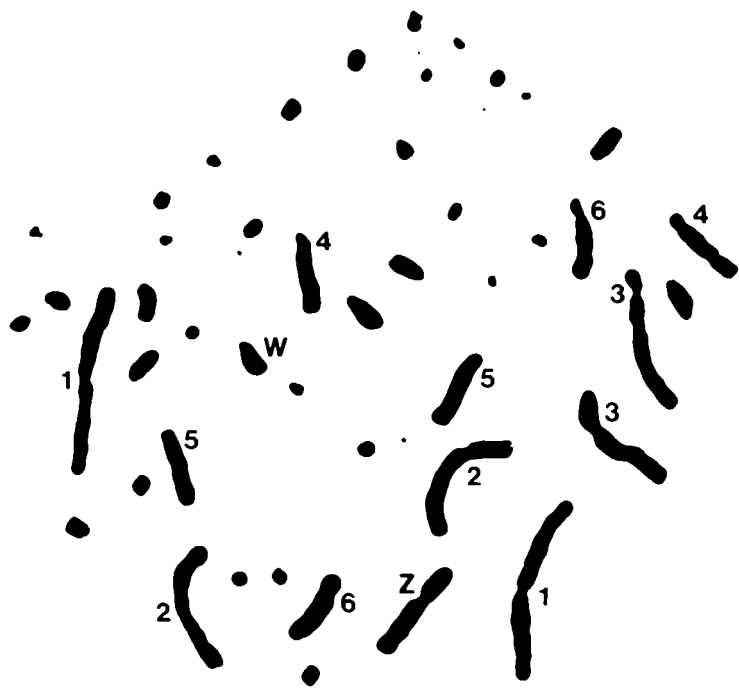


Figura 45. Metafases somáticas de *Poephila guttata* hembra (arriba) y macho (abajo). Se reconocen los pares autosómicos y el par sexual ; el cromosoma B está ausente. 3300 x.



Figura 46. Bando C en *Poephila guttata* (hembra). El cromosoma W es fuertemente heterocromático y el cromosoma Z tiene un bloque de heterocromatina en el telómero del brazo largo. 3200 x.

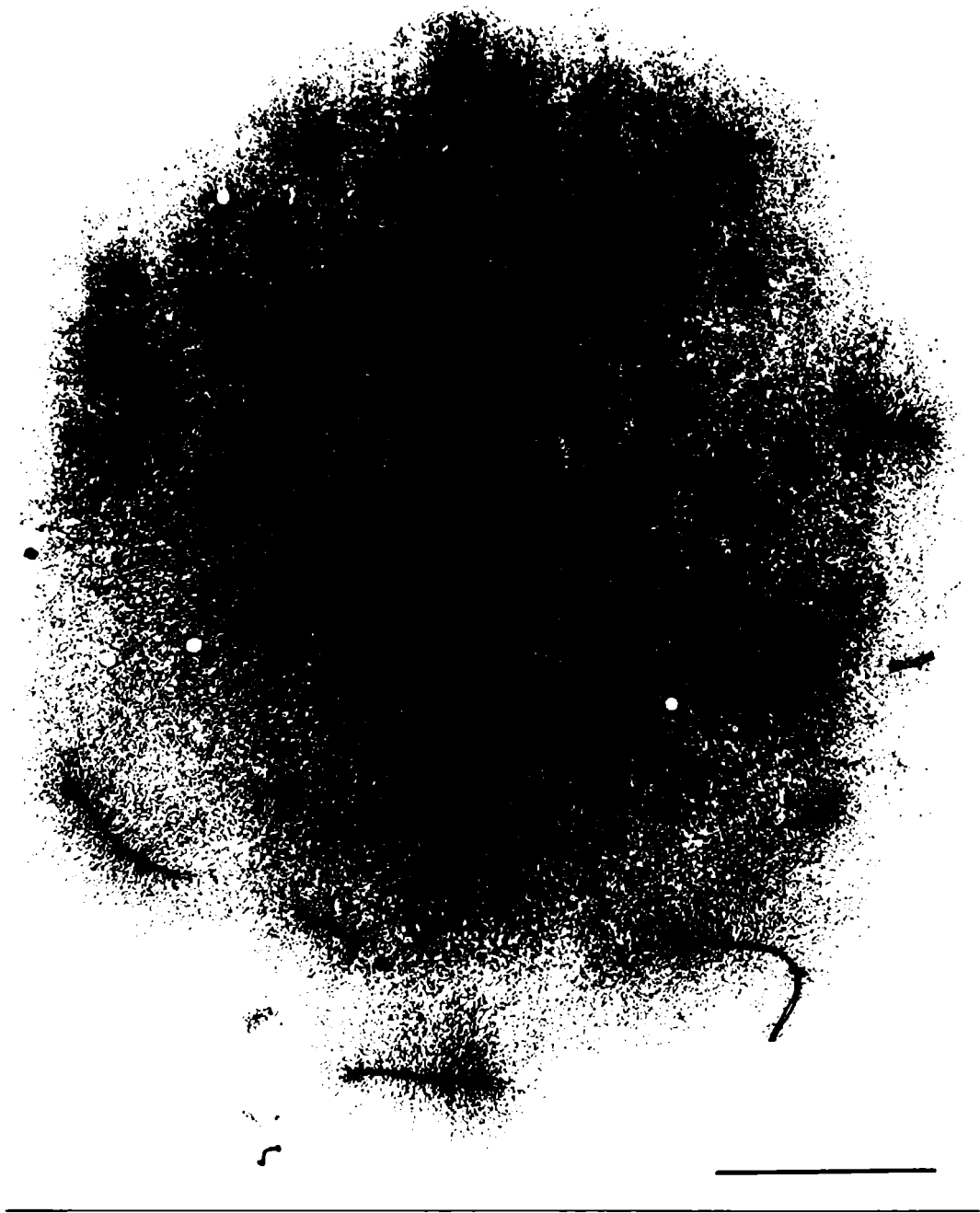


Figura 47. Ovocito de *P. guttata* en paquitene donde se observa el par ZW en estadio de segmento asináptico largo (flecha). El eje accesorio (centro) está enganchado con los CSs #1 y #3. Varios microbivalentes aún no se han sinapsado. 3600 x. Barra = 10 μ m.

sección 5.2.3.

III.5.2.1. El par ZW en *P. guttata*

El par sexual de *P. guttata* forma un CS con elementos laterales desiguales, cuyas longitudes se igualan progresivamente, como se ha descrito en otras especies en estos Resultados. La sinapsis de los ejes sexuales comienza por el brazo corto de ambos gonosomas, y se extiende hasta alcanzar la totalidad de la longitud del eje W ; al mismo tiempo el eje Z inicia su acortamiento, que se evidencia por el trayecto ondulado del eje (Figura 48). La porción asinápica del eje Z está a menudo engrosada y desdoblada como ocurre comúnmente con los ejes no apareados, mientras que el eje es simple en la extensión que forma el CS con el eje W. La longitud del eje Z disminuye marcadamente desde el estadio de segmento asinápico largo (LAS) hasta completar la igualización, y su índice centromérico aumenta por el acortamiento del brazo largo, que es más pronunciado que el del brazo corto (Figura 49). La longitud del eje W muestra un aumento leve pero significativo durante este proceso (Tabla 9). La posición de los cinetocoros tiene una excelente correspondencia con la ubicación del centrómero en los cromosomas mitóticos.

Tabla. 9. Longitudes absolutas (en μm) de los ejes Z y W de *P. guttata* durante el proceso de igualización.

	LAS	Igualizados	Valor P
Longitud (Z)	15.0	11.8	< 0.0005
DS	1.82	2.22	
n	11	22	
Longitud (W)	9.0	10.4	< 0.05
DS	1.38	2.15	
n	11	22	
IC (Z)	0.35	0.42	< 0.005
DS	2.91	4.2	
n	6	21	
IC(W)		0.15	
DS		3.00	
n		24	

IC = índice centromérico

Teniendo en cuenta la posición de los cinetocoros, puede determinarse que la sinapsis de los ejes sexuales comienza por el brazo corto de ambos gonosomas. Cerca del extremo sinápico, se



Figura 48. Par ZW de *P. guttata* perteneciente al núcleo de la figura 47. El eje Z ha iniciado su acortamiento y muestra un trayecto sinuoso en parte de su extensión. Tinción : nitrato de plata. 9000 x. Barra = 1 μ m.



Figura 49. Par ZW igualizado de *P. guttata*. El extremo que inicia la sinapsis pertenece al brazo corto de ambos ejes. La punta de flecha señala el NR. c y c' : cinetocoros de los ejes Z y W. 9000 x. Barra = 1 μ m.

observa invariablemente un nódulo de recombinación, y como en las otras especies de aves carinadas ya descritas, no hay NRs en ningún otro segmento del CSs (Figura 49). La distancia promedio al telómero sináptico es 0.87 μm , y el rango de la distribución de posiciones del NR es 0.5 μm a 1.75 μm (Figura 50).

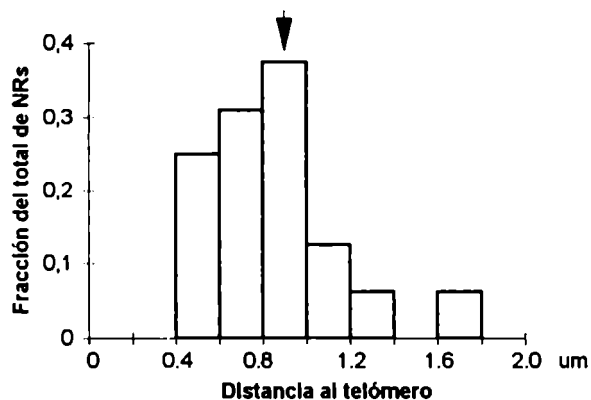


Figura 50. Distribución de las distancias (en μm) desde el NR al telómero que inicia la sinapsis en 16 pares ZW de *P. guttata*. La flecha señala la distancia media al telómero sináptico.

En *P. guttata* la posición subterminal del segmento donde se localiza el NR, es similar a lo observado en *A. platyrhynchos* y *C. livia*, aunque en el pato Pekín esta zona se encuentra en el brazo largo de los gonosomas.

III.5.2.2. El cariotipo de complejos sinaptonémicos

El cariotipo de CSs se construyó a partir de las longitudes relativas promedio de los siete primeros complejos sinaptonémicos autosómicos; las longitudes fueron calculadas a partir de 20 ovocitos en paquitene, y se compararon en un idiograma junto con las longitudes relativas promedio de los cromosomas mitóticos (Figura 51). Cuando estas longitudes relativas se comparan mediante una prueba de regresión, se observa una excelente relación entre ambos cariotipos ($r = 0.99$) (Figura 52).

Comparación del cariotipo mitótico y los complejos sinaptonémicos en *Poephila guttata*

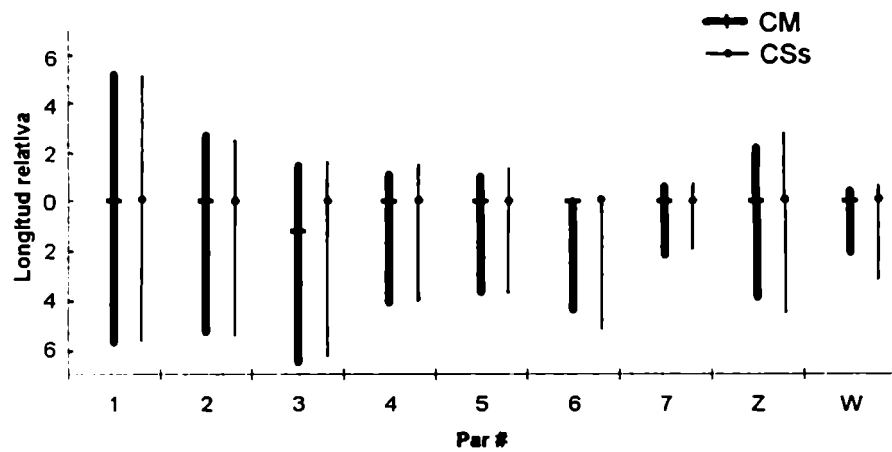


Figura 51. Comparación del idiograma de los macrocromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) correspondientes en *Poephila guttata*. Las longitudes relativas están expresadas en porcentaje del lote haploide.

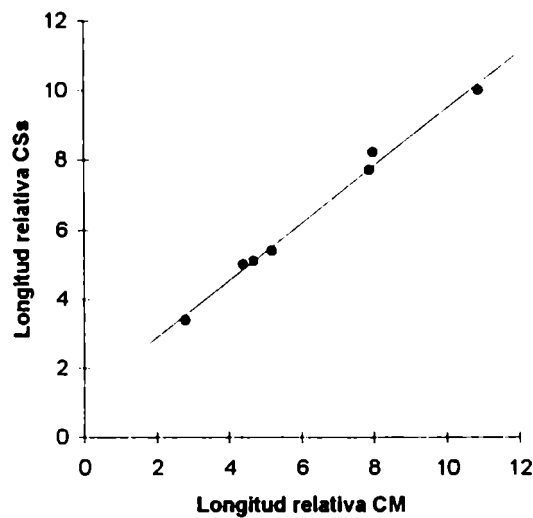


Figura 52. Gráfico de regresión que muestra la proporcionalidad 1 : 1 de las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos (CM) y los complejos sinaptonémicos (CSs) en *Poephila guttata*. El coeficiente de regresión es $r = 0.99$ y la ecuación de la recta de regresión es $y = 0.82x - 1.24$.

La longitud relativa del eje Z medida en los ovocitos, es algo mayor que la del Z mitótico, aunque esta diferencia es menor cuando se mide el CS del par ZZ en el macho (7.1 % del complemento de CSs) ; por lo cual este último valor fue el utilizado para construir el idiograma. La longitud relativa del eje W también es mayor que la del W mitótico, aunque esto podría atribuirse al alargamiento del eje W desde etapas tempranas del paquitene.

La longitud absoluta promedio del complemento de CSs en los ovocitos es de 104.9 ± 21.8 μm , una longitud que resulta excepcionalmente pequeña cuando se la compara con la de los CSs en los ovocitos de otras especies de aves, como las calculadas en este mismo trabajo para *R. americana* (221.2 μm) y *C. livia* (227.5 μm).

III.5.2.3. La presencia de un eje accesorio y su conducta en los ovocitos de *P. guttata*

La observación de los ovocitos en paquitene al microscopio electrónico reveló la presencia de un eje meiótico sin homólogo, en todas las células examinadas (Figura 47). La caracterización de la conducta de este eje surge de la observación al microscopio electrónico de más de un centenar de ovocitos procedentes de tres hembras, y del análisis detallado del eje en 35 micrografías electrónicas seleccionadas.

La comparación del cariotipo de CSs y los cromosomas mitóticos pone en evidencia que este elemento no está presente en las células somáticas de hembras o machos. De la comparación adicional de los CSs y los cromosomas meióticos con microscopía de luz, se deduce que el eje representa un cromosoma accesorio que se encuentra en la línea germinal. El eje accesorio es, claramente, el elemento más grande en los ovocitos en paquitene, y puede presentarse totalmente asináptico, autosinapsado por completo o, más raramente, parcialmente autosinapsado. Cuando se encuentra en estado asináptico se involucra frecuentemente en enganches con los CSs más largos, y el eje aparece engrosado o desdoblado (Figura 53). En ninguno de los núcleos de ovocitos pudo determinarse fehacientemente la ubicación de un cinetocoro a lo largo del eje.

La longitud absoluta del eje accesorio varía según esté asináptico o autosinapsado ; sin embargo, la variación principal se registró entre hembras de dos nidadas diferentes. En una de las hembras la longitud promedio del eje accesorio fue $18.0 \pm 3.6 \mu\text{m}$, mientras que en las otras dos, procedentes de una misma nidada, la longitud media fue $29.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$. El resumen de las longitudes absolutas del eje y las variaciones entre los individuos se presenta en la Tabla 10. En la hembras 2 y 3 el eje apareció casi siempre autosinapsado, por lo que no se incluye la morfología asináptica en las mediciones, y entre estos dos individuos (pertenecientes a la misma nidada) no hay diferencias en las longitudes de los ejes accesorios respectivos.

Tabla 10. Longitudes absolutas (en μm) del eje accesorio en los ovocitos de tres hembras de *P. guttata*.

	Eje autosinapsado (longitud absoluta \pm DS)	Eje asináptico (longitud absoluta \pm DS)	Autosinapsados + asinápticos
Hembra 1	14.7 ± 2.0	19.0 ± 3.4	18.0 ± 3.6
n	3	10	13
Hembras 2 y 3	29.3 ± 2.5	-	-
n	7		

En tanto la presencia del eje representa la existencia de un cromosoma accesorio, las variaciones de tamaño del eje en distintos individuos pueden interpretarse como la existencia de variantes del mismo cromosoma.

El estado asináptico del eje se relaciona de manera directa con la presencia de un número variable (entre 3 y 7 pares) de microbivalentes autosómicos asinápticos (Figura 47). Asimismo, la autosinapsis completa del eje accesorio se observa en etapas tardías del estadio de paquitene, como se deduce de la presencia de pares ZW igualizados en los ovocitos con el eje autosinapsado, y en este momento los microbivalentes están apareados. Por lo tanto, se deduce que una consecuencia inmediata de la presencia del cromosoma accesorio es el retraso en la sinapsis de varios de los microbivalentes más pequeños.

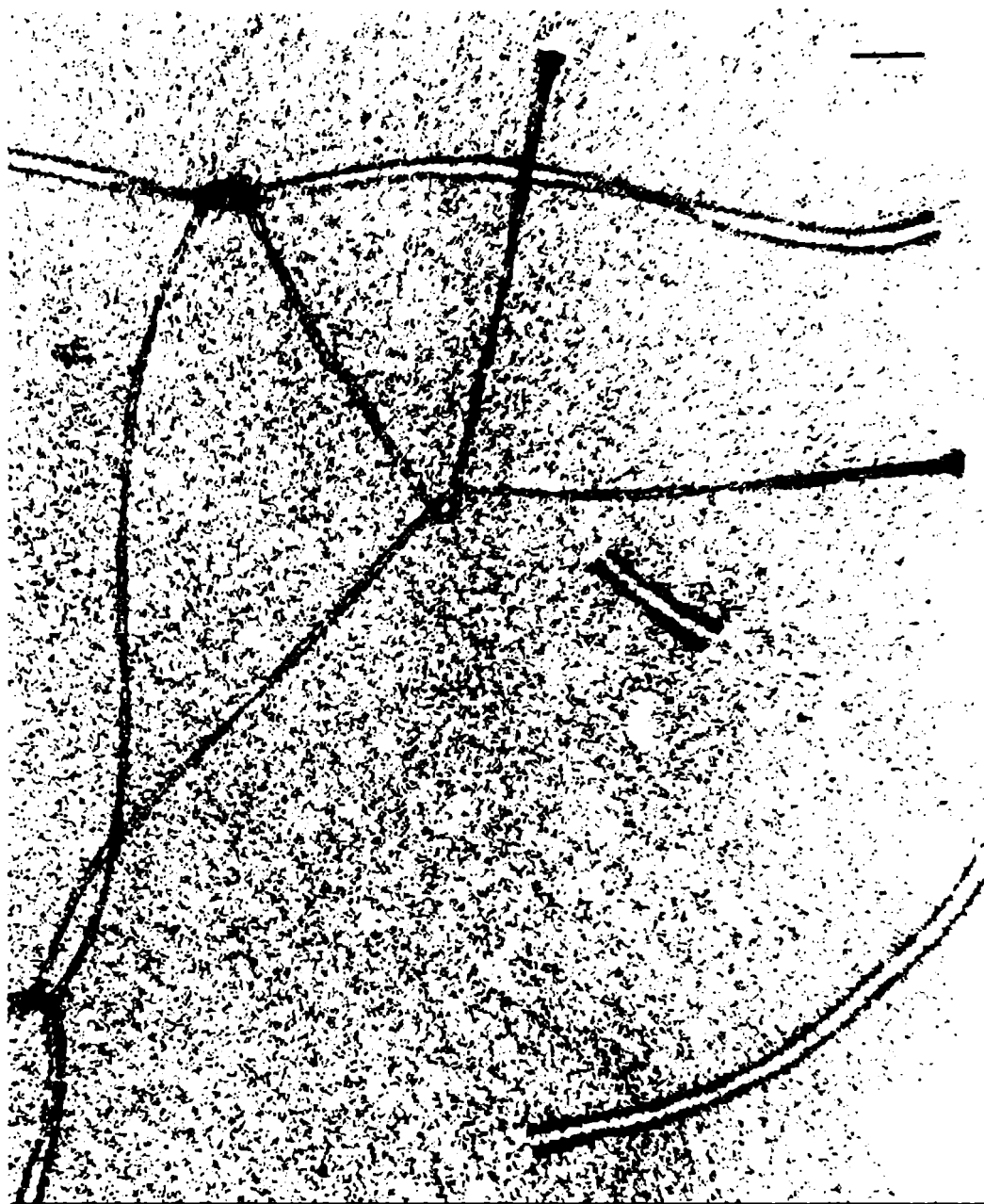


Figura 53. Detalle del eje accesorio de *P. guttata* en un ovocito en paquitene. El eje aparece desdoblado en parte de su trayecto. 10000 x. Barra = 1 μ m.

III.5.3. La meiosis masculina de *P. guttata*

III.5.3.1. Análisis de la meiosis al microscopio óptico

El análisis de la meiosis masculina se llevó a cabo en tres machos adultos, procesando el material testicular para la observación de los distintos estadios meióticos en preparaciones secadas al aire y coloreadas con Giemsa. También se realizaron cortes semifinos de la gonada masculina para su observación al microscopio óptico.

En las metafases espermatogoniales de todos los ejemplares, se encontró un cromosoma sin homólogo, de mayor tamaño que el par #1, que se distingue inequívocamente de los macrocromosomas, los cuales pudieron ordenarse por pares en todas las metafases espermatogoniales analizadas. El cromosoma accesorio en general se muestra heteropicnótico y la posición del centrómero no surge claramente de la observación de las metafases espermatogoniales; sólo excepcionalmente se pudo ver una constricción en posición submediana (Figura 54).

Al mismo tiempo, en todos los ejemplares se observó un cuerpo cromatínico denso en la periferia de los núcleos de espermatocitos en etapas tempranas de la profase meiótica. En el leptotene puede observarse un filamento cromatínico delgado más coloreado que el resto, aunque de grosor similar, que forma un ovillo en uno de sus extremos. El grado de enrollamiento del filamento aumenta a medida que avanza la profase meiótica, y durante el paquitene el grosor del mismo es comparable al de los bivalentes, aunque su coloración más intensa indica un grado mayor de condensación. En este momento el filamento está muy condensado y forma un cuerpo ovoide describiendo un trayecto curvo que deja en su interior una zona estrecha más clara (Figura 55). Este bloque periférico, característico de los espermatocitos, tiene una gran semejanza con el cuerpo XY (o vesícula sexual) que forma el par sexual en los espermatocitos de mamíferos durante el paquitene. Este bloque periférico no se observó en ningún ovocito en preparaciones secadas al aire y realizadas con parte del material de los ovarios utilizados para las preparaciones de sedimentación y secado de microscopía electrónica. Es de subrayar que en los ovocitos observados al microscopio electrónico tampoco existe condensación de la



Figura 54. Metafase espermatogonial de *P. guttata*. El cromosoma accesorio es heteroplicnótico y es el elemento más grande del complemento (flecha). 2600 x.



Figura 55. Espermatocito en paquitene coloreado con Giemsa. El cromosoma accesorio forma un bloque cromatinico denso ubicado en la periferia del núcleo, que simula ser una "vesícula sexual" (flecha). 3200 x.



Figura 56. Espermatocito de *P. guttata* en metafase I. En este estadio el cromosoma B (flecha) es isopcnótico y su cromatina está muy espiralada. 3200 x.

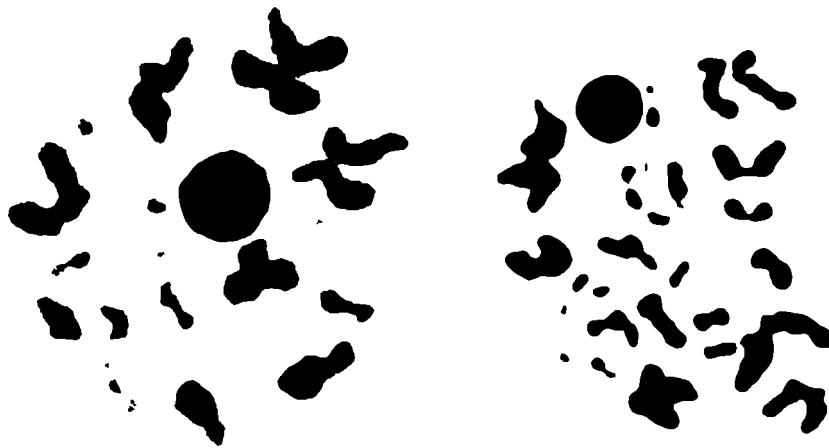


Figura 57. Metafases II de *P. guttata* donde se observa el cuerpo cromatínico denso atribuido a la condensación del cromosoma B. 3200 x.



Figura 58. Túbulo seminífero de *P. guttata* en el que se observan espermátides tempranas con un cuerpo denso en sus citoplasmas (flechas). La flecha abierta señala un espermatocito I en paquitene con el bloque de heterocromatina adosado a la carioteca. 3200 x. Barra = 10 μ m.

cromatina adyacente al gran eje accesorio.

En las metafases I no se observa ningún cuerpo denso, pero siempre está presente un elemento no apareado y de gran tamaño, junto a los 40 bivalentes meióticos, como se esperaría como consecuencia de la existencia del cromosoma accesorio observado en las metafases espermatogoniales. Este cromosoma es isopicnótico, o más comúnmente heteropicnótico negativo, con respecto a los bivalentes meióticos, y a menudo su contorno es difuso (Figura 56).

En las metafases II la morfología cromosómica no permitió individualizar definidamente a todos los macrocromosomas, pero en 8 de 20 metafases II observadas, se encontró un bloque de cromatina esférico, intensamente coloreado, y muy homogéneo (Figura 57 a y b).

Las muestras de material testicular de dos individuos adultos se procesaron para obtener cortes semifinos para analizar al microscopio óptico, y cortes finos para microscopía electrónica, como se describió en la sección 2.5 de Materiales y Métodos.

En los núcleos de los espermatoцитos I, cercanos a la periferia de los túbulos seminíferos, se observó un cuerpo heterocromático denso adosado a la membrana nuclear, que es, precisamente, el bloque periférico de heterocromatina, observado en los espermatoцитos en paquitene en las preparaciones secadas al aire. La extrema densidad de la cromatina no permite reconocer otros detalles ultraestructurales al microscopio electrónico.

Este mismo cuerpo heterocromático se observó en relación con algunas divisiones de espermatoцитos, y nuevamente en el citoplasma de un número significativo de espermátides tempranas (Figura 58).

III.5.3.2. La profase meiótica masculina de *P. guttata* observada al microscopio electrónico.

Presencia de un cromosoma accesorio condensado

El análisis al microscopio electrónico de los espermatoцитos en paquitene de *P. guttata* demuestra la existencia de un bloque heterocromático denso de ubicación periférica, en cuyo interior se

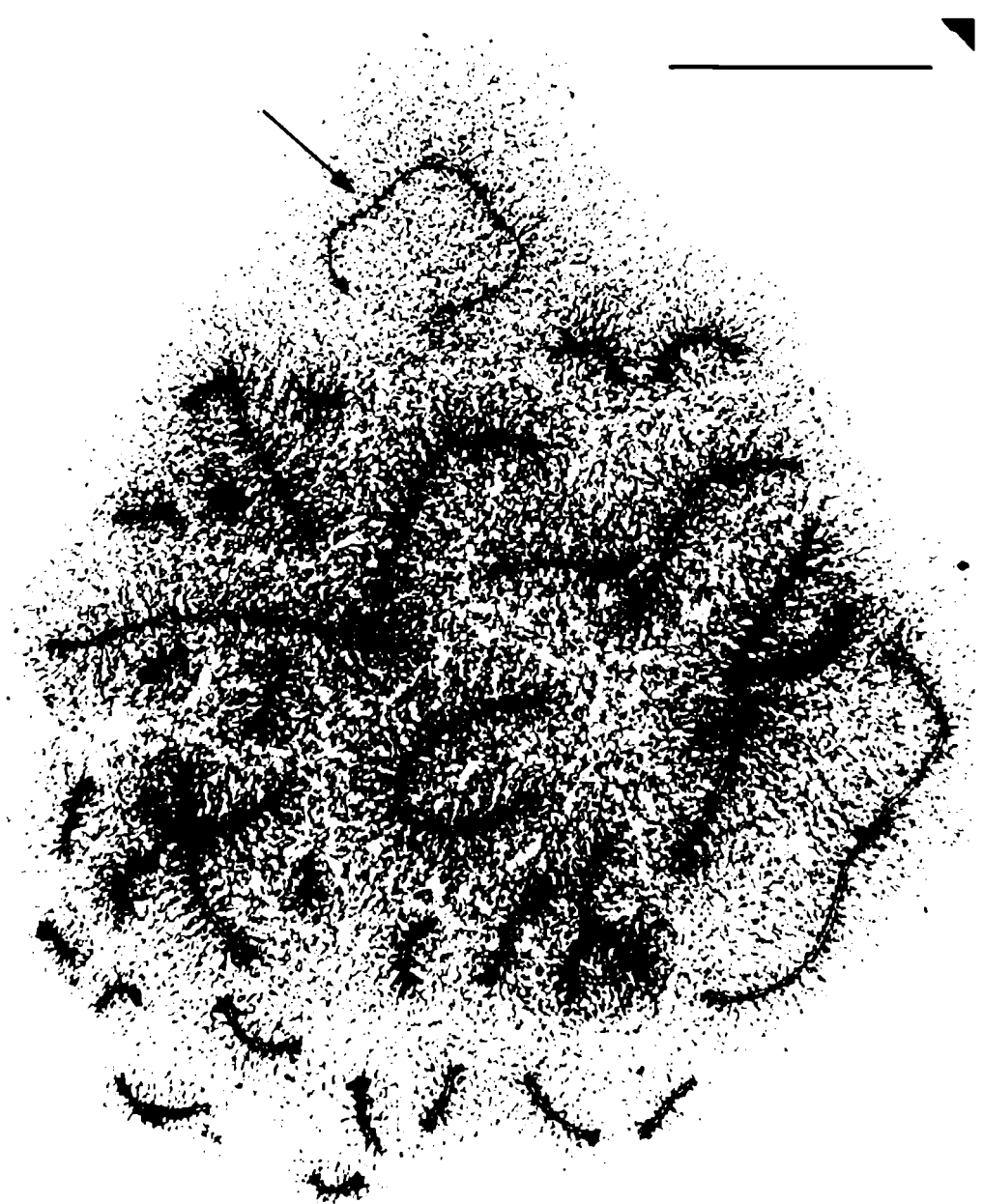


Figura 59. Espermatocito de *P. gullata* en paquitene. En la periferia del núcleo se observa el eje accesorio rodeado por su cromatina densamente empaquetada (flecha). Tinción : nitrato de plata. 3600 x. Barra = 10 μ m.

observa un eje simple (Figura 59). Esta imagen del eje accesorio con la cromatina asociada densamente empaquetada a su alrededor, contrasta claramente con el eje rodeado por la cromatina homogéneamente dispersa (e idéntica a la cromatina asociada a los CSs autosómicos) en los ovocitos de la misma especie. Adicionalmente, la visualización del eje accesorio es extremadamente dificultosa en los espermatocitos, ya que la cromatina asociada al eje no se dispersa con facilidad, aunque sí lo hace la cromatina asociada a los CSs autosómicos y la del par ZZ. El eje accesorio, incluido en este bloque heterocromático, solo pudo observarse claramente, en su recorrido completo en 11 espermatocitos (en preparaciones con un tiempo prolongado de secado) ; en una cantidad similar, el eje se evidencia sólo parcialmente, y en la mayoría de los espermatocitos observados al microscopio electrónico y fotografiados para el análisis de los CSs, sólo se observa el bloque de heterocromatina densamente empaquetado, que enmascara la tinción del eje.

Las mediciones de los ejes accesorios completamente visibles, pertenecientes a un mismo ejemplar, dan una longitud media de 14.9 μm .

Los complejos sinaptonémicos autosómicos son comparables en longitudes relativas e índices centroméricos con las observadas en los ovocitos, aunque la longitud total del complemento de complejos sinaptonémicos, calculada a partir de seis espermatocitos en paquitene, es 143.8 ± 23.0 , significativamente mayor que en las hembras. El par ZZ mostró una mejor relación con el Z mitótico que el eje Z de los ovocitos, por lo cual su longitud relativa (7.1 %) e índice centromérico (0.37) se utilizaron en la construcción del idiograma de CSs.

DISCUSION

IV.1. Características generales del complemento cromosómico en la clase Aves

El cariotipo aviario se caracteriza por la presencia de números cromosómicos altos y una gran cantidad de microcromosomas. Aunque los números diploides varían entre 40 (*Burhinus oedicnemus*) y 126 (*Upupa epops*), el análisis de las frecuencias de los números cromosómicos de 484 especies cariotipadas muestra una distribución bimodal, con un pico principal alrededor de 80-82 y otro menor cerca de 66-68 (Capanna et al., 1987). Mientras que el pico más grande, de números cromosómicos más elevados, concentra representantes de casi todos los órdenes, el pico menor está casi exclusivamente constituido por los órdenes Falconiformes y Ciconiiformes. Prácticamente todas las variaciones del número diploide se deben a las diferencias en la cantidad de microcromosomas, en tanto que el número de los macrocromosomas permanece relativamente conservado. El único grupo que se aparta notablemente de este esquema conservado, es la familia Accipitridae (Falconiformes), en la que han sido cariotipadas 41 especies, de las cuales 37 tienen un $2n$ entre 66 y 68 y solamente 8 a 10 microcromosomas. Las explicaciones acerca de la causa de esta drástica disminución de los microcromosomas en este taxón, entran en un terreno meramente especulativo, ya que no hay estudios de bandeado cromosómico que permitan comparar el cariotipo de los accipítridos con el de otros Falconiformes que tienen un número elevado de microcromosomas, para identificar los rearrreglos involucrados en el reordenamiento del cariotipo.

Un grupo especialmente homogéneo en su cariotipo es el de las Ratitae : los cromosomas del kiwi, son idénticos a los del emu y el casuario; el cariotipo del avestruz difiere solamente por la presencia de un brazo algo más corto en el par #2, y los cariotipos de las dos especies de ñandú se distinguen por la posición submediana del centrómero en el par #5 (Takagi et al., 1972 ; De Boer, 1980). Esta estructura cariotípica se considera ancestral en la clase aves y podría haber permanecido sin cambios durante un período de aproximadamente 100 millones de años, si se considera un origen monofilético para el grupo. La morfología metacéntrica o submetacéntrica del par #1, y la morfología

acrocéntrica del par #3 están ampliamente extendida en órdenes muy diferentes. Adicionalmente el patrón de bandas G de los tres primeros macrocromosomas es muy similar en especies de 9 órdenes aviarios distintos incluyendo una Ratitae (Takagi y Sasaki, 1974).

La identidad del patrón de bandas G de los macrocromosomas de las ratites y los de una especie mucho más distante en la filogenia aviaria como el pato Pekín, *Anas platyrhynchos* (Anseriformes) (Ansari et al., 1988), es otra muestra del grado de conservación del cariotipo aviario, que no tiene comparación con lo que ocurre en otras clases de vertebrados, en las que no es posible o no tiene significado realizar comparaciones cariotípicas entre categorías taxonómicas tan elevadas.

Esta conservación del genoma aviario es coincidente con una escasa variación del contenido de ADN en toda la clase (Wagenmann et al., 1981 ; Venturini et al., 1988). El valor 2C promedio calculado a partir de un extenso muestreo de 135 especies de 17 órdenes diferentes resultó 2.8 ± 0.33 pg, siendo estos valores los más bajos entre los vertebrados (Tiersch y Wachtel, 1991). En los reptiles, los vertebrados más cercanos evolutivamente a las aves, el contenido de ADN por núcleo diploide varía entre 3.5 y 10 pg, y este rasgo está acompañado por una amplia variabilidad del cariotipo (Olmo, 1986).

La conservación del tamaño del genoma aviario puede reflejar el origen monofilético de la clase aves a partir de un precursor reptiliano con un genoma reducido. El valor C puede haberse conservado por el mantenimiento de las secuencias repetitivas en una proporción baja con respecto a las secuencias únicas, ya que los genomas aviarios más grandes están asociados al aumento de ADN de copia única más que al incremento de secuencias repetitivas (que son proporcionalmente más escasas que en otros vertebrados) (Stephos y Arrighi, 1974 ; Olmo et al., 1989).

La existencia de una estructura cariotípica conservada, con la diferenciación de macrocromosomas y microcromosomas en taxones muy distantes en la filogenia, también constituyen importantes evidencias en favor del origen monofilético de la clase Aves. Nuestra evidencia en esta Tesis apoya esta conclusión general.

IV.2. Presencia de un único sistema cromosómico sexual en la clase Aves

Desde la certificación de la existencia de un cromosoma W en la gallina (Frederic, 1961), y luego del advenimiento de las técnicas modernas de citogenética, todos los estudios cromosómicos en las aves han confirmado la existencia de un mecanismo de cromosomas sexuales de tipo ZZ/ZW, con heterogametismo femenino. Las revisiones más recientes contabilizan entre 484 y 521 especies de aves cariotipadas, y en ningún caso se han encontrado discrepancias en el sistema de los cromosomas sexuales (De Boer, 1984 ; Capanna et al., 1987). Aunque el número de especies cariotipadas no supera el 6% de las casi 9000 especies de aves conocidas, 25 de los 26 órdenes tienen al menos una especie cariotipada, por lo cual el muestreo puede considerarse extenso, teniendo en cuenta la uniformidad del cariotipo aviario.

Sin embargo, son pocas las especies en las que se han empleado técnicas de bandeo, especialmente bandeo C, el cual sería imprescindible, en la mayoría de los casos, para identificar al cromosoma W entre los numerosos microcromosomas. De los varios centenares de trabajos dedicados a la citogenética aviaria hasta 1984, menos de 50 publicaciones acompañaban el cariotipo de tinción sólida con bandeo C o, alternativamente, un análisis de la replicación (por incorporación de BrdU) (De Boer, 1984). En la mayoría de los casos la identificación del par sexual se realiza estudiando comparativamente los dos sexos o, simplemente, el sexo femenino, con lo cual el cromosoma W se identifica de manera tentativa ; o directamente no se señala.

Aunque los estudios detallados de los cromosomas sexuales en la mitosis aviaria son relativamente escasos, se puede identificar una serie de variantes morfológicas en el cromosoma W, (que comprende una disminución de su tamaño y la adquisición de heterocromatina) desde las aves más primitivas (Ratitae) hasta las aves carinadas más evolucionadas. Entre las ratitae, el par ZW presenta un alto grado de homomorfismo pero la diferencia de tamaño en el par sexual no es la misma en cada especie : es muy escasa en el emu (*Dromaius novaehollandiae*) y el kiwi (*Apteryx australis*), mientras que el Z y el W de *R. americana* y, especialmente, la rhea darwiniana (*P. pennata*), muestran

una mayor diferencia de tamaño (Takagi et al., 1972 ; De Boer, 1980 ; Ansari et al., 1988).

En el presente trabajo de Tesis se comprobó la presencia de heterocromatina constitutiva en posición centromérica en el par sexual de *R. americana*. Adicionalmente se observó que el pequeño brazo corto del cromosoma W también es heterocromático, aunque se colorea más débilmente que la región centromérica (Sección III.1.1 ; Figuras 6 y 7). Por el contrario, estudios previos en esta especie describen al par sexual de *R. americana* libre de heterocromatina ; y no detectan segmentos de replicación tardía en el par ZW (Ansari et al., 1988). Esta diferencia puede deberse a que estos segmentos de heterocromatina son pequeños y pueden pasar inadvertidos si no se estudia un número significativo de células ; y el trabajo citado (Ansari et al., 1988), comprende un relevamiento general en varias especies, mientras que en el presente trabajo de Tesis, la atención se focalizó en los cromosomas sexuales en cada especie analizada.

A diferencia del cromosoma W principalmente eucromático de las Ratitae, en las aves más modernas, el cromosoma W es casi completamente heterocromático y su tamaño es semejante a los microcromosomas. Esta característica se observó en 3 de las especies de aves carinadas estudiadas en esta Tesis : *N. meleagris*, *A. platyrhynchos* y *P. guttata*. El cromosoma W de *C. livia*, aunque es mayormente heterocromático, tiene dos bandas de eucromatina y un tamaño comparativamente mayor que el de las otras especies mencionadas (Figuras 32). Los estudios citogenéticos en otros Columbiformes revelan que la presencia de eucromatina y el tamaño mayor del cromosomas W es relativamente frecuente en este grupo, y en *C. picazuro* la eucromatina llega a constituir un 23 % del cromosoma (De Lucca, 1984). Esta cantidad inusual de eucromatina en el W de un grupo evolutivamente moderno, como las Columbiformes, no puede interpretarse como un estadio temprano de diferenciación del cromosoma ; será tratado en la siguiente sección.

Como se explicó anteriormente la aplicación sistemática de bandeo C permite asegurar la identificación de los cromosomas sexuales y descubrir sus variantes morfológicas. Sin embargo, los estudios de los cromosomas mitóticos de las aves encuentran limitaciones en el tamaño relativamente

pequeño de los mismos, que imposibilita la identificación de la mayoría de los pares cromosómicos y con ello la detección de polimorfismos que afecten a los cromosomas de menor tamaño. Por el contrario, la identificación de cada par autosómico y la detección de variantes morfológicas en heterocigosis, puede realizarse de manera irrefutable mediante el análisis de los CSs en extendidos para microscopía electrónica. Las alteraciones morfológicas de los cromosomas tienen su expresión en los ejes meióticos, como ser los lazos originados por las longitudes desiguales de los ejes de cromosomas homólogos que difieren por una duplicación o inversión (Moses y Poorman, 1981 ; Moses et al., 1982a y b), o los multivalentes que se observan en casos de traslocaciones recíprocas en el pollo (Solari et al., 1988), ratón (Solari, 1971 ; Johannisson y Winking, 1994) y en otras especies. Por estas razones, la identificación del par ZW como el único complejo sinaptonémico de elementos laterales desiguales en los ovocitos de 5 órdenes aviarios, como se presentan en esta Tesis, constituyen, junto a los estudios similares ya publicados por nuestro grupo de trabajo, la corroboración más sólida acerca de la existencia de un único sistema cromosómico de determinación sexual en la clase Aves.

La conservación del sistema cromosómico sexual en las aves se destaca entre los vertebrados, ya que los reptiles son ampliamente variables en este sentido, encontrándose sistemas cromosómicos de tipo XX/XY, ZZ/ZW, y sistemas de cromosomas sexuales múltiples derivados de ambos (Bull, 1983 ; Olmo, 1986). Esta aparente rigidez del sistema de cromosomas sexuales en las aves, puede ser interpretada como una consecuencia del origen único de la clase. Sin embargo, la amplia variedad de especies aún no estudiadas cariológicamente, no permite excluir la existencia de variantes de este sistema, lo que reafirma la necesidad de ampliar las investigaciones de los cromosomas mitóticos y extender los estudios ultraestructurales de la meiosis aviaria.

IV.3. Características básicas y características variables del par ZW en la meiosis aviaria

IV.3.1.A. Características generales de los ejes meióticos

En el estadio de leptotene de la profase meiótica en la mayoría de los eucariontes, cada

cromosoma homólogo desarrolla un eje proteico en toda su longitud, que luego forma el elemento lateral de un complejo sinaptonémico, cuando los cromosomas homólogos se sinapsan durante el paquitene (Moses, 1977a). Durante el diplotene, como consecuencia de la separación de los cromosomas homólogos, los elementos axiales se apartan, permaneciendo próximos únicamente en el sitio de los quiasmas (Solari, 1970b ; Solari, 1981 ; Moens y Spyropoulos, 1995). Durante toda la profase meiótica, cada elemento axial ocupa el intersticio entre las cromátidas hermanas y la cromatina se une al eje formando lazos regulares, y de longitud variable en distintos organismos.

Los CSs formados a lo largo de los bivalentes meióticos están constituidos por un elemento central y dos elementos laterales separados por un espacio central de aproximadamente 100 nm. Esta estructura tripartita del CS se ha mantenido relativamente conservada durante la evolución, y muy probablemente también lo sean los polipéptidos que lo constituyen, lo cual explica su afinidad por las coloraciones con ácido fosfotúngstico y nitrato de plata.

Se conocen varias proteínas que forman los elementos laterales y el elemento central del CS. Dos de estas proteínas han sido identificadas mediante el uso de una genoteca de expresión de ADN copia de hamster y son las mejor caracterizadas hasta el momento : la proteína Cor 1, componente de los elementos laterales ; y la proteína Syn 1, que se localiza en el espacio central (Meuwissen et al., 1992 ; Dobson et al., 1994). La proteína Syn 1 (homóloga de la proteína SCP 1 identificada en el CS de la rata) tiene un peso molecular de 111 kDa, y presenta tres dominios : uno grande, central que formaría una espiral enrollada ("coiled-coil") ; uno amino terminal de tipo ácido ; y uno carboxi-terminal con subdominios básicos, y que tiene afinidad por el ADN, sin especificidad de secuencia. El dominio central de la proteína Syn 1 presenta cierta homología con el dominio fibrilar de la cadena de miosina y otras proteínas capaces de formar filamentos intermedios ; es decir que es capaz de formar asociaciones diméricas de dos α -hélices anfipáticas. El extremo carboxilo presenta el motivo S/T-P-X-X (serina/treonina-prolina-X-X) que es típico de proteínas ligantes al ADN. El gen de Syn 1 se transcribe como un ARN de 4.4 kb exclusivamente durante los estadios de cigotene a diplotene

(Meuwissen et al., 1994), sin que se acumule ARNm. Esto significa que los CSs no se ensamblan a partir de componentes preexistentes en el núcleo, sino que éstos se sintetizan específicamente durante la meiosis, y la cromatina se reorganiza sobre estos elementos, adoptando una estructura espacial nueva. El uso anticuerpos específicos contra la proteína Syn 1, conjugados con un fluorocromo, en preparaciones para microscopía óptica permitió determinar que la proteína Syn 1 es componente del elemento central, pues la señal de localización es discontinua en los espermatoцитos en cigotene y diplotene (cuando los ejes sólo están parcialmente sinapsados), mientras que durante el paquitene la señal forma una línea continua en toda la longitud del CS (Moens y Spyropoulos, 1995). Adicionalmente, hay evidencias que indican que la proteína Syn 1 se orienta con su extremo carboxilo hacia los elementos laterales, de manera que este extremo puede interactuar con la cromatina, mientras que el dominio amino-terminal se orienta hacia el centro del CS. La proteína Cor 1 se localiza en los elementos laterales, tendría un peso molecular aproximado de 30 kDa, y su secuencia de aminoácidos, deducida de la secuencia del gen, muestra similitudes con pM1, miembro de una familia de proteína reguladas por linfocitos. Cor 1 también tiene similitudes con las proteínas que forman filamentos intermedios y tiene repeticiones en héptadas, de manera que podría adoptar la conformación espiralada y dimerica de estos filamentos. La proteína Cor 1 ha sido localizada en los elementos axiales del ratón desde el leptotene, y se acumula en las regiones centroméricas de los bivalentes en estadios postpaquiténicos, segregando reduccionalmente con los centrómeros hermanos en la anafase I (Dobson et al., 1994 ; Moens y Spyropoulos, 1995).

Las evidencias que confirman la idea de que los elementos axiales son simples, y que se ubican entre las cromátidas hermanas formando el eje del cromosoma y no el eje de una cromátida durante toda la profase meiótica, surgieron de la observación de los ejes meióticos en estadios postpaquiténicos. El análisis de espermatoцитos de ratón en diplotene a partir de reconstrucciones tridimensionales y extendidos de CSs, muestra que los ejes meióticos continúan siendo simples en este estadio (aún cuando la duplicidad del cromosoma ya es evidente al microscopio óptico), y que se

separan, siguiendo un trayecto levemente curvo, reflejando de la conducta de los cromosomas homólogos (Solari, 1970b ; Solari, 1981). Los ejes sólo permanecen próximos y nunca se cruzan, ni en ciertos segmentos (regiones de convergencia), que en un estadio temprano están ocupados por una porción de CS y en un estadio posterior están ocupados por fibras de cromatina que van de uno a otro homólogo a manera de un puente (Solari, 1970b ; Westergaard y von Wettstein, 1972). Estas regiones de convergencia han sido interpretadas como quiasmas en base a su número y distribución en los bivalentes autosómicos del ratón ; también por su localización en el par XY del hamster armenio (Solari, 1974b). El hecho de que los ejes meióticos nunca se cruzan en estos sitios indica que los elementos axiales no pertenecen a una sola cromátida, puesto que si así fuera, los elementos laterales (o al menos una parte de ellos) cruzaría al otro lado en el lugar del quiasma, lo cual confirma la idea de que los ejes meióticos se ubican entre las cromátidas hermanas (Solari, 1973 ; Solari, 1981). Estas observaciones realizadas sobre los ejes meióticos al microscopio electrónico, han sido confirmadas posteriormente por observaciones al microscopio óptico de los ejes meióticos del ratón, utilizando inmunofluorescencia para evidenciar la proteína Cor 1 de los elementos laterales. En estas preparaciones, la proteína Cor 1 se localiza a cada lado de los quiasmas intersticiales y el espacio entre los ejes convergentes muestra un puente de cromatina que se tiñe con DAPI (Moens y Spyropoulos, 1995).

Evidencias adicionales en favor de la posición intersticial de los elementos axiales provienen del análisis del cuerpo XY del hamster armenio al microscopio óptico y electrónico. En el par XY del hamster armenio (*Cricetulus migratorius*), los ejes de los cromosomas sexuales son muy gruesos, y al mismo tiempo, en las preparaciones para microscopía óptica, se observa una brecha no coloreada entre las cromátidas hermanas de los cromosomas X e Y durante el paquitene. La comparación de las imágenes del cuerpo XY al microscopio óptico y electrónico permite inferir que los ejes, ubicados intersticialmente, aparecen en imagen negativa (no coloreados) entre las cromátidas hermanas de los cromosomas sexuales al microscopio óptico (Solari, 1974b).

Ocasionalmente, los elementos laterales pueden aparecer como dos hebras, en secciones finas, pero el componente principal del elemento lateral está formado sólo por el elemento externo, más grueso, en vista frontal, al cual se unen los lazos de ADN (Moses, 1968). Las variantes morfológicas de los elementos laterales son comunes en el par XY (muy heteromórfico) de los mamíferos, especialmente a nivel de las regiones diferenciales y luego del paquitene medio, lo cual ha llevado a suponer que las diferencias se presentan cuando hay una constitución asimétrica del bivalente, y como consecuencia de la acumulación de un exceso de material axial luego de que la sinapsis homóloga se ha completado (Solari, 1970b ; Solari y Rahn, 1985 ; Solari et al., 1993). Aunque se ha propuesto que los elementos laterales están formados por tres elementos (Dietrich et al., 1992), o por múltiples filamentos (Del Mazo y Gil-Alberdi, 1986), estas variantes morfológicas no se muestran consistentemente entre preparaciones de un mismo material, por lo que estas suposiciones aún no han sido comprobadas.

La naturaleza indivisa de los ejes meióticos como elemento de unión entre cromátidas, es de fundamental importancia en el comportamiento diferencial de las cromátidas hermanas en la mitosis y la meiosis, como se explica más adelante, y es el fundamento de la organización de la cromatina de los cromosomas meióticos en un patrón de lazos que preanuncian la organización de los cromosomas diploténicos, especialmente descrita en los vertebrados con cromosomas plumulados.

Los lazos de cromatina que se unen a los ejes meióticos tienen una longitud muy variable en diferentes organismos ; por ejemplo en el ratón, los lazos miden alrededor de 3 μm , mientras que en *Sacharomyces cerevisiae* miden apenas 0.5 μm . El mecanismo que regula el tamaño de los lazos no ha sido aclarado, aunque se ha propuesto que algunas secuencias o señales específicas de especie regulan la potencialidad del ADN de formar los lazos, mientras que el tamaño de los mismos estaría controlado por la posición a lo largo del cromosoma (Heng et al., 1996). Esta idea está sustentada porque el ADN procariótico intercalado en cromosomas de ratón no es empaquetado de la misma manera que el ADN hospedador (Heng et al., 1994), sugiriendo así la necesidad de señales o secuencias específicas en el

ADN que potencien la formación de los lazos. En espermatoцитos de ratón, rata y hamster, el tamaño de los lazos teloméricos es menor que el de los lazos intersticiales. En dos especies de hamster estas secuencias se encuentran en posición intersticial en algunos cromosomas, como consecuencia de un proceso de fusión cromosómica natural, y en esta posición las secuencias teloméricas forman lazos largos, del mismo tamaño que el ADN adyacente, por lo cual la secuencia no sería responsable del tamaño de los lazos, sino que este tamaño dependería de su posición dentro del genoma (Heng et al., 1996).

Aunque las evidencias descritas señalan la posibilidad de la existencia de mecanismos comunes de organización en los cromosomas meióticos, no permiten explicar cuál es el que regula el tamaño específico de especie de los lazos de ADN en los distintos organismos. Esta especificidad es una característica que podría relacionarse estrechamente con las diferencias en las tasas de recombinación en genomas de tamaños similares. La escasa cantidad de ADN asociado a los elementos laterales, y la debilidad de las señales fluorescentes en pruebas de hibridación in situ y fluorescencia, no han permitido caracterizar claramente las secuencias de ADN unido a los ejes meióticos.

En los extendidos de CSs para microscopía electrónica, los cinetocoros se observan como espesamientos de los elementos laterales. La posición de estas diferenciaciones de los ejes en las técnicas de microextendidos permitieron establecer su correspondencia con los cinetocoros descritos en secciones finas de células meióticas (Counce y Meyer, 1973). Esto fue posteriormente confirmado por la utilización de marcación inmunohistoquímica específica para los componentes proteicos centroméricos (Moses et al., 1984). Es necesario distinguir entre el centrómero, que es parte integral del cromosoma, y el cinetocoro, que es una estructura proteica asociada a la región centromérica durante las divisiones mitótica y meiótica. En secciones finas, el cinetocoro se observa como una estructura trilaminar, con una placa densa en relación con la cromatina centromérica, y otra placa similar que interactúa con los microtúbulos, separadas por un espacio de escasa densidad. Esta estructura es esencialmente similar en los cromosomas mitóticos y meióticos, aunque la mayoría de los

estudios ultraestructurales se han realizado en cromosomas mitóticos.

El ADN de la región centromérica en los vertebrados está formado por secuencias repetidas cortas de ADN satélite, que divergen notablemente entre especies y aún entre los cromosomas del mismo complemento. Estas repeticiones tienen una secuencia fundamental de 171 pb en el ADN satélite α (o alfoide) del ser humano, y de ~ 120 pb en el satélite menor del ratón (revisado en Willard, 1990). En estos centrómeros aún no se ha podido identificar una secuencia responsable de la dirección del ensamblaje del cinetocoro. La única secuencia común en el ADN satélite de primates y roedores es la secuencia de 17 pb denominada "caja CENP-B" (Muro et al., 1992), aunque no está claro si constituye el verdadero organizador del cinetocoro puesto que no ha sido detectada en el cromosoma Y humano, y se encuentra con escasa frecuencia en al menos una especie de primate (Pluta et al., 1995).

El ADN centromérico está asociado a proteínas específicas (CENPs), que han sido localizadas mediante el uso de anticuerpos presentes en el suero de pacientes con el síndrome CREST de la esclerodermia (Moroi et al., 1980). Entre estas proteínas, la CENP-B se encuentra tanto en los centrómeros activos como en los inactivos, y se asocia específicamente a la secuencia centromérica "caja CENP-B". Otra proteína estrechamente relacionada con el ADN centromérico es la CENP-A, considerada una histona específica de la región centromérica. La proteína CENP-C, en tanto, se encuentra formando el cinetocoro propiamente dicho, y está únicamente en los centrómeros activos (revisión en Willard, 1990). La proteína CENP-C sería el principal constituyente de la placa interna del cinetocoro, evidenciada en los estudios al microscopio electrónico. La placa densa externa estaría constituida por otras proteínas de tipo CENPs, que serían responsables de la interacción con la dineína citoplasmática y los microtúbulos (Pluta et al., 1995).

En los cromosomas meióticos los cinetocoros hermanos están orientados y migran hacia el mismo polo en la metafase I, mientras que en la mitosis se orientan y migran hacia polos opuestos. Los bivalentes meióticos presentan cuatro cinetocoros funcionales (Luykx, 1974; Solari y Counce, 1977), por lo cual la migración conjunta de ambas cromátidas hermanas durante la anafase I no se debe a la

ausencia de cinetocoros individuales para el movimiento de cada cromátida.

Mientras los quiasmas serían responsables de la correcta orientación de los cinetocoros de cada homólogo en la primera metafase meiótica, la migración conjunta de las cromátidas hermanas en la anafase I fue atribuida a la existencia de una "adhesividad" que persistía entre ellas hasta pasada la anafase I en las células meióticas (Maguire, 1974 ; revisado en Maguire, 1990 y 1995). Esta hipótesis está sustentada por la permanencia de un material electrodenso, idéntico al que forma los elementos laterales, en la región centromérica durante la metafase I y la anafase I en espermatoцитos humanos, de rata, hamster dorado, toro y pollo (Solari y Tandler, 1991 ; Tandler y Solari, 1991). Este material axial podría corresponder a la mencionada proteína Cor I (de los elementos laterales), que persiste en los centrómeros luego de la metafase I, y segrega reduccionalmente en la anafase I (Moens y Spyropoulos, 1995). La función del material axial en relación con la segregación también puede inferirse a partir de la observación de algunas variantes meióticas. En el ortóptero *Melanoplus differentialis*, el único cromosoma X del macho segrega regularmente hacia uno de los polos (Nicklas, 1961). Este cromosoma forma regularmente un eje simple en los espermatoцитos en paquitene, y en estadios posteriores se observan remanentes axiales entre las cromátidas hermanas (Solari y Counce, 1977). La orientación hacia el mismo polo de los cinetocoros de ambas cromátidas hermanas es la conducta esperada si las cromátidas permanecen unidas por material axial, especialmente en el centrómero.

Una conducta inversa se observa en los cromosomas sexuales de los hemípteros : las cromátidas hermanas de los cromosomas X e Y se dividen ecuacionalmente durante la anafase I. Los cromosomas X e Y de *Triatoma infestans* no forman ejes durante la profase meiótica, mientras que los autosomas forman CSs regulares (Solari, 1979). De esta manera no existe en esta especie, un material adhesivo que impida la división ecuacional de las cromátidas hermanas de los cromosomas sexuales.

Adicionalmente, en los machos de *Drosophila melanogaster*, que no forman CSs, las cromátidas hermanas están asociadas con la proteína MEI-S322 desde la prometafase I hasta la

metafase II (Orr-Weaver, en prensa, citado por Moens y Spyropoulos, 1995). En resumen, el comportamiento usual de las cromátidas hermanas de los bivalentes meióticos, se atribuye actualmente a un material cohesivo presente entre ambas cromátidas, y que posiblemente, es un constituyente de los ejes meióticos paquiténicos.

IV.3.1.B. Los ejes meióticos en el material aviario

La organización regular de los bivalentes meióticos, y su relación con los elementos axiales, resultan en longitudes relativas constantes y distintivas de los CSs en las células en paquitene, aún cuando las longitudes absolutas varíen de célula en célula (Moses, 1977b). El mantenimiento de estas longitudes en los ovocitos y espermatocitos en paquitene en las 5 especies analizadas en esta Tesis, ha permitido confeccionar el cariotipo de los CSs más largos, a fin de compararlos con los cromosomas mitóticos. En general, se registró una excelente correspondencia entre ambos cariotipos, con coeficientes de regresión entre 0.95 y 0.99, cuando se compararon las longitudes relativas de los primeros siete autosomas y los CSs correspondientes.

La comparación de las longitudes relativas de los ejes sexuales y los cromosomas Z y W mitóticos, se realizó en todas las especies analizadas, excepto en *N. meleagris*, por las razones expuestas en la sección III.3.2. Las medidas de los ejes Z y W de *R. americana* y *A. platyrhynchos* muestran una excelente correspondencia con los cromosomas mitóticos, mientras que en *C. livia* y *P. guttata* las longitudes relativas de los ejes meióticos son algo mayores. Como se mencionó en las secciones III.4.2 y III.5.2 de los Resultados, esta diferencia podría deberse a un estiramiento leve de los ejes sexuales (especialmente en el caso del eje Z no sinapsado), que no es detectable como un afinamiento de dicho eje.

En todas las especies analizadas se determinó la posición de los cinetocoros en los ejes sexuales, verificándose una muy buena correspondencia con los cromosomas mitóticos, y permitiendo determinar en cada caso cuál es el telómero de inicio de la sinapsis de los gonosomas. En *C. livia* el

cromosoma Z es casi exactamente metacéntrico, mientras que en el eje Z siempre pudo identificarse un brazo más corto, que es, consistentemente, el que inicia la sinapsis con el cromosoma W.

IV.3.2. Sinapsis parcial de los ejes Z y W

En las cinco especies analizadas, la sinapsis del par ZW es siempre específica de brazos ; es decir que, en cada caso, el telómero que inicia la sinapsis pertenece siempre al mismo brazo del gonosoma. En *R. americana* y *A. platyrhynchos*, los extremos involucrados en la sinapsis inicial corresponden al brazo largo del Z y del W, mientras que, en *N. meleagris*, *C. livia* y *P. guttata*, los extremos que intervienen en la sinapsis inicial corresponden al brazo corto de ambas cromosomas.

Los pares ZW parcialmente sinapsados, o sea con segmentos libres de ambos ejes, fueron observados con escasa frecuencia (con la excepción de *C. livia*), indicando que luego del reconocimiento inicial, la formación del CS continúa con rapidez, involucrando la mayor parte del cromosoma W. El amplio muestreo realizado en la población de ovocitos en cigotene y paquitene, demuestra que la sinapsis de los ejes sexuales está demorada con respecto a la de los bivalentes autosómicos, pues se encuentran pares ZW separados o parcialmente sinapsados en ovocitos donde los CSs autosómicos están completamente formados ; esto coincide con las observaciones previas en *G. domesticus* y *C. coturnix* (Solari, 1977 ; Solari, 1992).

En *R. americana*, el CS formado entre los ejes Z y W en etapas tempranas del paquitene, tiene una longitud promedio del 96.7 % del eje W, con una frecuencia muy baja de pares ZW incompletamente sinapsados (5 %). La mayor parte de los pares ZW en los que el eje Z aún no ha iniciado su acortamiento, muestran al eje W completamente incluido en el CS.

En *A. platyrhynchos* y *N. meleagris*, el CS formado por el par ZW incluye casi toda la longitud del eje W, excepto un pequeño segmento terminal del brazo opuesto al del inicio de la sinapsis, que no forma parte del CS, y que se presenta como una porción engrosada no alineada con el resto del eje. En etapas posteriores del paquitene, cuando el proceso de igualización ya se ha iniciado,

el eje W queda incluido por completo en el CS (Figuras 22 y 29).

La sinapsis inicial del par ZW de *C. livia* muestra un patrón algo diferente de la progresión de la sinapsis, cuando se lo compara con el de las otras especies de aves carinadas. Aunque el inicio de la sinapsis es específico de brazos, el CS formado en fases tempranas del paquitene es más corto (en promedio 56 % de la longitud del eje W), es decir, que en todos los pares ZW con un segmento asináptico largo (LAS) el eje W mostró un segmento no apareado mucho mayor que el las las restantes especies con cromosomas Z y W muy heteromórficos. Recién cuando el proceso de igualización ya está avanzado, y los pares ZW pertenecen al tipo de segmento asináptico medio (MAS), el eje W es incluido en toda su longitud en el CS (Figura 35). En comparación con las otras aves carinadas analizadas, en las cuales la relación de tamaño de los cromosomas Z y W es aproximadamente 2.5, el W de la paloma es significativamente más grande, y la relación de longitudes Z : W en esta especie es 1.5. Además, luego del bandeo C, el cromosoma W de *C. livia* muestra segmentos alternantes de heterocromatina y eucromatina (Figuras 30 y 31). Estas diferencias de tamaño y de organización de la cromatina, en comparación con los cromosomas W casi completamente heterocromáticos y más pequeños de las demás especies de carinadas analizadas, podrían ser responsables de la menor extensión de la sinapsis inicial, porque implicarían una mayor heterogeneidad del W de *C. livia*.

Entre las especies analizadas, únicamente *R. americana* (Ratitae) muestra una homología extensa a nivel del par ZW, mientras que en las otras especies (carinadas), el W es marcadamente menor que que el Z, fuertemente heterocromático, y con alto contenido de cromatina C+. Sin embargo, en todas las especies analizadas se forma regularmente un CS entre ambos gonosomas cuya longitud es aproximadamente la del eje W en el estadio de paquitene medio. Esta conducta es similar a la registrada en las observaciones previas realizadas en otras aves con cromosomas Z y W muy heteromórficos, y que comprobaron la existencia de una gran extensión de sinapsis no homóloga en el par ZW (Solari, 1977 ; Rahn y Solari, 1986 ; Solari et al., 1988 ; Solari, 1994).

La estricta correspondencia entre ejes Z y W con los cromosomas mitóticos respectivos (tanto

las longitudes relativas como la ubicación de los cinetocoros se corresponden) en todas las especies estudiadas aquí, permiten afirmar que dichos ejes están formados todo a lo largo de los cromosomas Z y W, de la misma manera que en los bivalentes autosómicos. Pero a diferencia de los autosomas, los cromosomas Z y W son mayormente no-homólogos, por lo tanto es lógico suponer que (excepto en *R. americana*), la mayor parte del CS del ZW se forma entre regiones no homólogas.

La existencia de sinapsis no homóloga fue reconocida tempranamente en bivalentes del maíz por McClintock (1933), y existen actualmente numerosas evidencias de la formación de CS entre regiones no homólogas, tales como la presencia de un CS en regiones autosinapsadas en univalentes del maíz (Gillies, 1974) y *B. mori* (von Wettstein et al., 1984); o también, los CSs en bivalentes heterocigotas para rearrreglos cromosómicos (Poorman et al., 1981a y b; Moses et al., 1982).

El análisis de la progresión de la sinapsis en los bivalentes de ratones heterocigotas, ya sea para una duplicación en tandem, o heterocigotas para inversiones paracéntricas, mostró que los requerimientos de homología para la sinapsis (y en consecuencia para la formación del CS) varían durante el cigotene y el paquitene medio (Moses y Poorman, 1981). En los extendidos de CS de ratones heterocigotas para una duplicación en tandem de un segmento cromosómico intersticial, se observa un "bucle", formado por el elemento lateral del homólogo que lleva la duplicación; este bucle tiene una longitud equivalente al segmento duplicado y se encuentra en el sitio correspondiente a la misma. El bucle se observa durante el cigotene y el paquitene temprano, y se reduce en tamaño progresivamente a partir del paquitene medio hasta desaparecer por completo en paquitene avanzado. De esta manera, se forma un CS continuo de aspecto normal, luego de un proceso de "reajuste sináptico" (Moses y Poorman, 1981; Poorman et al., 1981a). En heterocigotas para inversiones paricéntricas, se forman lazos de inversión como consecuencia de la sinapsis de las regiones homólogas durante el cigotene, mientras que el lazo es progresivamente reemplazado por un CS lineal, desde el paquitene medio (Poorman et al., 1981b, Moses et al., 1982). Estas observaciones indican que durante el cigotene la sinapsis se realiza entre regiones de homología, y que este reconocimiento

homólogo es independiente del registro que se logra por la adhesión de los cromosomas homólogos a la membrana nuclear, pues la formación de un lazo de inversión requiere necesariamente la sinapsis de regiones intersticiales. Se ha propuesto que durante esta fase temprana, el ensamblaje del CS está inhibido, excepto en los sitios donde existe reconocimiento homólogo, lo cual conduciría a la sinapsis y liberación de la inhibición permitiendo así la formación del CS (Moses et al., 1982 ; Moses et al., 1984). En las regiones donde no hay homología, la formación del CS es interrumpida y los ejes permanecen no apareados. La fase temprana dependiente de la “homosinapsis” (sinapsis homóloga) terminaría como consecuencia de un “relajamiento” de estas restricciones, permitiendo que la sinapsis proceda entre regiones no homólogas (heterosinapsis) por eliminación de los lazos u otras estructuras formándose un CS lineal, que probablemente proporciona una configuración más estable del bivalente en las etapas posteriores de la meiosis (Moses et al., 1982).

La sinapsis regular entre cromosomas Z y W aviaarios muy heteromórficos, inicialmente demostrada en *Gallus domesticus* (Solari, 1977), y la sinapsis específica de brazos observada en todas las especies analizadas hasta el momento, han conducido a la hipótesis de la existencia de una pequeña zona de homología terminal, responsable del inicio de la sinapsis de los gonosomas (Rahn y Solari, 1986 ; Solari et al., 1988 ; Solari y Pigozzi, 1993 ; Solari, 1994). Esta conducta es similar a la de la región pseudoautosómica o de homología, existente en el par XY de los mamíferos (Solari, 1980a ; Burgoyne, 1982 ; Ellis y Goodfellow, 1989).

Mientras que en el cigotene los bivalentes autosómicos pueden iniciar la sinapsis por cualquiera de los dos pares de extremos homólogos unidos a la carioteca, e inclusive por segmentos intersticiales, un par sexual heteromórfico (aún el par mayormente homólogo de *R. americana*) sólo cuenta con un par de extremos homólogos y por lo tanto se reducen sus posibilidades de encuentro. Por esta razón la sinapsis de los ejes Z y W se encuentra retrasada con respecto a la de los bivalentes autosómicos, de manera similar a lo observado en en el par XY de los mamíferos (revisión por Solari, 1974a y 1994). La relación directa entre la menor probabilidad de encuentro y el retraso de la sinapsis

en el par sexual, está confirmada por el predominio de la sinapsis ZZ sobre la sinapsis ZW en individuos triploides de *G. domesticus* que poseen la constitución gonosómica ZZW (Solari et al., 1991).

Luego del establecimiento de la sinapsis por el encuentro de las regiones terminales de homología, la formación del CS (en el par ZW altamente diferenciado de las aves carinadas) se extiende en condiciones de heterosinapsis, una vez superado el requerimiento inicial de homosinapsis. En *R. americana*, en cambio, la mayor parte del CS se forma entre regiones homólogas, y esto se traduce en la gran extensión inicial del CS (que aún antes del inicio del proceso de igualización ya incluye la totalidad del eje W), y en la simetría del CS en la mayor parte de su extensión.

IV.3.3. El proceso de igualización en el par ZW

La longitud de los ejes Z y W refleja inicialmente la longitud de los cromosomas mitóticos, y como consecuencia de la sinapsis se forma un CS con elementos laterales que se continúan con ejes separados o no, según el estadio, y cuyo tamaño es desigual ; a medida que progresa el paquitene, la diferencia de longitudes se reduce como consecuencia del acortamiento del eje Z y, en *A. platyrhynchos*, también por el alargamiento simultáneo del eje W. Los cambios graduales en los ejes del par sexual muy heteromórfico de las aves carinadas, permiten distinguir una serie de tipos morfológicos clasificados según la longitud del segmento no sinapsado del eje Z (Solari, 1992) : par ZW con segmento asináptico largo (LAS), cuando la longitud del segmento libre del eje Z es mayor que el 50 % de la longitud del CS ; par ZW con segmento asináptico medio (MAS), cuando la porción libre del eje Z está entre el 10 % y el 50 % del CS ; y par ZW igualizados, cuando la porción libre es menor que el 10 % de la longitud del CS, o no hay segmento libre. Los pares ZW de las cuatro especies de aves carinadas analizadas en este trabajo mostraron los tipos morfológicos LAS, MAS e igualizados, mientras que en el par ZW de *R. americana* la diferencia de longitudes es relativamente pequeña, por lo cual esta clasificación no es aplicable.

La cronología de los tipos morfológicos mencionados fue descrita detalladamente en ejemplares de *G. domesticus* de cuatro grupos de edad : desde 1 día antes de la eclosión hasta tres días después de la misma (Solari, 1992). En esta especie la meiosis se inicia de manera asincrónica hacia los días 16-17 de incubación, y la máxima frecuencia de paquitenes se observa un día después de la eclosión ; unos 5 días después de ella muchos ovocitos han alcanzado el estadio de diplotene (Hughes, 1963). En *G. domesticus*, el grupo LAS disminuye de manera continua desde el día 1 antes de la eclosión hasta tres días después, mientras que el tipo igualizado aumenta en el mismo sentido, lo cual permitió deducir que la secuencia temporal de los cambios morfológicos es LAS-MAS-Igualizados (Solari, 1992) (ver Introducción, Figura 3).

En el estudio de las cinco especies realizado en el presente trabajo no se tuvo como objetivo el análisis de la cronología detallada de los cambios morfológicos del par ZW. Sin embargo, se estudiaron ejemplares de diferentes edades (excepto en *N. meleagris*), lo que permite comparar las frecuencias aunque sólo para ciertas edades del ave. En esos casos fue necesario examinar ejemplares de distintas edades debido a la falta de datos en la literatura acerca del desarrollo de la ovogénesis en los grupos aviarios estudiados. En *N. meleagris*, como sucede en otras Galliformes, se encontraron todos los tipos morfológicos de pares ZW en los ejemplares de un día de edad que fueron analizados. En *C. livia* y *P. guttata*, el inicio de la meiosis está retrasado cuando se lo compara con las Galliformes. En ejemplares de cuatro días de edad, de ambas especies, los ovocitos muestran predominantemente pares ZW de tipo LAS, mientras que en ejemplares de 6-7 días de edad los pares ZW están igualizados, y en *C. livia* aparecen algunos ovocitos en diplotene (en *G. domesticus* los diplotenes aparecen al día 5 después de la eclosión). En *A. platyrhynchos*, la máxima frecuencia de paquitenes se encuentra 48 horas antes de la eclosión, encontrándose en ese momento todos los tipos de pares ZW, mientras que 3 días después de la eclosión ya no se observan ovocitos en paquitene. En *R. americana* las preparaciones mostraron una gran cantidad de ovocitos en paquitene en todos los ejemplares examinados, desde una semana antes de la eclosión, hasta el día de la eclosión ; es decir,

que la profase meiótica en *R. americana* es más precoz que en *G. domesticus*. La baja frecuencia de pares ZW con una porción libre del eje Z, y la ausencia de ejes sexuales separados indican que la mayoría de los ovocitos se encontraban en un subestadio avanzado del paquitene. En el momento de la eclosión, algunos ovocitos ya han alcanzado el estadio de diplotene (ver sección III.1.2), a diferencia de lo observado en *G. domesticus* (Solari, 1992).

Estas observaciones confirman la presencia de una secuencia temporal, de los tipos LAS-MAS-Igualizados, en los pares ZW de distintos órdenes aviarios. Se demuestra, además, que el proceso de igualización se verifica a partir del paquitene medio o tardío, luego de la sinapsis parcial de los ejes sexuales en el paquitene temprano (cuando los ejes autosómicos ya han completado la sinapsis).

El proceso de igualización de longitudes de los ejes Z y W, que se ha observado en todas las aves analizadas hasta el momento, implica cambios de longitud significativos en uno o ambos ejes, y lleva a la formación de un CS asimétrico en el que el eje Z da vueltas alrededor del eje W, el cual permanece lineal. En los pares ZW igualizados de las aves carinadas el trayecto sinuoso del eje Z ocupa casi todo el CS, y este eje sólo sigue un trayecto rectilíneo en un segmento terminal corto, correspondiente al extremo que inicia la sinapsis (y que es el lugar donde se observa el NR). En los pares ZW igualizados de *R. americana*, en cambio, el CS es simétrico en la mayor parte de su extensión, y sólo se muestra asimétrico en un segmento terminal correspondiente al brazo corto, y en una parte proximal del brazo largo de los gonosomas. En esta especie, cuando el proceso de igualización finaliza, el trayecto sinuoso del eje Z ha desaparecido, los cinetocoros quedan en registro, y la diferencia de longitudes de los ejes Z y W ($0.7 \mu\text{m}$) es la menor registrada en los pares ZW igualizados de las distintas especies analizadas (Figura 11b). La extensa regularidad del CS del par ZW en *R. americana* (Ratitae), y la asimetría del CS en las aves carinadas, se relaciona directamente con la extensión de la homología entre los cromosomas Z y W en cada grupo aviario: extensa homología Z-W en *R. americana*, escasa homología Z-W en las aves carinadas.

El proceso de igualización de las longitudes de los ejes Z y W es similar a la igualización de las longitudes de los ejes autosómicos en ratones heterocigotas para una aberración estructural tal como una duplicación en tandem (Moses y Poorman, 1981), como se mencionó en la sección previa. Es decir, que la igualización es un tipo particular de "reajuste sináptico", e implicaría un proceso de desinapsis en pequeños intervalos, reorganización del material axial y acortamiento, seguido de la resinapsis de los ejes. La igualización involucra tanto a los ejes autosómicos como a los sexuales, por lo que se puede suponer que es una tendencia inherente a los ejes meióticos no apareados, heterosinapsados o afectados por rearrreglos cromosómicos, y que está presente en muchos otros taxones de vertebrados. Esta suposición está apoyada por la observación del mismo proceso en reptiles ; este proceso fue ilustrado en el par XY heteromórfico de dos especies de lagartos del género *Sceloporus*. En los espermatoцитos en paquitene de ambas especies el eje X se acorta, e iguala la longitud del eje Y, formando un CS con una ondulación asimétrica del eje X (Reed et al., 1990). El proceso de igualización no es exclusivo de los ejes meióticos de los vertebrados, pues un fenómeno esencialmente idéntico ha sido ilustrado (y luego descrito) en relación al par ZW heteromórfico del lepidóptero *Ephestia kuehniella* (Weith y Traut, 1980).

La presencia de igualización en los pares sexuales heteromórficos de aves y reptiles, marca una diferencia sustancial con el par XY de los mamíferos. Este par XY sólo forma un CS incompleto, mayormente en la región terminal de ambos gonosomas, mientras las regiones diferenciales de los ejes no se igualizan durante todo el paquitene, aunque sufren diferenciaciones tales como engrosamientos y ramificaciones (para una revisión actualizada ver Solari, 1994). La ausencia de igualización en el par XY de los mamíferos puede deberse al empaquetamiento especial de la cromatina asociada a los ejes sexuales, que se observa durante todo el paquitene y que no permitiría la reorganización de los lazos cromosómicos requerida en el proceso de reajuste (ver la sección IV.2.5).

IV.3.4. Los nódulos de recombinación en el par ZW

En todas las aves carinadas analizadas hasta el momento se encuentra un único nódulo de recombinación localizado cerca del extremo sináptico del par ZW, en una región de CS que no es alcanzada por los giros que realiza el eje Z durante la igualización. Contrariamente, en *R. americana* (Ratitae) el par ZW muestra entre 1 y 3 NRs en la porción del CS correspondiente a casi todo el brazo largo de los gonosomas.

Los NRs fueron descritos por Carpenter (1975) como estructuras esféricas, de unos 100 nm de diámetro, asociadas al espacio central de los CSs en ovocitos paquiténicos de *D. melanogaster*. Analizando su número y su distribución a lo largo de los CSs, y comparándolos con los datos genéticos, estos nódulos fueron relacionados con los eventos de recombinación recíproca (Carpenter, 1975). Esta suposición fue apoyada por estudios en mutantes de *Drosophila* con baja frecuencia de entrecruzamientos (Carpenter, 1979b) y por numerosos trabajos posteriores en otros organismos (von Wettstein et al., 1984). Estos trabajos revelaron la existencia de variantes morfológicas de los NRs entre especies, y también en distintas etapas de la profase meiótica, dentro de una misma especie (revisiones en von Wettstein et al., 1984 y Stack et al., 1989). En *D. melanogaster* se distinguen dos poblaciones de NRs: los denominados NRs “tempranos” que son más pequeños y se observan en cigotene; y los NRs “tardíos”, elipsoidales y típicos del paquitene; los nódulos “tardíos” son aquellos cuyo número se corresponde con los eventos de recombinación recíproca (Carpenter, 1979a). Los NRs se encuentran desde el cigotene en varias especies, aunque no siempre se observan diferencias morfológicas con los NRs del paquitene (von Wettstein et al., 1984; Sherman et al., 1992). Los NRs “tempranos” se encuentran en mayor número que los “tardíos”; esta relación numérica es a menudo 1.5-2 : 1, como en el ser humano, en *B. mori* (von Wettstein et al., 1984) y en *Drosophila* (Carpenter, 1979a); esta relación puede llegar a ser 15 : 1 como en el tomate (Stack y Anderson, 1986). Por su elevada frecuencia y su distribución aleatoria a lo largo de los CSs, los NRs “tempranos” han sido relacionados con los eventos de conversión génica y con el proceso de búsqueda de homología durante

la sinapsis de los cromosomas homólogos (Carpenter, 1987). También se ha propuesto que los NRs se forman en exceso durante etapas tempranas de la profase meiótica, y que una parte de ellos se pierde como consecuencia de la influencia ejercida por NRs cercanos que logran estabilizar primero un evento de recombinación recíproca, y luego ejercen una interferencia positiva sobre otros NRs cercanos ; estos últimos sólo podrían intervenir en procesos de conversión génica (que no está sujeta a interferencia) (Stack y Anderson, 1986). Sin embargo, aún no existen evidencias experimentales de que los nódulos de recombinación “tempranos” cumplan alguna función en la recombinación.

La mayor parte de las evidencias en favor de la relación de los NRs “tardíos” con la recombinación recíproca reside en la correspondencia entre la frecuencia y distribución de los NRs tardíos y los quiasmas o las frecuencias de intercambio genético (revisado en Stack et al., 1989). El recuento de los NRs “tardíos” y su diferenciación de aquellos no relacionados con los intercambios recíprocos se verifica con mayor precisión en aquéllos organismos que muestran diferencias morfológicas entre los NRs “tempranos” y “tardíos”. También es posible esta diferenciación cuando se puede establecer una cronología precisa de los estadios y cuando pueden establecerse subestadios paquiténicos, como en los ovocitos de *Drosophila*, los microesporocitos de *L. esculentum* (Stack y Anderson, 1986) y *Lilium* (Stack et al., 1989) o los espermatoцитos de mamíferos (Solari, 1980a y b ; Glamann, 1986).

La presencia de un NR en el segmento de CS formado por la sinapsis parcial del par XY de los mamíferos, es indicativa del evento de recombinación obligatorio que se produce a nivel de la región de homología de ambos cromosomas. La expresión citológica de este evento de recombinación es la asociación termino-terminal de los gonosomas, que se observa en los espermatoцитos en diacinesis de la mayoría de los mamíferos ; sólo en unas pocas especies, como varios hamsters, se observa un quiasma subterminal, (para una revisión actualizada ver Solari, 1994). Por otra parte, este evento único de recombinación ha sido sólidamente comprobado por pruebas moleculares (revisado en Rappold, 1993 para la especie humana).

De manera similar, en el par ZW de las 6 especies de aves carinadas analizadas hasta el momento (pertenecientes a 5 órdenes aviarios), se observa un único NR cerca del extremo del inicio de la sinapsis de los gonosomas. La característica más notable del NR es su localización dentro de un segmento terminal del CS, que no es alcanzado por las vueltas del eje Z luego del proceso de igualización. La longitud de dicho segmento es relativamente constante en 5 de las 6 aves carinadas analizadas hasta el momento (Tabla 11), con un rango de 0.5-0.75 μm de extensión. Solamente en *C. coturnix*, el segmento donde se localiza el NR es significativamente más pequeño (0.2 μm) y de posición casi estrictamente terminal (Solari, 1992). Esta localización extrema puede considerarse propia de la especie, y podría relacionarse con la ausencia, en esta especie, de los lazos gigantes teloméricos que caracterizan la asociación de los cromosomas Z y W en las restantes aves carinadas analizadas (Solovei et al., 1993).

Tabla 11. Localización del NR en el extremo sináptico del par ZW de las aves carinadas. Las distancias están expresadas en μm desde el telómero sináptico.

Especie	Distancia promedio al telómero	Rango
<i>Gallus domesticus</i> (a)	0.31	0.13-0.64
<i>Coturnix coturnix</i> (b)	0.14	0.05-0.20
<i>Numida meleagris</i> (c)	0.40	0.15-0.66
<i>Anas platyrhynchos</i> (c)	0.68	0.49-1.06
<i>Columba livia</i>	0.83	0.42-1.17
<i>Poephila guttata</i>	0.87	0.5-1.71

a. Rahn y Solari, 1986 ; b. Solari, 1992 ; c. Solari y Pigozzi, 1993.

En todas las especies de Galliformes, el segmento que lleva el NR se encuentra cerca del telómero sináptico, mientras que en los representantes de otros órdenes, dicho segmento es subterminal y está separado del telómero sináptico por una porción de 0.4-0.5 μm donde no se observan nódulos. El tamaño de la región involucrada es demasiado pequeño como para detectar diferencias mediante bandeos sobre los cromosomas mitóticos ; sin embargo, en *C. livia* la posición subterminal del NR se traduce en la presencia de un quiasma bien visible en el estadio de cromosomas plumulados.

En *C. livia*, el cromosoma W mitótico tiene una banda eucromática terminal en su brazo corto que representa entre un 25%-35% de Wp ; esta banda en el cromosoma W meiótico ocuparía una longitud aproximada de 1.5 a 2.1 μm (calculado a partir de los datos de la Tabla 6). En *C. livia* el NR no se encuentra más allá de un segmento subterminal de 1.17 μm ; por consiguiente la mayor parte del segmento eucromático terminal del W corresponde a eucromatina que no recombina con el cromosoma Z, muy probablemente por falta de homología. Asimismo, el bandeo C pone en evidencia otro segmento eucromático en Wq, que tampoco está involucrado en intercambios con el Z. La presencia de segmentos eucromáticos en el W y su tamaño relativamente grande, han sido observados también en otras especies de Columbiformes (De Lucca, 1984), y podrían indicar la adición de material genético por la fusión de un microcromosoma al cromosoma W, antes de la diversificación del orden Columbiformes. De acuerdo con esta hipótesis el par ZW actual de *C. livia* representaría el vestigio de un sistema de cromosomas sexuales múltiples, y sería necesario profundizar los estudios dentro del orden Columbiformes para verificar esta hipótesis, en caso de que el sistema se hubiera conservado en alguna de las especies vivientes del orden.

La presencia de 1 a 3 NRs en la extensión del CS correspondiente a casi todo el brazo largo del par ZW de *R. americana* difiere notablemente de la localización del NR en las aves carinadas, y es consistente con el alto grado de homología que se observa en esta región en los cromosomas mitóticos Z y W de esta especie (Ansari et al., 1988). Los NRs se encuentran siempre en un segmento de CS correspondiente a un 80 % de la longitud del eje W , y no se distribuyen al azar, a semejanza de lo observado en los CSs autosómicos de la misma especie (ver sección III.1.5). Dentro de este segmento no existe ninguna restricción para la recombinación, como queda demostrado a partir de las siguientes evidencias :

a) La frecuencia promedio de NRs en el par ZW (2.1) es semejante a la del CS #6 (1.8) (ver Tabla 5), cuya longitud absoluta es sólo levemente inferior al segmento que lleva los NRs en el par ZW (comparar las longitudes del CS #6 y el brazo largo del eje W en la Figura 9).

b) Los pares de NRs del par ZW muestran interferencia positiva (en el sentido de la interferencia quiasmática positiva usual), cuando están separados por una distancia menor al 20% de la longitud del eje W, pues el número de pares ZW con dos NRs separados por una distancia inferior a la mencionada es mucho menor que el esperado si los NRs se localizaran de manera independiente y al azar (Figura 14). El número de pares ZW separados por una distancia mayor que el 50 % de la longitud del eje W también es menor que el esperado, ya que superada una cierta distancia crítica de separación entre ambos NRs, aumentan las posibilidades de que se produzca un tercer intercambio en una posición intermedia, y en consecuencia, el par ZW mostrará tres NRs. Este gráfico de representación de la interferencia en el par sexual de *R. americana* es muy similar al obtenido por Sherman y Stack (1995) para los pares de NRs en los CS correspondientes a los brazos largos de los bivalentes de *L. esculentu*; es de destacar la distancia filogenética entre esta planta y *R. americana*.

Por estas razones puede afirmarse que el segmento que lleva los NRs en el par ZW de *R. americana* no tiene cualidades genéticas especiales que lo diferencien de los autosomas, y en este sentido puede denominarse "pseudautosómico", o más exactamente, "región de homología", a semejanza del segmento reducido que lleva el NR en los ZW de las aves carinadas, y de la región de homología del par XY de los mamíferos.

IV.3.5. Cromatina asociada al par ZW y su relación con la ausencia de compensación de dosis génica

En los ovocitos aviarios en profase meiótica la cromatina asociada al par ZW tiene un aspecto homogéneo, idéntico a la cromatina dispersa que rodea a los CSs autosómicos. Esto marca una diferencia notable con el estado altamente condensado de la cromatina del par XY de los mamíferos que forma el cuerpo XY (vesícula sexual) en los espermatoцитos en paquitene (Sachs, 1955; revisión por Solari, 1974a). Los estudios autorradiográficos realizados en extendidos para microscopía óptica y en secciones finas para microscopía electrónica, han demostrado la ausencia de actividad

transcripcional a nivel del cuerpo XY (Monesi, 1965 ; Kierszenbaum y Tres, 1974). Esta inactividad de la cromatina es consecuencia de la activación del mismo gen que provoca el silenciamiento casi completo de uno de los cromosomas X en las hembras de los mamíferos placentados (lyonización), y que tiene como objetivo compensar las diferencias de dosis para los genes ligados al X entre machos y hembras en este grupo de vertebrados (Lyon, 1961 ; revisión por Lyon, 1992). El gen responsable de la lyonización (*XIST* en el ser humano y *Xist* en el ratón) está activo exclusivamente en el X inactivado de las células somáticas femeninas (Brown et al., 1991 ; Brockorff et al., 1991 ; Borsani et al., 1991), y su producto es un ARN que se asocia a la cromatina del X y probablemente regule su empaquetamiento (Clemson et al., 1996). El gen *Xist* está inactivo en el único X de las células somáticas masculinas, pero en la línea germinal se activa en los espermatocitos que inician la meiosis, provocando la condensación de la cromatina del X, y secundariamente del Y (McCarrey y Dilworth, 1992).

La inactivación provocada por el gen *XIST* tiene la propiedad de extenderse a segmentos cromosómicos traslocados al cromosoma X, lo cual tiene como consecuencia el efecto variegado en las hembras (interpretado por Lyon 1961). En los machos esta extensión de la inactivación a regiones autosómicas, provoca la detención de la meiosis y la muerte de los espermatocitos luego del estadio de paquitene, como ha sido estudiado en detalle en la traslocación de Searle (Reader y Solari, 1969 ; Jafaar et al., 1989).

Como fue correctamente propuesto por Ohno (1967), el fenómeno de lyonización tiene como consecuencia la conservación del contenido génico del cromosoma X, ya que en la mayoría de los casos las combinaciones nuevas originadas por traslocaciones resultarían deletéreas para la especie y serían eliminadas por selección. Sin embargo, en algunos taxones esto no ocurre, y el segmento autosómico traslocado logra escapar a la extensión de la inactivación del X ; de esta manera el rearreglo puede fijarse en las poblaciones, constituyendo un sistema de cromosomas sexuales múltiples (Solari y Pigozzi, 1994 ; Pigozzi y Solari, 1994).

La ausencia de condensación del par sexual en los ovocitos, junto con la falta de condensación de uno de los cromosomas Z en las células somáticas masculinas, indican que en las aves no opera un mecanismo de compensación de dosis como en los mamíferos, lo cual está apoyado por estudios bioquímicos de mediciones de actividad enzimática (Baverstock et al., 1982). La enzima aconitasa citoplasmática está codificada por el gen *Acon_c*, el cual es polimórfico en cinco especies de aves: dos psitaciformes, un passeriforme y dos galliformes (gallina de Guinea y pollo). El gen *Acon_c* está ligado al Z, como lo demuestra el fenotipo de los híbridos de hembras de gallina de Guinea y machos de *G. domesticus* (especies que difieren en los tipos de aconitasa): los machos son heterocigotas para ambos tipos de aconitasa y las hembras son hemicigotas para el tipo de aconitasa del pollo. Refiriéndonos a las aves en general, en todas las especies examinadas, las hembras expresaron siempre un solo tipo de aconitasa y las actividades enzimáticas de esta enzima fueron significativamente diferentes en machos y hembras, siendo esta actividad aproximadamente el doble en los machos (Baverstock et al., 1982).

Aunque las evidencias mencionadas indican la falta de compensación de dosis en las aves, el cromosoma Z parece conservarse en los distintos órdenes aviarios ya que representa una proporción relativamente constante del genoma y se ha verificado el ligamiento al Z de la mencionada enzima aconitasa en varios órdenes aviarios. Dado que no hay pruebas de la presencia de un mecanismo de inactivación que elimine selectivamente las traslocaciones o inserciones de material genético en el cromosoma Z, no están claros hasta el momento los mecanismos que pueden operar en el mantenimiento del Z como grupo de ligamiento.

La conservación del cromosoma Z en las aves y del X entre los mamíferos llevó a Ohno (1967) a postular un origen común para ambos cromosomas, a partir del mismo grupo de ligamiento ancestral. Sin embargo, cinco de seis genes ligados al X en los mamíferos han demostrado ser autosómicos en las aves, y por otro lado, varios genes localizados en el Z aviario (aconitasa citoplasmática y creatinina kinasa) son autosómicos en los mamíferos (Dominguez-Steglich y Schmid,

1993). La ausencia de compensación de dosis en las aves y las diferencias en la constitución génica de los cromosomas Z y X, señalan una diferencia fundamental entre el par ZW y el par XY, y no concuerdan con la hipótesis de un origen común para el cromosoma Z aviario y el X de los mamíferos.

IV.4. Comparación de la meiosis masculina y femenina en las aves: los NRs en *C. livia*

IV.4.1. Diferencias generales entre la meiosis masculina y femenina

Uno de los objetivos de este estudio fue la observación comparada de la profase meiótica masculina y femenina en una misma especie aviaria. El interés de esta comparación reside en las considerables diferencias morfológicas y funcionales que presenta la meiosis en los dos sexos, y además, en el conocimiento, ya establecido, de la diferencia notable en la tasa de recombinación en ambos sexos en algunos mamíferos (ver sección IV.4.3). En las aves, las diferencias de la meiosis masculina con la femenina son, entre otras : a) momento del inicio (embrionario en las hembras, adulto en los machos) ; b) desarrollo conspicuo de cromosomas plumulados exclusivamente en el prolongado diplotene femenino ; c) duración de la profase (días en los machos, meses en las hembras) ; y d) la presencia del par sexual heteromórfico en la meiosis femenina.

Este estudio se centró principalmente en dilucidar si existen diferencias significativas en el número total y la distribución de los NRs en los dos sexos de *C. livia*.

IV.4.2. Ultraestructura de los nódulos de recombinación en *C. livia*

Las primeras descripciones de los NRs se realizaron sobre secciones finas de meiocitos teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo (revisión por Carpenter, 1979a). Los NRs también son visibles en los extendidos de células meióticas enteras, y en este caso la tinción de los NRs se realiza comúnmente con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo-citrato de plomo (Solari, 1980a ; Stack y Anderson, 1986 ; Albini y Jones, 1988) ; la tinción de los NRs con nitrato de plata sólo ha sido

descrita en células meióticas de algunas plantas (Sherman et al., 1992).

En la mayoría de los organismos, los NRs se presentan como estructuras esféricas o elipsoidales, ubicadas por encima del plano del espacio central del CS. En los espermatoцитos humanos los NRs tardíos adoptan una morfología cilíndrica, con su eje mayor transversal u oblicuo con respecto a los elementos laterales, por lo cual son denominados comúnmente “barras” (Solari, 1980a y b). Por razones que se desconocen, la afinidad tintorial de los NRs varía en diferentes especies ; por ejemplo, los NRs son muy conspicuos en los insectos y en los espermatoцитos humanos, mientras que se tiñen con dificultad en el ratón.

En todas las aves analizadas, los NRs son relativamente pequeños, pero pueden observarse con claridad en las preparaciones coloreadas con ácido fosfotúngstico. Con excepción de *C. livia*, todas las aves estudiadas muestran NRs elipsoidales, que en *G. domesticus* tienen un diámetro mayor de 142 nm (Rahn y Solari, 1986). En *C. livia* los NRs están formados por un grupo de 1 a 5 partículas esféricas que se tiñen más intensamente que los elementos laterales del CS. Las partículas tienen, en promedio, 66 ± 12.6 nm de diámetro, y los grupos constan frecuentemente 3 o 4 partículas. Esta estructura particulada de los nódulos se analizó en detalle en los ovocitos, aunque también está presente en los espermatoцитos de esta especie, por lo que puede descartarse la naturaleza artificial de esta morfología (ya que los espermatoцитos fueron procesados por una técnica diferente ; ver sección II.4.3).

Se ha propuesto que los NRs reúnen todos las enzimas necesarias para dirigir el proceso de la recombinación meiótica (Carpenter, 1993), pero hasta el momento no se ha logrado purificar una fracción que contenga los nódulos y permita aclarar su composición. En este sentido, la variación del número de partículas en *C. livia* (que se describe por primera vez en la literatura) podría representar la reunión progresiva de dichos componentes enzimáticos en el sitio de un evento de recombinación. Alternativamente, cada partícula podría llevar todas las enzimas necesarias para la formación y resolución de un intermediario de recombinación, mientras que la disposición espacial de

las partículas garantizaría la disponibilidad de sus componentes.

IV.4.3. Frecuencias de recombinación en machos y hembras de aves

Las diferencias en las frecuencias de recombinación entre sexos se conocen desde hace mucho tiempo, y las evidencias al respecto provienen de análisis genéticos (por comparación de recombinantes producidos por machos y hembras) y de análisis citogenéticos (por comparación de la frecuencia de quiasmas en meiocitos masculinos o femeninos). Haldane (1922) fue el primero en sugerir que, cuando existen diferencias de recombinación entre ambos sexos, el valor menor de la tasa de recombinación se observa en el sexo heterogamético. Aunque en la mayoría de las comparaciones realizadas esto ha resultado ser así, se conocen algunas excepciones (Callan y Perry, 1977). En las situaciones más extremas, la reducción del intercambio genético resulta completa, como en los casos bien conocidos de meiosis aquiasmática en el macho de *Drosophila* y la hembra de *B. mori* (reseñado en John y Lewis, 1965). Entre los vertebrados no se conocen casos de meiosis aquiasmática, aunque sí se han registrado diferencias de recombinación entre sexos. Las evidencias más completas al respecto provienen de la comparación de los mapas genéticos masculino y femenino, y del análisis de los quiasmas en el ratón y en el ser humano. En ambos casos el sexo heterogamético muestra una tasa menor de entrecruzamientos. Así, el mapa de ligamiento autosómico en el ser humano mide 2832 cM en el sexo masculino y 4348 cM en el sexo femenino (Collins et al., 1996 : calculado a partir de más de 23,000 loci). En los espermatoцитos humanos en diacinesis el número promedio de quiasmas es 52.3 (Laurie y Hultén, 1985) ; este número de entrecruzamientos corresponden a una longitud de 2615 cM para los autosomas en el varón (52.3×50), lo cual se aproxima a la longitud del genoma masculino calculada a partir de los datos de ligamiento. La correspondencia entre el mapa de ligamiento y el mapa derivado del número de quiasmas no resulta tan apropiada en la mujer, puesto que el número de quiasmas resulta subestimado en la meiosis femenina, debido a las dificultades técnicas para el recuento de quiasmas a partir de ovocitos cultivados in vitro.

En el ratón, en cambio, el recuento de quiasmas puede realizarse con facilidad en muestras grandes de meiocitos en ambos sexos, y en preparaciones de calidad comparable. La existencia de una frecuencia de quiasmas más elevada en el sexo femenino ha sido señalada a partir de su análisis en distintas cepas de *M. musculus* (Polani, 1972 ; Speed, 1977). También se ha señalado la existencia de diferencias en la localización de los quiasmas entre sexos: por ejemplo en los espermatocitos, los quiasmas se localizan preferentemente en posición proximal y (sobre todo) distal, mientras que en los bivalentes del ovocito hay una preferencia por la formación de quiasmas intersticiales (Polani, 1972 ; Gorlov et al., 1994 ; Lawrie et al., 1995).

Entre las aves, la primera comparación de las frecuencias de recombinación en machos y hembras se realizó a partir marcadores citológicos de la recombinación y mostró una coincidencia aproximada entre el número de quiasmas en la meiosis masculina (Pollock y Fechheimer, 1978) y el número de NRs tardíos en los ovocitos de la misma especie (Rahn y Solari, 1986). Estas apreciaciones fueron confirmadas mediante la comparación del número de quiasmas en los espermatocitos y el número de quiasmas observados en ovocitos de *G. domesticus* en diplotene (etapa de cromosomas plumulados) (Rodionov et al., 1993).

Los análisis de ligamiento en *G. domesticus* aún son incompletos, pero los mapas de ligamiento, confeccionados a partir de unos 460 loci marcadores no parecen mostrar diferencias significativas en las distancias genéticas en machos y hembras (Levin et al., 1994 ; Burt et al., 1995). A partir de estos estudios de ligamiento se ha calculado la longitud genética mínima del cromosoma Z en unos 200 cM (Levin et al., 1993) ; considerando que este cromosoma representa alrededor del 7-8 % del genoma, la longitud genética total del genoma del pollo sería aproximadamente 2600-3000 cM. Esta distancia es similar a la calculada a partir del número de quiasmas en los ovocitos en los cromosomas plumulados (59-64), que resulta en una longitud del mapa genético entre 2800 y 3200 cM (Rodionov et al., 1993).

En *G. domesticus*, el número de NRs observados en los ovocitos en paquitene (Rahn y Solari,

1986) muestra una buena relación con el número de quiasmas en los cromosomas plumulados, es decir, a partir de esta comparación, se establece una equivalencia entre ambos indicadores de la recombinación recíproca en el mismo sexo y especie (Rodionov et al., 1993).

Con respecto al presente estudio, de una manera similar a lo descrito en el párrafo anterior, el número de NRs en los espermatocitos de *C. livia* se corresponde de manera directa con el número de quiasmas observados en diacinesis-metafase I en el macho (Tabla 8), confirmando la validez de los NRs como marcadores citológicos de la recombinación recíproca en estas especies en particular, y en las aves en general. Otras evidencias que demuestran la identidad de los NRs tardíos y los quiasmas, están relacionadas con la distribución de los mismos en los bivalentes : tanto el número de NRs como el número de quiasmas aumenta en los bivalentes más largos. Los gráficos de correlación entre NRs y longitud del CS en ovocitos y espermatocitos (Figuras 41 y 42) son muy similares al gráfico generalizado de la relación entre quiasmas y longitud de los bivalentes, confeccionado para el ortóptero *Schistocerca gregaria* (Henderson, 1963 ; reproducido por Sybenga, 1975). Estos gráficos demuestran que siempre hay un mínimo de un quiasma (o NR), independientemente de la longitud del bivalente ; en *C. livia* esto implica una inflexión de la línea de regresión hacia el eje de las ordenadas en la zona de longitudes correspondientes a los microcromosomas, ya que éstos siempre muestran un NR. Como se ha demostrado en diversas especies, un incremento al doble en la longitud de un bivalente, no implica el mismo incremento en el número de quiasmas (Sybenga, 1975) ; la misma situación se observa con los NRs en *C. livia*, lo cual es una demostración indirecta de la existencia de interferencia quiasmática positiva en estos cromosomas.

Esta correspondencia de los NRs y los eventos de entrecruzamiento permite afirmar que la similaridad de las frecuencias de NRs en machos y hembras de *C. livia* (ver sección III.4.4) indican la similitud de las tasas de recombinación en ambos sexos en esta especie, a semejanza de lo propuesto para *G. domesticus*. Además, la distribución de los NRs en los macrobivalentes parece ser similar en ambos sexos. Cuando se compara el número de NRs en los tercios proximal, intersticial y distal de los

Comparación de la distribución de nódulos de recombinación en machos y hembras de *Columba livia*

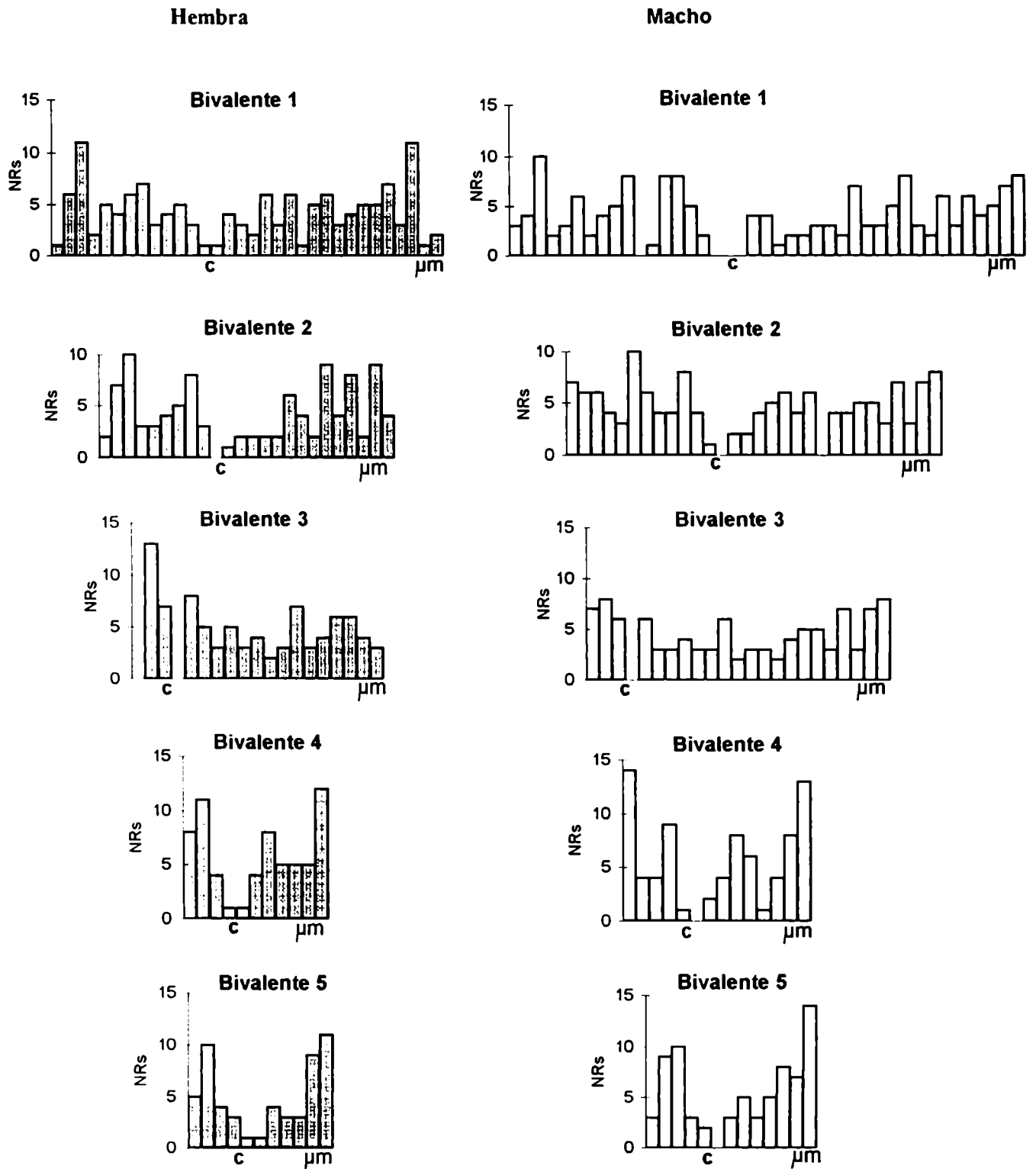


Figura 60 (1ª parte). Histogramas de la distribución de los NRs en machos y hembras de *Columba livia* (continúa en la página siguiente).

Comparación de la distribución de nódulos de recombinación en machos y hembras de *Columba livia*

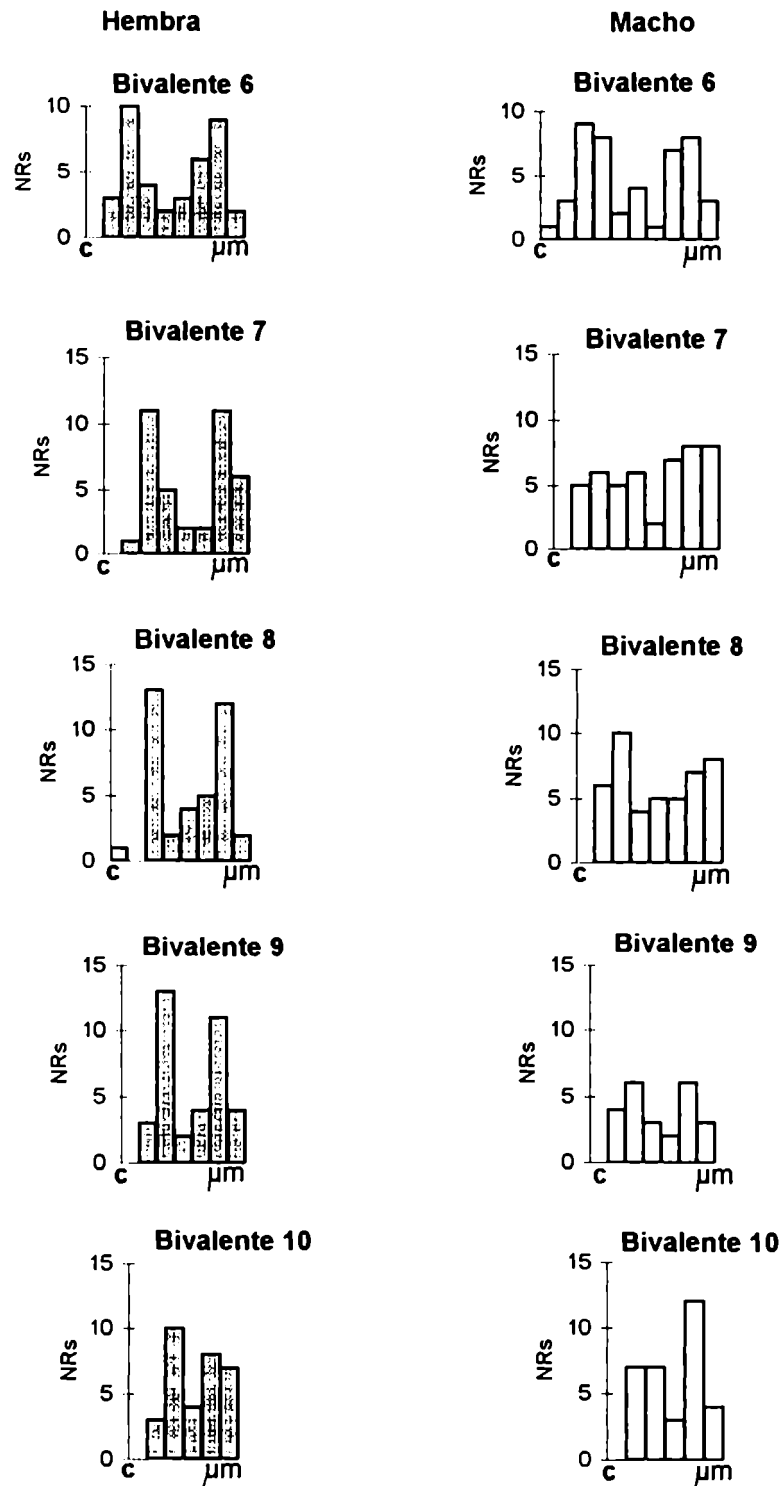


Figura 60 (2ª parte). Histogramas de la distribución de los NRs en machos y hembras de *Columba livia*. El eje horizontal de cada histograma representa la longitud absoluta del bivalente dividida en segmentos de 1 μm . La escala del eje vertical representa el número de nódulos de recombinación. El segmento hacia la derecha del cinetocoro (c) corresponde al brazo largo. La frecuencia de los nódulos de recombinación es muy baja en la zona centromérica y aumenta cerca de los telómeros.

brazos largos de los CS #1, #2 y #3 (Figura 60) no se observan diferencias significativas entre ovocitos y espermatozoides ($\chi^2 = 0.86$; $p = 0.65$).

Esta semejanza de las frecuencias de recombinación en machos y hembras de *G. domesticus* y *C. livia* difiere notablemente de lo observado en los mamíferos, como se señaló previamente. Se desconocen cuales son las causas que determinan las diferencias de recombinación entre sexos, aunque es interesante señalar que en las aves, la longitud del complemento de CSs es similar en ambos sexos, a diferencia de lo observado en otros organismos, como el ser humano (Solari, 1980a ; Bojko, 1985). Se ha sugerido que la tasa de empaquetamiento del ADN en los bivalentes paquiténicos está negativamente correlacionada con las frecuencias de recombinación, lo cual permitiría explicar las diferencias de recombinación en la meiosis masculina y femenina observada algunos organismos (Peterson et al., 1994). De acuerdo con esta hipótesis : la tasa longitud del CS/cantidad de ADN, está directamente relacionada con la frecuencia de entrecruzamientos dentro del genoma. Esta hipótesis resulta atractiva ya que se corresponde con las observaciones de la recombinación en las meiosis masculina y femenina en el ser humano, en el gusano hermafrodita *Dendrocoelum lacteum* (Jones y Croft, 1989) y en *Xenopus laevis* (revisado por Wallace y Wallace, 1995), en los cuales el sexo con mayor índice de recombinación muestra una mayor longitud de CS (lo cual implica un empaquetamiento con más cantidad de lazos más cortos unidos a los CSs).

El análisis de los quiasmas (o NRs) permite comparar las frecuencias de recombinación en las aves con la observada en otros organismos, y su relación con el tamaño del genoma. Como ya se mencionó, la longitud total del mapa genético del pollo calculado a partir del número de quiasmas en los ovocitos (59-64), comprende entre 2900 y 3200 cM ; el mapa genético humano, calculado a partir de los quiasmas en los espermatozoides (52.3), tiene una longitud de 2615 cM. Sin embargo, el genoma haploide del pollo tiene aproximadamente 1.25×10^9 pb de ADN, siendo unas tres veces menor que el del ser humano (3.7×10^9 pb), de lo que resulta que en *G. domesticus* hay un entrecruzamiento cada 19,000 kpb, mientras que en el ser humano hay uno cada 64,000 kpb. Es decir, que la tasa de

recombinación por nucleótido es casi tres veces mayor en la meiosis aviaria, lo cual coincide con las observaciones en *C. livia* aquí presentadas, ya que en esta especie la frecuencia de recombinación (NRs) y el tamaño genómico son semejantes a los de *G. domesticus*.

En resumen, se ha constatado una tasa igual de NRs en la meiosis femenina y en la masculina en *C. livia*, y se propone que esta tasa uniforme en ambos sexos es característica de la meiosis en las aves.

IV.5. La meiosis en *Poephila guttata*

El análisis de la meiosis masculina y femenina de *P. guttata* presentado en este trabajo de tesis ha permitido observar en detalle la conducta del par ZW en un representante de un grupo sumamente evolucionado dentro de las aves (ver Sección 5.2). Adicionalmente, ha permitido describir el primer cromosoma accesorio dentro de la clase aves, constituyéndose en uno de los pocos casos bien documentados entre los vertebrados superiores. El cromosoma B de *P. guttata* se considera como tal por su limitación a una línea celular (la línea germinal), su aislamiento de los cromosomas del complemento normal durante la meiosis, y su prescindibilidad en la línea somática de ambos sexos, y en parte de la línea germinal masculina.

Poephila guttata es un paseriforme de la familia Fringilidae, originario de Australia ; es muy utilizado en experimentos de fisiología del sistema nervioso y de endocrinología aviaria, debido a su excelente adaptación al cautiverio. En cuanto a su citología cromosómica en la meiosis, el único antecedente es una observación preliminar, en extendidos para microscopía electrónica realizados a partir de ejemplares de esta especie, y de híbridos entre *P. guttata* y otra especie relacionada. En esta observación (C.B. Gillies, comunicación personal, 1990), se distinguió un cuerpo cromatínico denso, con un eje en su interior, semejante al descrito en el presente trabajo. Sin embargo, dicha observación preliminar no permitió revelar la naturaleza de ese cuerpo, no habiendo surgido tampoco publicaciones o comunicaciones al respecto.

Aunque *P. guttata* es un paseriforme de cría extendida, el cariotipo de la especie no está disponible en las revisiones más recientes de cariología aviaria (Belterman y De Boer, 1984 ; Capanna et al., 1987) ; esto constituye una muestra del número limitado de estudios en citogenética aviaria. Sin embargo, los estudios de la línea somática (de haberse hecho) no hubieran revelado la existencia de un cromosoma B, puesto que está restringido en este caso a la línea germinal. Este caso particular pone de manifiesto la necesidad de realizar sistemáticamente el análisis meiótico en citología aviaria (comenzando por la citología clásica), ya que este enfoque se realiza actualmente sólo en unos pocos grupos de trabajo en todo el mundo.

IV.5.1. Características generales de los cromosomas B y su presencia en distintos organismos

Los cromosomas accesorios (Müntzig, 1974) o cromosomas B (Randolph, 1928) son cromosomas adicionales al complemento normal de la especie, que no son requeridos para el desarrollo normal de los individuos portadores, es decir, son prescindibles (Jones y Rees, 1982). El carácter dispensable, su variabilidad numérica, y su aislamiento meiótico con respecto a los cromosomas normales, constituyen características citológicas distintas de los cromosomas B. Su presencia ha sido descrita en más de 1300 especies de plantas y casi 500 animales (Jones y Puertas, 1995). Entre los cromosomas B mejor caracterizados se encuentran los del centeno, el maíz y *Crepis capillaris* (Compositae, Angiospermas) entre las plantas, y los de los ortópteros (especialmente acrididos) entre los animales (revisado por Jones y Rees, 1982).

Aproximadamente el 80 % de los cromosomas B del reino animal pertenecen a insectos, sobre todo ortópteros, coleópteros y dípteros (Hewit, 1979). Entre los vertebrados se han encontrado cromosomas B en peces (Foresti et al., 1995 ; Fenocchio et al., 1995), anfibios, reptiles y mamíferos (citados por Jones y Rees, 1982). El seguimiento de la conducta meiótica de los Bs en los vertebrados está limitado a algunos anfibios (Stephenson et al., 1972 ; Green, 1987) ; y en el zorro plateado (*Vulpes vulpes*) se han realizado estudios de complejos sinaptonémicos, en espermatoцитos de

individuos con distintos números de Bs (Switonski et al., 1985). Los cromosomas B también se han descrito en primates : en *Alouatta seniculus sara* se han observado variaciones cromosómicas numéricas intra e interindividuales (Yunis et al., 1976 ; Minezawa et al., 1985).

En las aves, la escasa proporción de especies estudiadas, además de la dificultad que acarrear los microcromosomas en la realización de recuentos precisos, puede ocultar la presencia de cromosomas accesorios, ya que estos últimos suelen ser más pequeños que los del cariotipo normal.

El origen de los cromosomas B ha producido un debate que aún permanece sin resolverse. En términos generales se han propuesto dos posibles orígenes de los cromosomas accesorios : a) un origen intragenómico, como resultado de fragmentación cromosómica, o por trisomías originadas en deleciones o traslocaciones (Jones y Rees, 1982) ; o b) un origen externo como consecuencia de un evento de hibridación interespecífica (Sapre y Deshpande, 1987). Hasta el momento no se ha podido reconstruir detalladamente el origen y la evolución de ningún cromosoma B en particular, aunque se han realizados análisis de la composición del ADN de los Bs, los cuales mostraron tanto secuencias presentes en los cromosomas del complemento normal como secuencias propias de los Bs (Lacadena, 1996). En el centeno, los cromosomas B tienen secuencias repetitivas que se encuentran también en el complemento normal de la planta, lo cual apoyaría un origen intraespecífico en este caso particular ; sin embargo, se conocen al menos dos familias de secuencias repetitivas exclusivas de los Bs en esta especie (Wilkes et al., 1995).

En numerosos casos, los cromosomas B son heterocromáticos y no llevan genes que provoquen efectos importantes en el fenotipo de los individuos portadores. Por esta razón se ha sugerido la existencia de una vinculación entre los cromosomas B y los cromosomas sexuales, ya que los rasgos mencionados son también característicos de las regiones diferenciales de los cromosomas Y o W, en pares sexuales heteromórficos. Por otra parte, las trisomías de los cromosomas sexuales son menos deletéreas que las autosómicas, por lo cual un segmento trisómico originado a partir de un cromosoma sexual podría ser mejor tolerado y permitir el establecimiento de un cromosoma B (Jones y

Rees, 1982). También se ha propuesto el origen de los cromosomas accesorios a partir de los cromosomas que llevan los organizadores nucleolares, puesto que, en varios casos, los cromosomas B llevan genes de este tipo (reseñado por Green, 1990).

Sea cual sea su origen, los cromosomas B no pueden adquirir su carácter heterocromático repentinamente, especialmente aquéllos que tienen un tamaño similar o aún mayor que los cromosomas del complemento normal. Según Green (1990), la adquisición gradual de las secuencias repetitivas que forman a la mayoría de los Bs podría explicarse mediante el mecanismo del trinquete de Muller (Felsenstein, 1974 ; Charlesworth, 1978), propuesto para explicar la evolución de los cromosomas sexuales heteromórficos (ver la Introducción y la sección IV.6.1 de esta discusión).

IV.5.2. Repercusión funcional de los cromosomas B en distintos organismos

Los efectos fenotípicos de los cromosomas B son difíciles de detectar, aunque se han encontrado correlaciones entre la presencia de cromosomas accesorios y variaciones de caracteres cuantitativos, tales como la formación de quiasmas, la sinapsis, la tasa de desarrollo y la fertilidad (Jones y Rees, 1982). La influencia de los Bs en el crecimiento y el desarrollo ha sido estudiada detalladamente en el centeno y el maíz, dada la variabilidad numérica de los Bs en estas especies, y que permite la comparación de plantas con diferente cantidad de Bs, y sin Bs. En el centeno, el aumento del número de cromosomas accesorios disminuye el vigor de las plantas (Müntzig, 1963), y la fertilidad es nula cuando su número llega a 8 (Jones y Rees, 1982). Adicionalmente, en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* los cromosomas accesorios provocan un retraso en el desarrollo, de manera tal que no son tolerados en un número mayor de 3 (Harvey y Hewitt, 1979). También se ha comprobado la influencia de los Bs sobre la sinapsis y el entrecruzamiento de los cromosomas “normales” (o A) durante la meiosis. Con respecto a la influencia de los B sobre la frecuencia y localización de los quiasmas, las observaciones son contradictorias, aún dentro de la misma especie : en el centeno, por ejemplo, diferentes datos experimentales han relacionado la presencia de los Bs, ya

sea con el aumento del número de quiasmas, ya sea su disminución ; o con diferencias en la localización, sin cambios en la frecuencia quiasmática (resumido en Lacadena, 1996). Otros resultados dispares (unefecto supresor o un efecto promotor) se refieren a la relación de los cromosomas B y el apareamiento de cromosomas homeólogos en híbridos interespecíficos de plantas. Las discrepancias mencionadas se han explicado como el resultado de las variaciones del fondo genético en que están actuando los cromosomas B (Lacadena, 1996).

IV.5.3. Transmisión de los cromosomas B. Una hipótesis para el caso de *P. guttata*

La inestabilidad numérica que caracteriza a la mayoría de los cromosomas B, es consecuencia de ciertos mecanismos de acumulación de los Bs que actúan en las células somáticas o en las células germinales. En general, la transmisión de los Bs durante el desarrollo es regular, de manera que su número es similar en las distintas células de un mismo individuo. Sin embargo, se han descrito variaciones en el número de Bs en distintas líneas celulares en varias especies de plantas y animales. Por ejemplo, en *Poa alpina* los Bs se encuentran en las raíces primarias y faltan en las raíces adventicias, y en *Aegilops speltoides* están ausentes en el sistema radicular, y presente en los órganos aéreos, incluyendo la línea germinal (resumido en Lacadena, 1996). La causa de la variación numérica de los cromosomas B es, en todos los casos, la no-disyunción en la anafase mitótica ; esto conduce a la acumulación de los Bs en una línea celular, y a su exclusión de otra.

En la línea germinal, en tanto, la acumulación de los Bs puede producirse por varios mecanismos : 1) por no disyunción en las divisiones mitóticas previas a la meiosis ; 2) por segregación preferencial en la meiosis femenina ; o 3) por no disyunción posmeiótica. La acumulación de los Bs en las divisiones mitóticas de las células germinales masculinas se considera un mecanismo común entre los animales, y ha sido descrita en *Locusta migratoria* (Hewitt, 1976) y *Helix pomatia* (Kayano, 1971), entre otros organismos. La no disyunción postmeiótica se da exclusivamente en plantas, especialmente en la microesporogénesis, y ha sido estudiada en profundidad en *Secale cereale* y *Zea*

mays. Este mecanismo implica la no disyunción de las cromátidas hermanas durante la primera o segunda anafase de la división mitótica del polen (para un resumen ver Lacadena, 1996). El restante mecanismo de acumulación en la línea germinal se refiere a la segregación preferencial de los Bs hacia el polo que formará el núcleo de la megáspora (en las plantas) o del ovocito (en los animales), durante la anafase I de la meiosis femenina. En el saltamontes *M. maculatus*, el B segrega preferencialmente con la mitad del complemento que formará en núcleo del ovocito (Hewitt, 1976). La frecuencia de la segregación preferencial está en estrecha relación con el grado de acumulación del B de una generación a otra. Este comportamiento de los Bs también se ha observado en en otras especies de ortópteros, y ha sido relacionado con la simetría del huso que se forma en la anafase I en estos insectos (Hewitt, 1976), aunque se ha sugerido que se requeriría algún elemento funcional en el propio B, que asegurara esta conducta (Jones y Rees, 1982).

Como se explicó en Resultados, el único cromosoma B de *P. guttata*, se encuentra de manera regular en las líneas germinales maculina y femenina. Por el contrario el B no se observó en ninguna de las metafases obtenidas a partir de médula ósea de individuos de ambos sexos, y probablemente, dada la variedad de tipos celulares que se originan en la médula ósea, no se encuentre en las otras líneas celulares somáticas.

La presencia constante de un solo cromosoma B en la línea germinal, es indicativa de su conducta estable durante las divisiones mitóticas previas a la meiosis, y su presencia en todos los individuos examinados (inclusive en los examinados por C. Gillies en Australia, que a partir del presente estudio pueden ser interpretadas como observaciones idénticas a las aquí descriptas) denota la regularidad de su transmisión de una generación a otra. Si el cromosoma B segregara al azar en las meiosis masculina y femenina, deberían producirse gametas con y sin B en cantidades iguales en cada sexo, de lo cual se podría esperar la formación frecuente de cigotos con dos B. Ahora bien, en todas las células germinales analizadas sólo se encontró un B, por lo cual puede suponerse que las células germinales de *P. guttata* no toleran la presencia de más de uno de estos elementos. Por lo tanto, debe

haberse desarrollado algún mecanismo que asegure la transmisión del B sin causar mortalidad embrionaria, ya que esta provocaría la rápida eliminación del B en las poblaciones.

A partir de las observaciones citológicas al microscopio óptico y electrónico, se propone un mecanismo que aseguraría el mantenimiento del B en la línea germinal dentro de cada individuo y su transmisión de una a otra generación en *P. guttata*. Esta hipótesis involucra mecanismos de segregación preferencial y de exclusión del B, e implicaría los siguientes pasos :

- Inactivación y eliminación del cromosoma B en la línea germinal masculina (Figura 61).
- Segregación preferencial en la anafase I durante la ovogénesis (Figura 62).
- Eliminación del B en las células somáticas y conservación en la línea germinal en los embriones de ambos sexos.

La inactivación del cromosoma B en la línea germinal masculina está indicada por el estado condensado de la cromatina, que forma un cuerpo heterocromático periférico en los espermatocitos durante la profase meiótica. La formación de un eje en relación al B permite suponer la segregación conjunta de las dos cromátidas del B durante la anafase I (véase la cohesión de las cromátidas hermanas en la Sección IV.1.1); así se formarán espermatocitos II con y sin B en proporciones iguales.

Esta segregación podría controlarse verificando la presencia del B en aproximadamente la mitad de las metafases II. Sin embargo, en ninguna metafase II aparece un elemento heteropicnótico de gran tamaño que pudiera corresponder al B aunque sí se observó un cuerpo esférico denso asociado frecuentemente a las metafases II. El cuerpo denso se atribuye a un producto de la degeneración del B por las siguientes razones : a) nunca se encontró más de uno por cada metafase II ; b) falta en una parte de las metafases II analizadas, como podría esperarse luego de la anafase I por la segregación del B a un polo ; y c) un cuerpo denso de características idénticas se encontró en el citoplasma de las espermátides tempranas (el estadio inmediato de diferenciación luego de la división de los espermatocitos II durante la espermatogénesis). El momento de la exclusión nuclear del B, y su paso hacia el citoplasma, es difícil de precisar, aunque probablemente se produzca durante la anafase II,

debido a la incapacidad del B (ya reducido a un cuerpo cromatínico), de migrar con las cromátidas segregantes.

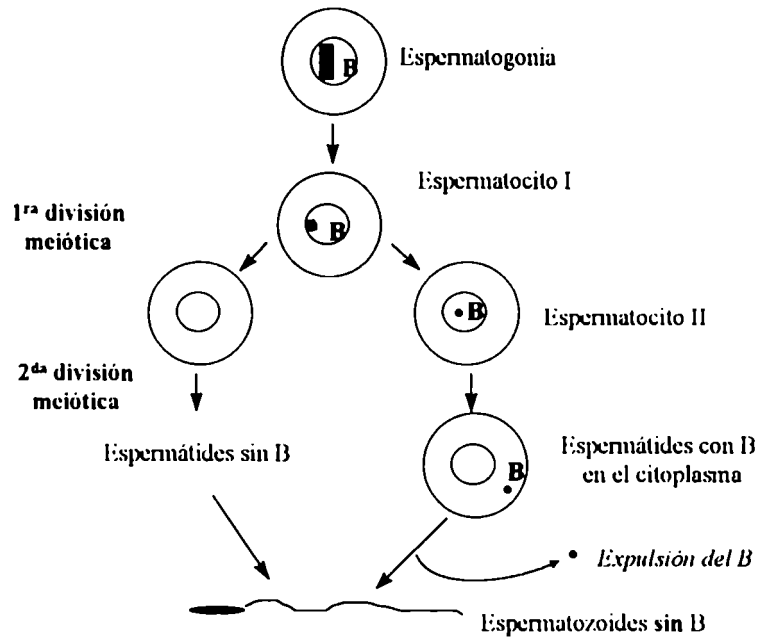


Figura 61. Esquema que muestra la eliminación del cromosoma B de *P. guttata* en la espermatogénesis masculina. Ver el texto para la explicación.

La hipótesis formulada, aunque se basa directamente en los datos citológicos, está sujeta a una serie de comprobaciones que escapan a los objetivos del presente trabajo de tesis. La eliminación del B en la línea germinal masculina podría verificarse con algunas de las siguientes pruebas :

1. Un estudio de citoespectrofotometría que mida el contenido de ADN en los espermatozoides : el gran tamaño del B de *P. guttata* permitiría distinguir los espermatozoides con y sin B. De acuerdo con la hipótesis planteada anteriormente, el B debería ser eliminado antes de la finalización de la espermiogénesis, y por lo tanto, se formarían espermatozoides de un sólo tipo, esto es, sin B. Esta hipótesis está apoyada también por la uniformidad morfológica y estructural de la cabeza de los espermatozoides de *P. guttata* (observaciones preliminares).

2. La determinación fehaciente de que el cuerpo cromatínico denso está formado por ADN,

utilizando la reacción de Feulgen o la coloración con fluorocromos con afinidad por el ADN, como el DAPI.

3. Un análisis estereológico del tejido testicular a partir de secciones semifinas para microscopía óptica permitiría comprobar que el cuerpo denso se encuentra en el citoplasma de aproximadamente la mitad de los espermátides.

4. La manera más contundente de demostrar la eliminación del B en la línea germinal masculina sería construir una sonda de ADN específica para el cromosoma accesorio que permita seguir su conducta durante la espermatogénesis. La hibridación de dicha sonda marcada con un fluorocromo sobre extendidos o cortes de testículo permitiría confirmar la identidad entre el cromosoma B y el cuerpo esférico denso de las metafases II y espermátides ; asimismo permitiría demostrar la supuesta ausencia del B en los espermatozoides.

La conducta del cromosoma B en los ovocitos en paquitene demostró ser totalmente diferente de la observada en los espermatoцитos : la cromatina asociada al eje accesorio está totalmente dispersa, a semejanza de la cromatina de los autosomas y del par ZW, lo cual permite suponer un estado activo del cromosoma accesorio (ver la siguiente sección). La segregación reduccional del cromosoma B en la anafase I puede predecirse como consecuencia de la formación de un eje entre las cromátidas hermanas (ver Sección IV.1.1). Los siguientes pasos en la distribución del B en los ovocitos se deducen de la invariabilidad de la presencia del B en dosis única en todas las células germinales (Figura 62).

Como se mencionó anteriormente, la segregación preferencial de los cromosomas B hacia el polo que formará el núcleo del ovocito ha sido observada en diferentes organismos. En *P. guttata* la segregación preferencial del B durante la anafase I de la ovogénesis es propuesta como una forma de mantener el B en dosis única, ante su eliminación en la línea germinal masculina, y con el objeto de evitar las presumibles consecuencias deletéreas que acarrearía la presencia de más de un B en los cigotos resultantes de la fecundación de dos gametos portadores del cromosoma B.

Segregación del cromosoma B en la línea germinal femenina

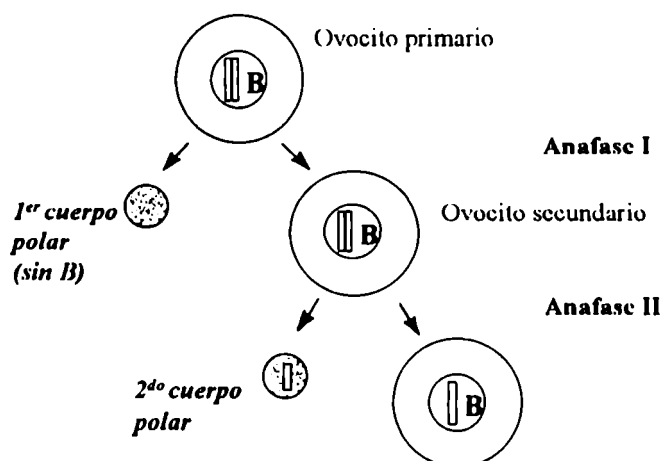


Figura 62. Segregación preferencial del cromosoma B en la meiosis femenina de *P. guttata*

Para la comprobación de esta segregación preferencial sería necesario examinar ovocitos en metafase I en el ave adulta, en los que debería encontrarse al B siempre entre los cromosomas de la “vesícula germinal” y nunca en el primer cuerpo polar. Este estadio sólo se observa desde el momento de la ovulación hasta antes la fecundación, cuando el ovocito se encuentra en el oviducto y lleva consigo una enorme cantidad de vitelo, lo cual torna sumamente complicada la tarea de encontrar el núcleo del ovocito. Si el cromosoma B mostrara variantes morfológicas, podría mostrarse (mediante un cruzamiento) que el cromosoma B que se encuentra en la descendencia no es del tipo paterno, lo cual demostraría indirectamente que el B se hereda de la madre.

IV.5.4. Efectos del cromosoma B en la meiosis de *P. guttata*

La presencia del cromosoma B condensado en los espermatozoides no parece repercutir en el desarrollo normal de la profase meiótica masculina, ya que todos los elementos del complemento normal aparecen sinapsados durante el paquitene. En los ovocitos, por el contrario, la presencia del eje accesorio no sinapsado durante el paquitene temprano, está siempre asociada con la presencia de un

número variable de microbivalentes asinápticos. La influencia del estado asináptico del B en este retraso de la sinapsis de los microbivalentes, queda confirmada porque en estadios posteriores del paquitene, cuando el B aparece autosinapsado, todos los microbivalentes han completado la sinapsis. Esta repercusión del B resulta sorprendente, sobre todo teniendo en cuenta que los microcromosomas son los primeros en completar la sinapsis.

El estado activo del cromosoma B en la hembra se deduce del estado relajado de su cromatina, aunque esta presunta actividad sólo podría confirmarse examinando: a) los ovocitos en fase plumulada, a fin de comparar los lazos del cromosoma B con los de los bivalentes autosómicos o, b) la captación de precursores de ARN durante el paquitene. La tendencia a la autosinapsis es una tendencia inherente a los elementos no apareados y ha sido observada en varios casos: 1) en los cromosomas B univalentes de *V. vulpes* (Switonski et al., 1985); 2) en el único cromosoma X en ratones X0 (Speed, 1977); y 3) en la porción del eje no sinapsado del X en hembras de *Akodon azarae* con cromosomas sexuales heteromórficos (Solari et al., 1989), y en otros casos.

El apareamiento normal de los bivalentes en los espermatocitos se puede atribuir al estado no transcripcional del cromosoma B, debido a la condensación de su cromatina, lo cual promovería su eliminación posterior. De acuerdo con la hipótesis propuesta para su transmisión, en machos y hembras el cromosoma B proviene siempre de un ovocito, por lo cual la causa más probable de la inactivación del B en el macho es la influencia del ambiente testicular.

La influencia del cromosoma B sobre la recombinación en los cromosomas A de *P. guttata* no puede señalarse inequívocamente, ya que todos los individuos presentaban el cromosoma B, y éste se encontró en todas las células germinales analizadas, lo cual impide realizar comparaciones intra o interindividuales. Sin embargo, es interesante señalar que en los ovocitos coloreados con ácido fosfotúngstico los NRs tienen una localización predominantemente distal, particularmente en los macrobivalentes bibraquiados. Por ejemplo, en el CS #1 se observa un NR en cada brazo, en posición distal; este número es muy inferior al promedio cercano a 7 NRs para el mismo CS en *G. domesticus*,

C. livia o *R. americana*. Sin embargo, esta observación no debería tomarse como una reducción de la recombinación debida a la presencia del B sino como una localización peculiar de los quiasmas en esta especie, ya que en los espermatoцитos en metafase I, los quiasmas se localizan distalmente y se encuentran en un número reducido (ver Figura 56). Es importante destacar que en *P. guttata*, la longitud del complemento de CSs en ambos sexos es significativamente más pequeña que en otras aves analizadas, lo cual podría relacionarse con el índice menor de recombinación en esta especie (ver la sección IV.4.3).

IV.5.5. El par ZW en *P. guttata*

La conducta sináptica de los ejes sexuales no se ve afectada por la presencia del cromosoma B: los cromosomas Z y W de *P. guttata* forman un CS con características similares a las descritas en otras aves con cromosomas Z y W heteromórficos. La sinapsis siempre comienza por el brazo corto de ambos gonosomas, que son fácilmente identificables por la posición de los cinetocoros sobre los ejes meióticos (Figura 48). Cerca del extremo de inicio de la sinapsis se localiza un único NR, lo cual señala la presencia de un evento de recombinación obligatoria, también en esta especie.

La existencia de sinapsis y recombinación en *P. guttata* permite extender la hipótesis de la existencia de una conducta conservada del par ZW aviario desde las aves más primitivas con cromosomas sexuales casi homomórficos (Ratitae) hasta los passeriformes, el grupo considerado de manera unánime como el más evolucionado en la clase aves.

IV. Modelo de la evolución del par sexual ZW en la clase aves

IV.6.1. Los modelos de evolución de los cromosomas sexuales

Los cromosomas sexuales son los componentes del cariotipo que llevan los genes determinantes del sexo, los cuales se localizan en un segmento que no recombina en el sexo heterogamético. Mientras que en algunos casos los cromosomas sexuales son fácilmente identificables

por su heteromorfismo, en muchos organismos no existen diferencias morfológicas aparentes, aún cuando puede deducirse el heterogametismo por pruebas de reversión sexual o de herencia de rasgos ligados al sexo. Aunque existe un consenso acerca de que el origen de los cromosomas sexuales diferenciados implica la transición del homomorfismo hacia el heteromorfismo, los fenómenos que provocan la diferenciación morfológica y la inactividad genética de uno de los cromosomas sexuales (Y o W), y su relación con los factores sexuales, aún no están completamente aclarados.

A continuación se exponen dos modelos de evolución de los cromosomas sexuales : en ambos casos se parte de un estado homomórfico y sostienen como rasgo ineludible la necesidad de aislamiento recombinacional de los factores determinantes del sexo, ya que si estos factores fueran separados entre sí por recombinación, conducirían a la esterilidad del individuo portador. El primer modelo es la interpretación clásica de Ohno (1967) acerca de la formación de cromosomas sexuales heteromórficos en los ofidios ; el segundo modelo fue desarrollado por Charlesworth (1991), y es un modelo más general y abarcador, que puede aplicarse a la diferenciación de los cromosomas sexuales observada en varios taxones.

En el grupo de los ofidios, las evidencias taxonómicas favorecen la visión de que la dirección de los cambios en la transformación de los cromosomas sexuales (Z y W) sigue el sentido de la evolución de los representantes de este taxón. El suborden Serpentes comprende cuatro familias : Boidae, Colubridae, Viperidae y Elapidae. Los integrantes de la familia Boidae retienen los caracteres morfológicos de las serpientes primitivas, los colúbridos tienen rasgos morfológicos intermedios y los elápidos y vipéridos son los más modernos y diversificados. Los cromosomas ZW son indistinguibles morfológicamente en los boidos ; en los colúbridos difieren únicamente para una inversión pericéntrica en el W ; y en elápidos y vipéridos el W es más pequeño y completamente heterocromático (Figura 63). Ohno (1967) interpretó que los distintos grados de diferenciación de los cromosomas sexuales observados en los distintos grupos de ofidios, representaban la transformación real ocurrida durante la transición del homomorfismo al heteromorfismo. De acuerdo con esta hipótesis el primer

Evolución de los cromosomas sexuales en los ofidios

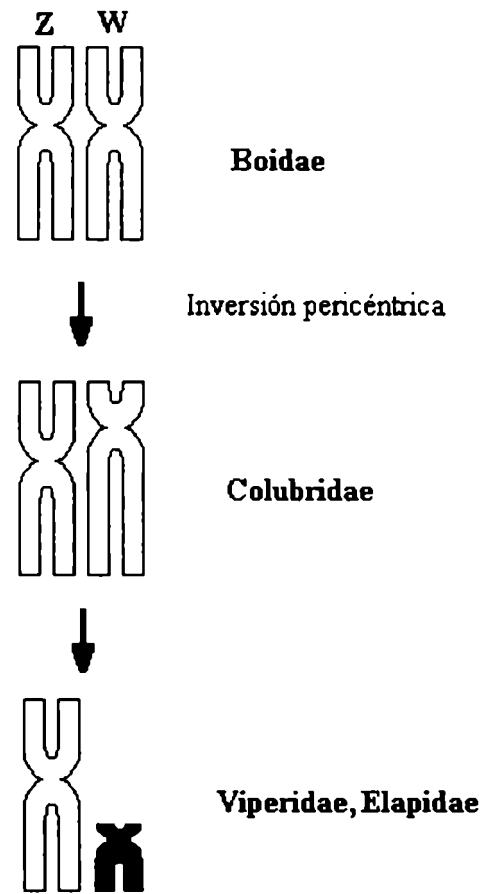


Figura 63. Esquema de las variaciones morfológicas del par ZW de los ofidios durante su paso del estado homomórfico inicial hasta el heteromorfismo marcado en las serpientes más evolucionadas.

paso en la diferenciación de los cromosomas sexuales en los ofidios fue una inversión pericéntrica en el cromosoma W, como se observa en los colúbridos. Este rearrreglo proporcionaría estabilidad al aislamiento meiótico, imprescindible para mantener un grupo de ligamiento de los factores sexuales en uno de los sexos. La inversión pericéntrica no suprimiría el entrecruzamiento *per se* pero crearía una fuerte necesidad para que se estableciera un mecanismo de aislamiento permanente, ya que si se produjera un entrecruzamiento en la región invertida surgirían productos meióticos desbalanceados. La creación de este aislamiento permanente facilitaría el proceso posterior de diferenciación de los cromosomas sexuales. El deterioro uno a uno de los genes del W daría tiempo para que los genes del Z se “adaptasen” a su nueva condición hemigónica en el sexo heterogámico. Una vez completado el deterioro el W se encontraría casi completamente libre de genes, exceptuando aquéllos relacionados con la determinación sexual, y los que se localizaran en la zona recombinante necesaria para una segregación regular. Aplicado a la evidencia citológica de los ofidios, el W invertido de la familia Colubridae representaría este estado de deterioro avanzado. A partir de este momento surgirían las diferencias morfológicas marcadas entre el Z y el W. Según Ohno el siguiente paso lógico en el proceso de diferenciación sería la eliminación de aproximadamente la mitad del material genético del W por un entrecruzamiento accidental, lo que originaría el pequeño cromosoma W de los elápidos y vipéridos.

Como se mencionó previamente, la restricción del entrecruzamiento entre los cromosomas sexuales es un punto crítico en el proceso de su evolución. En el modelo de Ohno este aislamiento es consecuencia de una inversión pericéntrica, y la existencia de pares ZW que difieren por la presencia de este tipo de rearrreglo es la evidencia que apoya esta conclusión. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este tipo de rearrreglos estructurales tienen comúnmente efectos deletéreos, ya que dificultan el desarrollo normal de la meiosis y pueden llevar a la producción de productos con deleciones o duplicaciones si se produce un entrecruzamiento en el segmento invertido. En consecuencia, el destino más probable de este rearrreglo es su eliminación por selección, por lo cual resultaría altamente

improbable la adquisición simultánea de un mecanismo de aislamiento meiótico junto con la inversión.

Más recientemente se ha postulado que el aislamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis se debe a la actividad de un mecanismo génico, y que los rearrreglos estructurales son una consecuencia, más que la causa, de la supresión del entrecruzamiento (Charlesworth, 1978 ; Bull, 1983 ; Charlesworth, 1991). Según este modelo el primer paso en la evolución de los cromosomas sexuales involucra la restricción del entrecruzamiento entre los genes que controlan las funciones de determinación sexual, más que la restricción amplia a todo lo largo de los cromosomas X e Y primitivos. La necesidad de una mayor restricción de la recombinación podría surgir por la aparición en el Y de genes sexualmente antagonistas (Rice, 1987), es decir, genes cuya actividad es ventajosa para el sexo heterogamético, pero desventajosa para el sexo homogamético. Un ejemplo de este tipo de genes lo constituyen los genes para el color brillante de los machos, en los peces *Poecilia* y *Xiphophorus*. En las poblaciones naturales, el color rojo brillante representa una desventaja, ya que aumenta las tasas de predación. En los machos, sin embargo, los colores brillantes aumentan el éxito reproductivo, y por lo tanto la probabilidad de dejar descendencia, de manera tal que se supera las desventaja ligada a la predación (Kalman, 1970 ; Endler, 1980). Como consecuencia, la selección promovería el ligamiento estrecho de los genes para el color rojo (genes antagonistas) a los factores sexuales, asegurando su transmisión a la descendencia masculina ; de esta manera se habría ampliado la zona de restricción de la recombinación. Otra razón que podría conducir a la ampliación de la zona no recombinante en el par sexual, es la aparición de más factores involucrados en la determinación sexual (ver Introducción Sección 1.9.2). Como consecuencia de la elaboración de mecanismos fisiológicos, morfológicos y de conducta diferentes en cada sexo, aumentarían las diferencias entre el X y el Y primitivos, y por esta razón, la restricción de la recombinación entre los cromosomas sexuales debe extenderse aún más. En un determinado momento la zona de restricción de la recombinación sería lo suficientemente amplia como para poder distinguirse citológicamente como una región libre de quiasmas o nódulos de recombinación, aún cuando los gonosomas no sean

diferenciables morfológicamente. Cuando esta situación se ha establecido, el cromosoma X recombina regularmente en el sexo homogamético, mientras que una parte del Y (su región diferencial) no recombina en el sexo heterogamético ; por este motivo los loci en ella contenidos están expuestos al deterioro progresivo que puede explicarse por el mecanismo de trinquete de Muller o por el transporte "gratuito" de genes (ver Sección I.8). Una vez establecido el aislamiento meiótico y debido a la inactividad genética del Y, la introducción de rearrreglos estructurales (o aún la pérdida de material genético) en la región diferencial de este cromosoma, podrían producirse sin consecuencia deletéreas para el organismo. Una de las consecuencias de este modelo de deterioro del Y, es la variación de la constitución de su cromatina aún en taxones tan próximos entre sí como los géneros de una misma familia. Esto se debe a que su región diferencial está expuesta a la invasión de secuencias parásitas, variantes durante la filogenia. De la misma manera el segmento homólogo de los cromosomas sexuales (región "pseudautosómica") no representa el remanente del X y el Y primitivos y se espera que esté sujeto a cambios (por ejemplo a través de la adición de material genético) como lo están los segmentos autosómicos.

Las evidencias experimentales acerca de algunas postulaciones de este modelo no son sencillas de obtener, especialmente en lo referente a los mecanismos de deterioro del Y, ya que estos cambios sólo son evidentes en tiempos evolutivos sumamente largos. El análisis de la heterocromatina del Y podría proveer evidencias indirectas de este proceso ya que se esperaría encontrar una amplia variedad de secuencias repetivas, como se explicó anteriormente. La existencia de pares sexuales no diferenciados en los que hay restricción parcial de la recombinación sin cambios estructurales, son una evidencia en favor del establecimiento de la restricción como un paso previo a la transformación de los cromosomas sexuales.

IV.6.2. La situación en la clase Aves

En la clase Aves, como en los ofidios, también ocurren variaciones morfológicas en los

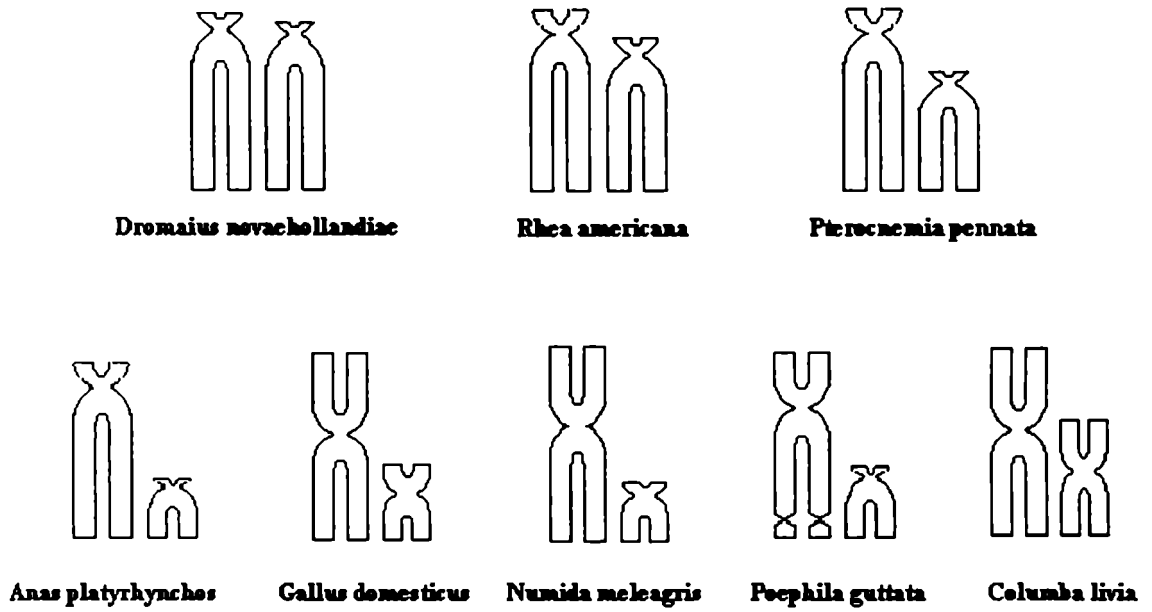


Figura 64. Variaciones morfológicas de los pares ZW en las Ratitae (arriba) y en las aves carinadas (abajo). Los esquemas están hechos a escala, guardando las proporciones relativas entre los cromosomas Z y W. El tamaño relativo del cromosoma Z es aproximadamente constante entre las distintas especies.

cromosomas sexuales, que podrían representar los cambios evolutivos que han llevado a los cromosomas Z y W altamente diferenciados que se observan en la mayoría de las especies de aves con cariotipo conocido. Entre las aves más primitivas (Ratitae) encontramos pares ZW de tamaño y morfología muy similar, aunque en algunas especies la diferencia de tamaño entre los cromosomas sexuales es mayor que en otras ; esta diferencia es especialmente marcada en *P. pennata* (rhea darwiniana) donde el W es un tercio menor que el Z (Figura 62). Además de la similaridad morfológica superficial, en *R. americana*, *D. novaehollandiae* y *P. pennata*, el patrón de bandas G demuestra que el W corresponde a la región distal del cromosoma Z (Ansari et al., 1988). Por consiguiente, es posible ordenar los pares ZW de las Ratitae, desde el máximo de homomorfismo, en *D. novachollandiae* hasta el menor de *P. pennata* (Figura 64).

En las aves no ratites (carinadas) el heteromorfismo del par sexual es aún más marcado y la diversidad morfológica del W es evidente, aún cuando se toma sólo una muestra de los taxones analizados. Esta diversidad se observa no sólo en la relación de brazos del W, sino en su tamaño absoluto (Figura 64).

En todas las especies analizadas en el presente trabajo de tesis el cromosoma Z representa alrededor de un 7 % del genoma, lo que está de acuerdo con la constancia del tamaño relativo del Z en la mayoría de las especies de aves cariotipadas.

IV.6.3. Distribución de la heterocromatina en el par ZW aviario

De acuerdo con el modelo teórico de evolución de los cromosomas sexuales expuesto al comienzo, una de las formas de expresión del deterioro génico subsiguiente a la restricción de la recombinación es la aparición de heterocromatina en el segmento diferencial de los cromosomas X o Y (Z o W). Por esta razón, el análisis de la localización y composición de la heterocromatina por medios citológicos y moleculares es esencial para demostrar las variaciones graduales en un sistema cromosómico sexual (Figura 65).

En el presente trabajo se ha demostrado por primera vez la existencia de heterocromatina en el par sexual de una ratite. Ambos gonosomas de *R. americana* muestran heterocromatina centromérica, y adicionalmente, el brazo corto del cromosoma W es heterocromático, aunque se colorea más debilmente que la banda centromérica. Esta diferencia en la intensidad del bandeo, que es consistente en las distintas preparaciones, puede atribuirse a una diferencia de composición con respecto a la heterocromatina centromérica (esta última probablemente sea similar en composición a las secuencias satélites centroméricas de los mamíferos).

En los estudios de cariotipado de aves carinadas que incluyen accesoriamente el bandeo C, el cromosoma W se indica simplemente como "fuertemente heterocromático". Sin embargo, cuando se realizan análisis especialmente dirigidos a localizar la heterocromatina o caracterizar su replicación en los cromosomas mitóticos, se han encontrado variaciones con respecto a este patrón simplificado. Entre dichas variaciones se ha señalado la replicación relativamente temprana del brazo corto del W de *G. domesticus* y de parte del W de *Gyps fulvus* (Falconiformes) (Schmid et al., 1989). En otros casos, después del bandeo C han podido observarse segmentos eucromáticos en el W de dos especies de gaviotas del género *Larus* (Ryttman et al., 1975), en el falconiforme *Gypaetus barbatus* (Mayr y Auer, 1988) y en varias especies de Columbiformes (De Lucca, 1983). Estas descripciones previas son muy someras, puesto que los autores no han destacado su significado biológico ni evolutivo, sino que las han presentado como meras variantes del cromosoma W. En el presente trabajo se ha subrayado la presencia de eucromatina en el W de *C. livia* y se han analizado comparativamente los patrones de bandeo C de los cromosomas W. La presencia de eucromatina en el cromosoma W de *C. livia* tiene un correlato muy significativo en los cromosomas plumulados de esta especie, descritos por Solovei et al. (1993), puesto que este W es el que posee lazos con indudable actividad transcripcional.

El cromosoma Z es mayormente eucromático, aunque en algunos casos se ha descrito la presencia de un bloque heterocromático terminal en el brazo largo. Este es el caso de *G. domesticus* (Pollock y Feccheimer, 1980) y *C. coturnix* (Stock y Bunch, 1982), y de *P. guttata* y *C. livia*, en los

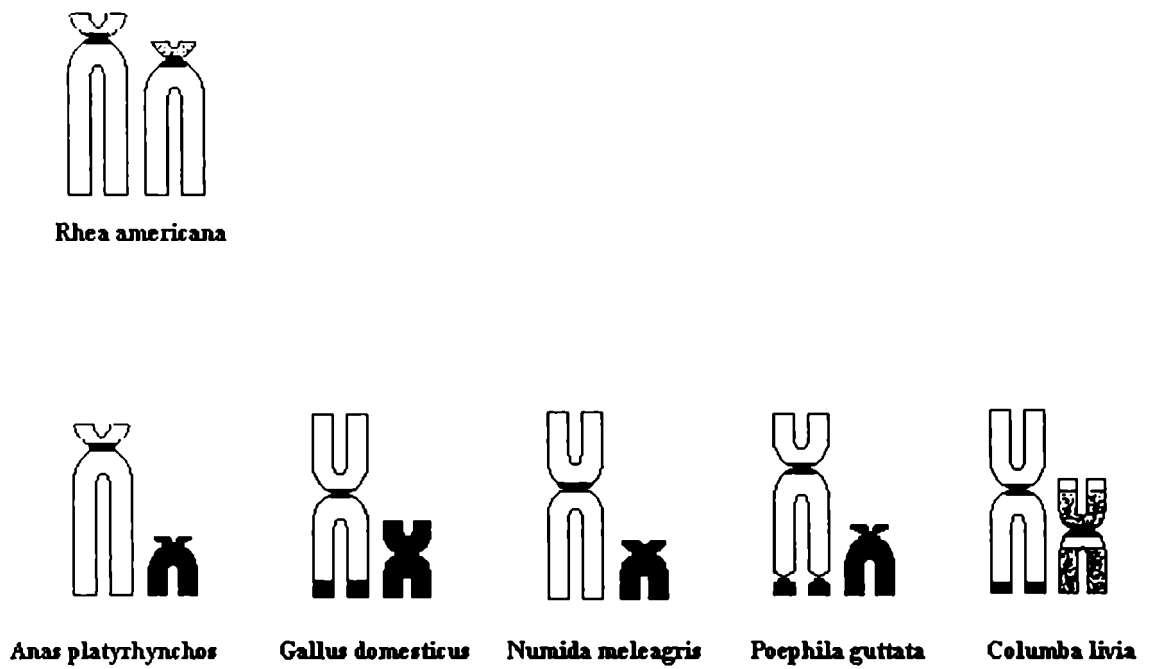


Figura 65. Distribución de la heterocromatina constitutiva en los cromosomas Z y W aviaros. El punteado en el W de *R. americana* y de *C. livia* indican una menor intensidad de coloración en el bandeo C. La eucromatina se representa en blanco. En el brazo corto del W del pollo hay una región eucromática (sin secuencias repetitivas) que no es aparente al microscopio óptico.

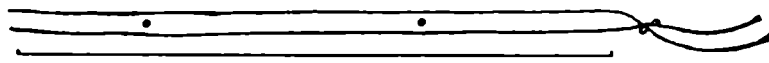
que se observa coincidentemente un bloque de heterocromatina telomérica. Con toda seguridad la composición de dicha heterocromatina difiere en las distintas especies, ya que la familia de macrosatélites que compone la heterocromatina telomérica de *G. domesticus* está restringida al género *Gallus*, por lo cual debe haber surgido en su antecesor directo (Hori et al., 1996). De la misma manera la heterocromatina del Z en las otras especies mencionadas debe haberse adquirido separadamente.

IV.6.4. Las dimensiones de la zona recombinante en el par ZW aviario

La existencia de sinapsis y recombinación en el par ZW aviario ha sido demostrada, por la presente Tesis, en varias especies de aves carinadas y en una Ratitae. En las aves carinadas el apareamiento del ZW heteromórfico es completo hacia el paquitene tardío; sin embargo la recombinación está restringida a un pequeño segmento en la región de inicio de la sinapsis, como lo indica la presencia invariable de un nódulo de recombinación en esta zona. Se ha señalado que el CS del par ZW donde se encuentra el NR no está afectado por los giros del eje Z, y esto ha sido interpretado como consecuencia de la existencia de una región de homología o región “pseudautosómica” a este nivel (Solari et al., 1988; reseñado por Solari, 1994). Además de la evidencia provista por los estudios del par ZW aviario durante el paquitene, la recombinación en el par ZW ha sido descrita en seis especies de aves carinadas en el estadio de cromosomas plumulados: tres Galliformes (*G. domesticus*, *C. coturnix* y *Meleagris gallopavo*), una Columbiforme (*C. livia*) y dos Paseriformes (*Passer domesticus* y *Fringilla coelebs*) (Solovei et al., 1993). En *G. domesticus* y *C. coturnix* se observa un único quiasma en posición terminal, en correspondencia con la posición del NR muy cercana al telómero; mientras que en *C. livia* el quiasma es subtelomérico, lo cual está de acuerdo con la posición del nódulo de recombinación (más alejada del extremo cuando se la compara con los Galliformes) (Figura 66).

La comparación de los pares ZW en paquitene nos permite determinar el segmento donde se localiza el NR (o los varios NRs en el caso de *R. americana*) en cada especie, lo cual provee una

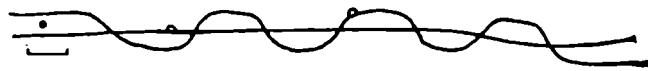
Rhea americana



Anas platyrhynchos



Numida meleagris



Gallus domesticus



Columba livia



Poephila guttata



1 μ m

Figura 66. Comparación de la longitud de la zona recombinante en los pares ZW. El nódulo de recombinación se representa en la posición promedio en cada especie. Los segmentos debajo de cada par ZW marcan el rango de las distancias desde el NR al extremo sináptico.

medida de la extensión de la región recombinante (Figura 66, Tabla 12). Este segmento mide en promedio entre 0.14 y 0.87 μm en las aves carinadas, pero es considerablemente mayor (10.7 μm) en el caso filogenéticamente distinto del par ZW de *R. americana*. Aún en especies muy próximas entre sí, como *G. domesticus* y *C. coturnix* (familia Phasianidae) la extensión del segmento recombinante es muy diferente, ya que en la última especie sólo mide 0.14 μm , menos de la mitad que en *G. domesticus*. Esta variación de la longitud de la zona recombinante en las aves carinadas es una medida de la variabilidad de dicha región, lo que permite sugerir su falta de conservación en los distintos taxones.

IV.6.5. Composición del cromosoma W

El cromosoma W de las aves carinadas está formado principalmente, pero no completamente, por heterocromatina constitutiva. La composición de dicha heterocromatina ha sido analizada en tres especies de Galliformes, encontrándose cuatro familias de secuencias repetitivas : Xho I y EcoRI en el pollo, Pst I en los pavos y Taq I en los faisanes (revisado por Mizuno et al., 1993). Todas estas familias tienen un patrón de organización similar :a) consisten en secuencias de unos 21 pb repetidas en tandem ; y b) en la mayoría de estas unidades repetitivas hay segmentos ($A_{3.5}$) y ($T_{3.5}$), que aparecen alternadamente casi en cada período de la hélice de ADN (Saitoh et al., 1992). Debido a esta última característica, estas secuencias tienen la particularidad de adoptar configuraciones fuertemente incurvadas, como es común en las secuencia repetitivas que componen la heterocromatina. Más allá de estos caracteres estructurales comunes, la homología de las secuencias de las diferentes familias es relativamente baja, por lo cual sólo hibridan de manera cruzada en condiciones de muy baja estrictez. Esta disparidad en las secuencias repetitivas en especies del mismo orden, y aún de la misma familia (pollo y faisanes), reflejan la amplia variación de secuencias que no están sujetas a la selección natural debido a su falta de significado transcripcional.

La secuencia de bases, propiedades de curvatura y localización sobre el W, han sido caracterizadas en detalle para las secuencias *Eco* RI y *Xho* I de *G. domesticus*. Alrededor del 65 % del

W del pollo está ocupado por estas secuencias, que se ubican en dominios parcialmente superpuestos a lo largo del cromosoma. Mediante hibridación *in situ* y fluorescencia (FISH) sobre los cromosomas mitóticos (Saitoh y Mizuno, 1992) y sobre el bivalente ZW en paquitene (Solari y Dresser, 1995), se estableció que la familia *Xho*I es pericentromérica, en tanto que la familia *Eco*RI ocupa la mayor parte del brazo largo y una parte del brazo corto. La hibridación sobre los pares ZW en paquitene ha demostrado que el extremo recombinante del par ZW del pollo no contiene repeticiones de *Eco*RI y *Xho*I, lo cual está de acuerdo con la comprobación, en general, de la escasez de secuencias repetitivas en las regiones que muestran recombinación.

Los únicos genes del W aviario han sido aislados de los cromosomas W del pavo y del pollo, y del passeriforme *Parus major*. El gen DZWM1 fue clonado a partir de una genoteca de ADNc de pavo, se encuentra ligado al W en varias especies de aves pero la naturaleza del gen permanece sin conocerse (Halverson, 1990 ; Halverson y Dvorak, 1993). El segundo gen fue aislado a partir de una genoteca de ADN genómico de *P. major*, y su ligamiento al cromosoma W ha sido verificado en otras 14 especies de aves carinadas. Este gen ha sido denominado CHD-W (cromodominio-helicasa, ligada al W) por su relación con un gen similar descrito en el ratón, y de su secuencia de nucleótidos pudo determinarse que contiene tres dominios : un modificador de la organización de la cromatina, una helicasa-ATPasa y una región de unión al ADN. Los dos primeros dominios han sido descritos en genes separados que regulan funciones opuestas durante el desarrollo en *Drosophila*, por lo cual resultaría interesante saber cómo interactúan dos regiones con efectos antagonistas dentro de un mismo producto génico (Griffiths et al., 1996).

IV.6.6. Conservación del cromosoma Z aviario

Aunque la morfología del cromosoma Z aviario es variable, su tamaño relativamente conservado en diferentes taxones, y, por otra parte, el ligamiento al sexo de factores que controlan las características del plumaje en varias especies distintas han conducido a la hipótesis de la conservación

del Z como grupo de ligamiento durante la filogenia aviaria (Beçak et al., 1964 ; Ohno, 1967). Además, en *G. domesticus*, el ligamiento al Z del gen de la enzima de la aconitasa (citoplasmática), ha sido demostrado mediante cruzamiento entre hembras de gallina de Guinea y machos de *G. domesticus* como se explicó en la Introducción, p. 18). Este gen está también probablemente ligado al sexo en un psitaciforme y dos especies de passeriformes, ya que se ha observado la presencia de isoformas de la enzima en el macho pero no en la hembra (Baverstock et al., 1982 ; Lacson y Morizot, 1988).

También se han localizado dos genes sobre el Z del pollo, mediante hibridación in situ y fluorescencia : el gen ZOV3, ubicado en el medio del brazo corto y el gen IREBP cerca del bloque de heterocromatina telomérico del brazo largo (Saitoh et al., 1993). La realización de improntas de Southern con ADN genómico de machos y hembras en cinco géneros aviarios distintos muestra que la señal de hibridación en los machos es aproximadamente el doble de intensa que en las hembras, apoyando firmemente la hipótesis del ligamiento al sexo de estos genes en todas las especies analizadas (Saitoh et al., 1993).

IV.6.7. Ubicación de los taxones analizados en la filogenia aviaria

Como ocurre con muchas clasificaciones, el ordenamiento taxonómico de las aves es objeto de numerosas interpretaciones, a menudo contradictorias. A fin de comprender la propuesta de las transformaciones sucesivas del par ZW que se propone en la siguiente sección es necesario ubicar a las especies analizadas dentro del árbol filogenético de la clase Aves.

Recientemente se ha presentado un árbol filogenético que representa el momento y el ordenamiento de divergencia de varios órdenes aviarios, que representa un consenso relativamente amplio entre los especialistas en el tema (Figura 67). Este árbol establece la divergencia de un número de órdenes aviarios, desde antes del límite Cretácico-Terciario, comparando las variaciones en las secuencias de un protooncogen (*c-mos*) y de una subunidad de ARN mitocondrial, en 15 órdenes de aves (Cooper y Penny, 1997). Los autores miden la distancia evolutiva entre los linajes contabilizando

las diferencias en la secuencia del ADN de dichos genes : a mayor distancia entre dos especies, mayor tiempo de divergencia evolutiva a partir de un antecesor común. El ordenamiento resultante muestra que las Ratitae y los Galliformes divergen tempranamente del tronco aviario más primitivo, seguidos de los psitaciformes y otra rama de la que parten numerosos clados diferentes, entre ellos los Paseriformes (Cooper y Penny, 1997). Dentro de las ratites, el kiwi, el emu y el avestruz forman un tronco que se separa de las "rheas" antes del límite cretácico terciario (hace más de 65 millones de años). La condición ancestral de las ratites y la divergencia temprana de los Galliformes también han sido sostenidas en otras filogenias moleculares construidas a partir de datos de hibridación de ADN (Sibley y Alhquist, 1990). Desafortunadamente, entre los taxones ordenados por Cooper y Penny no se encuentran representantes de Anseriformes y Columbiformes (analizados en el presente trabajo), por lo cual la posición de dichos taxones debe realizarse de acuerdo con criterios taxonómicos diferentes. Sibley y Alhquist (1990) sitúan la divergencia de los Anseriformes muy tempranamente, junto con los Galliformes. Las evidencias citotaxonómicas apoyan esta relación, ya que las Galliformes más primitivas (Megapodidae) tienen un cariotipo similar al cariotipo modal de los Anseriformes, con una mayoría de macrocromosomas acrocéntricos (Stock y Bunch, 1982 ;Belterman y De Boer, 1984). Sin embargo, las Galliformes más evolucionadas (Numididae y Phasianidae), muestran un cariotipo diferente en los macrocromosomas derivado del supuesto cariotipo ancestral de los galliformes a través de inversiones y deleciones (Belterman y De Boer, 1984). Así, mientras las Anseriformes y Galliformes más primitivas retienen el cariotipo supuestamente ancestral (semejante al de las Ratitae), la mayoría de las Galliformes muestran un patrón diversificado (Stock y Bunch, 1974 ; Belterman y de Boer, 1984 ; Ansari et al., 1988). Estas variaciones en el cariotipo están relacionadas con las progresivas variaciones del par ZW según se discute más adelante.

Finalmente, los Columbiformes (representados en este estudio por *C. livia*), constituyen un taxón monofilético, sin relaciones reconocibles entre las aves actuales. De acuerdo a los estudios de hibridación de ADN el origen de los Columbiformes es relativamente reciente en la filogenia aviaria,

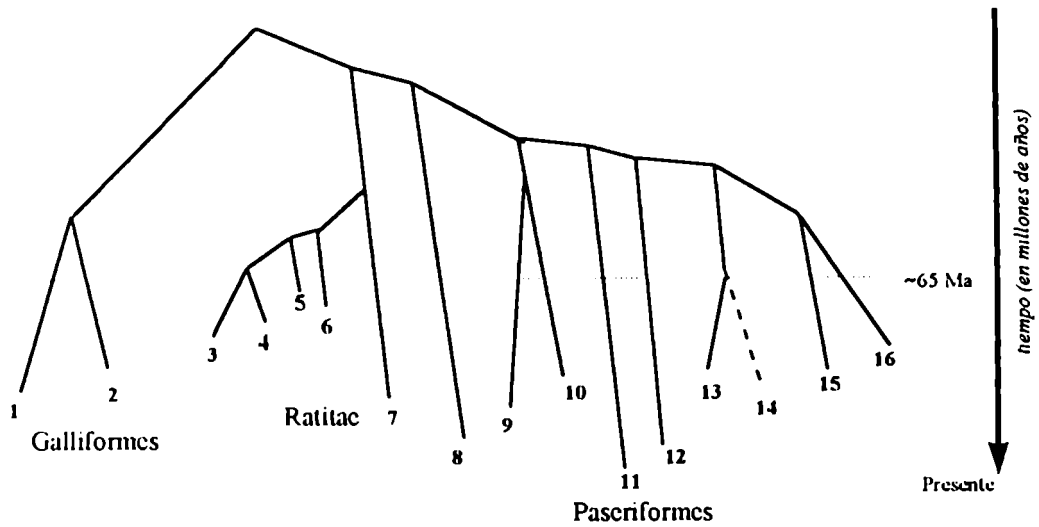


Figura 67. Arbol filogenético aviario que muestra las relaciones entre 15 órdenes aviarios que tienen representantes vivientes en la actualidad. Los números corresponden a una o más especies analizadas dentro de cada orden : 1) *G. domesticus* y 2) *N. meleagris* (Galliformes); 3) *C. casuarius*, 4) *D. novaehollandiae*, 5) *A. australis*, 6) *S. camelus* y 7) *P. pennata* (Reiformes, Ratitac); 8) Psitaciformes; 9) Pelecaniformes; 10) Charadriiformes; 11) Paseriformes; 12) Strigiformes; 13) Sphenisciformes; 14) y 15) Procelariformes y Gaviiformes. Redibujado de Cooper y Penny (1997).

junto con el de los Paseriformes (Sibley y Alhquist, 1990).

IV.6.8. Un modelo para la emergencia del par ZW aviario

En la hipótesis que presenta esta Tesis, el par sexual primitivo de la clase Aves sería probablemente un par acrocéntrico homomórfico, con un cromosoma W, mayormente homólogo del Z y activo. Este cromosoma W primitivo debería diferir del Z por la presencia de (al menos) dos genes relacionados con la determinación del sexo femenino. Estos genes deberían localizarse en un segmento con baja probabilidad de recombinación (por ejemplo cerca del centrómero) hasta que se desarrollara un mecanismo de aislamiento recombinacional efectivo que evitara la ruptura del ligamiento de dichos genes. El aislamiento permanente estaría proporcionado por un mecanismo de supresión de la recombinación a nivel pericentromérico y del brazo corto del proto-cromosoma W. Este mecanismo podría estar representado por una inversión en esa región cromosómica, o podría consistir en la actividad de genes “modificadores” de la tasa local de recombinación. Como consecuencia del aislamiento recombinacional, este segmento cromosómico se encuentra ahora expuesto al deterioro mediante el mecanismo del trinquete de Muller, que conduce a la inactividad (y posteriormente a la formación de heterocromatina constitutiva) del segmento no recombinante o región diferencial del W (ver Introducción, sección I.8). La manifestación citológica de este estadio de diferenciación del par ZW se encuentra en los pares casi homomórficos de algunas especies de Ratitae, como el kiwi (*A. australis*) y el emu (*D. novaehollandiae*) (Figura 64), lo que concuerda con su ubicación taxonómica en un clado divergente del de las reiformes (Cooper y Penny, 1997). En *R. americana* la primitividad de estado de diferenciación del par ZW se manifiesta en la extensa región de homología donde se produce libre recombinación (Figura 56, Sección IV.3.4) y la región diferencial se manifiesta por el estado heterocromático de la porción pericentromérica del W y su brazo corto (Figura 65). La diferencia de tamaño más marcada que se observa en *P. pennata* puede considerarse un grado más avanzado de diferenciación, aunque no existen bases taxonómicas para considerar a esta especie como evolutivamente más avanzada que *Rhea americana*. Esta diferencia podría representar simplemente

una ampliación del tamaño inicial del segmento no recombinante en el W del tronco conducente a la rhea darwiniana.

Durante la diversificación de la clase Aves habrían surgido nuevos genes involucrados en la determinación sexual o la fertilidad, o genes sexualmente antagonistas ; y como consecuencia, la selección favorecería la extensión del aislamiento recombinacional , progresivamente, hasta cubrir casi toda la extensión del W. Como resultado, la mayor parte del W quedaría expuesto a la inactivación y la heterocromatinización y la región recombinante quedaría reducida a un segmento terminal de los gonosomas (Figura 66). Ambas características han sido demostradas en todas las especies de aves carinadas analizadas en el presente trabajo : la constitución predominantemente C+ del W y la localización restringida de un único NR cerca del extremo sináptico (Figuras 65 y 66). Estas variaciones morfológicas del W son acompañadas también por variaciones de forma del Z que, sin embargo, mantiene su proporción relativa dentro del genoma. En *A. platyrhynchos* el Z es acrocéntrico y su patrón de bandas G es similar al de las ratites por lo que puede considerarse al par ZW de esta especie como un tipo relativamente ancestral entre las carinadas, al igual que el resto del cariotipo de los Anseriformes (Ver sección anterior). La morfología submetacéntrica o metacéntrica del Z de Galliformes (*N. meleagris* y *G. domesticus*), puede interpretarse como derivada, ya que ambas especies pertenecen a familias relativamente modernas dentro de los Galliformes. Finalmente, en los pares ZW más modificados, aparecen como variantes ciertos bloques de heterocromatina telomérica (*G. domesticus*, *C. livia*) ; y a esto se le añade la aparición de una constricción secundaria en el cromosoma Z de *P. guttata* (Paseriformes).

Aún en los pares ZW más diferenciados, se mantiene un segmento recombinante pequeño, donde se observa invariablemente un NR. El propósito de la conservación del segmento recombinante es asegurar la formación de un quiasma, que permita la correcta segregación de los gonosomas durante la anafase I, y de esta manera asegurar el mantenimiento del sistema cromosómico sexual.

Entre las aves vivientes no se encuentra ya el par completamente homomórfico ancestral, y

dada la conservación del sistema cromosómico sexual ZW de la clase Aves, podría presumirse que este sistema ya estaba establecido en el tronco reptiliano que dio origen a las aves. De todas maneras, pueden encontrarse ejemplos de cromosomas sexuales homomórficos en otros grupos de vertebrados ; y en algunos de ellos se ha probado la existencia de recombinación restringida, aún cuando se mantiene una extensa homología. La existencia de aislamiento recombinacional ha sido verificada en el par XY de los peces *O. latipes* y *L. reticulatus*, aún cuando los cromosomas sexuales son indistinguibles citológicamente y la determinación del sexo heterogamético se realiza por pruebas de reversión sexual (Yamamoto, 1947). En la salamandra *Triturus h. helveticus* el par sexual no se distingue citológicamente, pero el par #4 ha sido identificado como el par XY, por la restricción quiasmática que muestra este par en la meiosis masculina, y porque en especies relacionadas el par #4 muestra un heteromorfismo de bandas C en el macho (Schmid et al., 1979). Entre los anuros se han descrito pares sexuales escasamente diferenciados, cuya homología puede ser observada detalladamente por el patrón de lazos de los cromosomas plumulados. Por ejemplo, en *R. rugosa* los cromosomas Z y W difieren por una inversión pericéntrica, pero mantienen la homología y no recombinan en el segmento invertido, aún cuando éste es lo suficientemente extenso como para formar un lazo de inversión que posibilite el intercambio (Miura et al., 1996). Los casos mencionados constituyen la evidencia de la existencia de un mecanismo de control de la recombinación previo a las transformaciones morfológicas de los gonosomas, en la evolución de los pares sexuales heteromórficos. Es decir, que la restricción de la recombinación es un fenómeno extendido en el proceso de diferenciación de los cromosomas sexuales, y constituye el factor desencadenante de este proceso cuando hay un sistema de determinación sexual que exija la reducción del intercambio en el sexo heterogamético.

IV.7. Comparación de los sistemas cromosómicos sexuales de aves y mamíferos

La existencia de un par ZW altamente diferenciado y que posee una región recombinante en las aves carinadas, se asemeja a lo observado en el par XY de los mamíferos. Al igual que en las aves,

la sinapsis parcial del par XY de los mamíferos fue demostrada por la observación de los ejes sexuales durante el paquitene. La reconstrucción tridimensional de espermatozoides en el ratón (Solari, 1970a y b), el ser humano (Solari y Tres, 1970) y el hamster armenio (Solari, 1974), entre otras especies, demostró la formación de un complejo sinaptonémico corto entre el X y el Y ; posteriormente , esta misma situación se describió en numerosas especies a partir de extendidos de CSs. La existencia de recombinación recíproca en el par XY ha sido firmemente establecida mediante pruebas genéticas, citológicas y moleculares en distintas especies de mamíferos euterianos (ver Introducción).

El presente trabajo ha provisto evidencias sólidas acerca de la existencia de un segmento recombinante, de longitud variable, en el par sexual aviar, el cual se encuentra aún en los pares sexuales más diferenciados de las aves carinadas. Es decir, que en el par ZW existe una región de recombinación, equivalente a la denominada región pseudoautosómica de los mamíferos euterianos (Burgoyne, 1982). Como ya se explicó, la región recombinante del par ZW heteromórfico de las aves carinadas tiene una longitud variable, que se evidencia por el rango de localización del NR en cada especie analizada (Figura 56), lo cual es una indicación de la variabilidad de dicho segmento. En el par XY de los mamíferos la variación del contenido genético de la región de recombinación ha sido demostrada entre varias especies, como lemures (prosimios), el ser humano y el ratón (Disteche et al., 1992 ;Toder et al, 1995 ; Ellison et al., 1996). Por lo tanto, el segmento recombinante no debe interpretarse como un segmento remanente del par sexual primitivo.

Aves y mamíferos han desarrollado separadamente sistemas cromosómicos sexuales que se mantienen conservados en ambas clases. Sin embargo, la amplitud de esta conservación es diferente dentro de las dos clases de vertebrados : el sistema ZZ/ZW aparece conservado en la filogenia de toda la clase Aves ; en cambio, entre los mamíferos, los marsupiales no muestran sinapsis en el par XY, aunque si forman un cuerpo XY y aseguran una segregación regular por un mecanismo particular (Solari y Bianchi, 1979 ; Sharp, 1982) ; es decir, probablemente en el par XY de los marsupiales no hay región pseudoautosómica. En la meiosis masculina de los Monotremas (*Platypus* y equidna) se ha

descrito un sistema gonosómico múltiple que forma un multivalente en cadena (Murtagh, 1977 ; Bick, 1990). Aunque la meiosis femenina no ha sido estudiada aún, se ha sugerido que el sistema cromosómico sexual de los Monotremas podría ser similar al descrito en algunas arañas, que está basado en la heterocigosis permanente de la traslocación múltiple en uno de los sexos (masculino).

De esta manera, mientras en las aves la presente evidencia muestra un único sistema cromosómico sexual conservado a lo largo de toda la filogenia, en los mamíferos, el sistema de cromosomas sexuales no parece haberse mantenido tan invariable. Sin embargo, debido al número relativamente escaso de especies de aves examinadas citológicamente, no puede descartarse la existencia de cromosomas sexuales múltiples derivados del sistema ZZ/ZW por traslocaciones de segmentos autosómicos a los cromosomas sexuales (como ocurre en otras clases de vertebrados y en numerosos invertebrados). La existencia de bandas eucromáticas en el W de *C. livia* puede interpretarse como la adición secundaria de cromatina a partir de un par de microcromosomas en el tronco original de las Columbiformes, ya que este rasgo está presente en otras especies de este orden. El carácter derivado de los segmentos eucromáticos es una interpretación más probable que la hipótesis alternativa de una conservación de segmentos del primitivo W, ya que las Columbiformes constituyen un grupo relativamente evolucionado dentro de la filogenia aviaria. La ausencia de lyonización en el Z aviario evita las restricciones que ejerce la inactivación del X sobre los segmentos traslocados ; en el pollo sólo se han descrito efectos fenotípicos leves de tales translocaciones, tales como una disminución en la producción de huevos y retraso en la madurez sexual en portadores de traslocaciones X-autosoma. En cambio, en los mamíferos, las traslocaciones X-autosoma usualmente causan esterilidad (De Boer, 1989).

VI.8. Areas para futuras investigaciones

En todas las filogenias aviarias modernas las especies pertenecientes al orden Tinamiformes son incluidas con las Ratitae en un grupo que ha recibido diferentes nombres según el ordenamiento

considerado (Cracraft, 1981 ; Sibley y Alhquist, 1991 ; Feduccia, 1997). Las tinamiformes comprenden 42 especies de aves exclusivamente sudamericanas, que formarían un grupo monofilético junto con las ratites, con las cuales comparten un conjunto de caracteres derivados. Entre estos caracteres se encuentran : el paladar paleognato, una estructura peculiar de la ranfoteca y una fenestra ilioisquiática grande (Cracraft, 1981). Las pruebas de hibridación de ADN también indican que las ratites y las tinamiformes se encuentran filogenéticamente muy cercanos, y que ambos taxones constituyen un grupo hermano de todas las demás aves vivientes (Sibley y Ahlquist, 1990).

Desafortunadamente, los estudios cariotípicos publicados sobre tinamiformes se reducen a la observación del cariotipo de una hembra de *Nothura maculosa* y de *Crypturellus parvirrostris*, sin que se hayan realizado bandeos que permitan caracterizar a este grupo desde el punto de vista citotaxonómico. Por su ubicación entre las aves más primitivas, las tinamiformes constituyen un grupo muy interesante hacia el cual dirigir las investigaciones del par ZW aviario.

Otro grupo importante a ser incluido en los estudios de la meiosis femenina, es el de los Falconiformes, especialmente los accipítridos. Este grupo está caracterizado por la reducción del número de microcromosomas y porque el cromosoma Z es uno de los más grandes del cariotipo.

Finalmente, debe subrayarse el retraso en el estudio de los cariotipos aviarios con respecto a las observaciones similares en otros vertebrados, hacen de las aves un grupo sumamente atractivo para las investigaciones citogenéticas.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis ha llevado a las conclusiones formuladas en los siguientes cinco puntos :

- A. Conservación del sistema cromosómico sexual ZW / ZZ en las aves.
- B. Conservación de un patrón básico de conducta meiótica del par ZW aviario.
- C. Equiparación de las tasas de recombinación en los dos sexos en las Aves.
- D. Descubrimiento y caracterización del cromosoma B en un ave.
- E. Propuesta del primer modelo de evolución del par ZW aviario.

A. A partir del análisis citológico y ultraestructural realizado en esta Tesis, y del análisis de la bibliografía sobre cariólogía aviaria, se concluye que el sistema cromosómico sexual se ha conservado durante la filogenia de la clase Aves ; pudiendo solamente preverse la posible existencia de sistemas sexuales múltiples, derivados de este sistema fundamental por la traslocación de segmentos autosómicos a un gonosoma.

B. Se concluye también la presencia conservada de un patrón de comportamiento de los cromosomas Z y W en la meiosis aviaria, cuyas características invariables son :

1. Sinapsis parcial de los cromosomas Z y W durante la profase meiótica (paquitene).
2. Igualización de las longitudes axiales de los gonosomas a medida que avanza el paquitene, a diferencia del par XY de los mamíferos, y de manera análoga a los procesos de "reajuste sináptico" en bivalentes heteromórficos de varios taxones.
3. Ausencia de condensación cromatinica en el Z y el W durante la meiosis ovárica y del par ZZ en la meiosis testicular, a diferencia del par XY de los mamíferos (evidenciando la ausencia de un gen de tipo *Xist*).
4. Existencia de recombinación obligatoria, aún en los pares ZW altamente diferenciados de las aves carinadas, a semejanza de la zona recombinante o "pseudautosómica" del par XY de los mamíferos.

C. La comparación de la frecuencia y distribución de los nódulos de recombinación en machos y hembras de *C. livia*, permite concluir que no hay diferencias en las tasas de recombinación entre ambos sexos en la mencionada especie. Se propone que esta similitud en las tasas de recombinación entre sexos, es característica de la clase Aves. Este rasgo establece una diferencia fundamental entre la meiosis aviaria y la de los mamíferos, ya que en estos últimos se ha comprobado la existencia de tasas de recombinación sustancialmente distintas entre sexos.

D. En la presente Tesis se demostró por primera vez la existencia de cromosomas B en las aves (única clase de vertebrados en la que no se habían descrito cromosomas B). El análisis de células somáticas y germinales de ambos sexos en varios individuos de *P. guttata*, reveló la restricción del cromosoma B a la línea germinal en ambos sexos. Se propone una hipótesis sobre la transmisión del cromosoma B, que aseguraría su permanencia en una dosis constante en las poblaciones de esta especie. Además, se propuso que el estado de inactividad del cromosoma B en la meiosis masculina, es una consecuencia del ambiente gonadal.

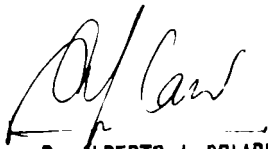
E. Se concluye que la evolución de los cromosomas Z y W en la clase Aves ha sido monofilética y lineal. En relación con ello se propone un modelo para explicar la transformación del par ZW, desde un estado inicialmente homomórfico al estado altamente heteromórfico que se observa en la mayoría de las aves vivientes. Este modelo de evolución del par ZW, es el primero que se presenta en la literatura para la clase Aves, de manera similar al modelo de evolución del par ZW de los ofidios propuesto por Ohno tres décadas atrás. El modelo de evolución del par ZW aviario propuesto en esta Tesis está basado en :

1. El análisis de los cromosomas sexuales en la mitosis, y de su conducta en la meiosis en cinco especies, pertenecientes a cinco órdenes aviarios, las cuales representan de manera significativa la filogenia aviaria. (Esos datos constituyen investigaciones originales presentadas en esta Tesis).
2. Estudios previos del par ZW aviario en la meiosis de otras especies, realizados con la misma metodología empleada en esta Tesis.

3. Los estudios del par ZW en el estadio de cromosomas plumulados.
4. Datos de la literatura recopilados en una amplia revisión bibliográfica sobre las características morfológicas básicas, y las variantes morfológicas de los cromosomas Z y W mitóticos; dichas evidencias han sido vinculadas por primera vez a un modelo de la evolución del par ZW aviario.
5. Las teorías generales sobre la evolución de los cromosomas sexuales, elaboradas en el marco de la genética de poblaciones, y que sirven de base al modelo propuesto.



MARÍA INÉS PIGOTTA



Dr. ALBERTO J. SOLARI
PROFESOR TITULAR
Eda. CATEDRA DE HISTOLOGIA, CITOLOGIA Y EMBRIOLOGIA

Apéndice

Recientemente, Ogawa et al. (1997) han identificado una secuencia no repetitiva en el cromosoma W del pollo, a partir de una genoteca construida por amplificación de un fragmento de un único cromosoma W de esa especie. La secuencia, denominada EE0.6, está ampliamente conservada en varias especies de aves carinadas lo cual la convierte en un recurso muy útil para el sexado. La secuencia EE0.6 mapea en el brazo largo del W del pollo, es decir, en el brazo opuesto al que lleva la zona recombinante (según se refirió anteriormente en la Introducción y Discusión). La mencionada secuencia no es funcional, puesto que en cada marco de lectura posible hay, al menos, un codón de paro. En algunas de las especies analizadas también se ha localizado una secuencia relacionada sobre el cromosoma Z, aunque se desconoce si ésta tiene alguna función génica. Los autores también refieren la presencia de secuencias relacionadas con EE0.6 en dos especies de ratites (avestruz y emu), pero todavía no se ha probado su ligamiento a los cromosomas sexuales.

BIBLIOGRAFIA

- Albini, S.M. y Jones, G.H.** (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *Allium fistulosum*. *Chromosoma* 95 : 324-338.
- Albini, S.M. y Jones, G.H.** (1988). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *Allium fistulosum*. II. Pachytene observations : the SC karyotype and the correspondence of late recombination nodules and chiasmata. *Genome* 30 : 399-410.
- Ansari, H.A., Takagi, N. y Sasaki, M.** (1988) Morfological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 47 : 185-188.
- Baverstock, P.R., Adams, M., Polkinghorne, R.W. y Gelder, M.** (1982). A sex linked enzyme in birds- Z-chromosome conservation but no dosage compensation. *Nature (London)* 296 : 763-766.
- Beçak, W. y Beçak, M.L.** (1981). Behaviour of the ZW bivalent in the snake *Bothrops jararaca*. *Chromosoma* 83 : 289-293.
- Beçak, W., Beçak M.L., Nazareth, H.R.S. y Ohno, S.** (1964). Close karyological kinship between the reptilian suborder Serpentes and the class Aves. *Chromosoma* 15 : 606-617.
- Belterman, R.H.R. y de Boer, L.E.M.** (1984). A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes 39 new to cytology. *Genetica* 65 : 39-82.
- Bianchi, N.O y Molina, O.J.** (1967). Chronology and pattern of replication in the bone marrow chromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma* 21 : 387-397.
- Bloom, S.E.** (1974). Current knowledge about the avian W chromosome. *Bioscience* 24 : 340-344.
- Bojko, M.** (1985). Two kinds of "recombination nodules" in *Neurospora crassa*. *Genome* 32 : 309-317.
- Borsani, G.R., Tonlorenzi, M. Simmler, M.C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Musny, A., Lawrence, C., Willard, H.F., Avner, P. y Ballabio, A.** (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351 : 325-329.
- Brockdorff, N, Ashworth, A., Kay, G.F., Cooper, P.J., Smith, S.** (1991). Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* 351 : 329-331.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R. y Willard, H.F.** (1991). A gene from the region of the human inactivation centre is expressed exclusively from the

inactive X-chromosome. *Nature* 349 : 38-44.

Bulatova, N. (1973). Unusually large sex chromosomes in some larks (Aves, Alaudidae). *Mamm. Chrom. Newsl.* 14 : 150-151.

Bull, J.J. (1978). Sex chromosome differentiation : an intermediate state in a lizard. *Can. J. Genet. Cytol.* 20 : 205-209.

Bull, J.J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California.

Burgoyne, P.S. (1982). Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes. *Human Genet.* 61 : 85-90.

Burt, D., Bumstead, N., Bitgood, J.J., Ponce de Leon, A. y Crittenden, L.B. (1995). Chicken genome mapping : a new era on avian genetics. *T. Genet.* 11 : 190-194.

Callan, H.G. y Perry, P.E. (1977). Recombination in male and female meiocytes contrasted. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Series B* 277 : 227-233.

Capanna, E., Civitelli, M.V. y Martinico, E. (1987). I cromosomi degli uccelli, citotassonomia ed evoluzione cariotipica. *Avocetta* 11 : 101-143.

Carpenter, A.T.C. (1975). Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodules — a recombination-associated structure at pachytene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 3186-3189.

Carpenter, A.T.C. (1979a). Synaptonemal complexes and recombination nodules in the wild type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92 : 511-541.

Carpenter, A.T.C. (1979b). Recombination nodules and synaptonemal complexes in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75 : 259-292.

Carpenter, A.T.C. (1987). Gene conversion, recombination nodules, and the initiation of in meiotic synapsis. *BiolEssays* 6 : 232-236.

Carpenter, A.T.C. (1993). The recombination nodule story - Seeing what you are looking at. *BiolEssays* 16 : 69-73.

Cattanach, B.M., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. y Barlow, J. (1982). Male, female and intersex development in mice of identical chromosome constitution. *Nature* 300 : 445-446.

Charlesworth, B. (1978). Model for the evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 5618-5622.

Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science* 251 : 1030-1033.

Clemson, C.M., McNeil, J.A., Willard, H.F. y Lawrence, J.B. (1996). XIST paints the inactive X chromosome at interphase : evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J.*

Cell Biol. 132 : 259-275.

Collins, A., Frezal, J., Teague, J. y Morton, N.E. (1996). A metric map of humans : 23,500 loci in 850 bands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93 : 14771-14775.

Cooper, A. y Penny, D. (1997). Mass survival of birds across the cretaceous-tertiary boundary : molecular evidence. *Science* 275 : 1109-1112.

Counce, S.J. y Meyer, G.F. (1973). Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *Chromosoma* 44 : 231-253.

Cracraft, J. (1981). Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *Auk* 98 : 681-714.

Croft, J.A. y Jones, G.H. (1986). Surface spreading of synaptonemal complexes in locusts.I. Pachytene observations. *Chromosoma* 93 : 483-488.

D'Hollander, F. (1904). Recherches sur l'oogénese et sur la structure et la signification du noyau vitellin de Balbiani chez les oiseaux. *Arch. Anat. Micr.* 7 : 117-180.

De Boer, P. y de Jong, J.H. (1989). Chromosome pairing and fertility in mice. In : *Fertility and chromosome pairing : Recent studies in plants and animals*. CRC Press, Boca Raton.

De Boer, L.E.M. (1976). The somatic chromosome complements of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genetica* 46 : 77-113.

De Boer, L.E.M. (1980). Do the chromosomes of the kiwi provide evidence for a monophyletic origin of the ratites? *Nature* 287 : 84-85.

De Boer, L.E.M. y Sinoo, R.P. (1984). A karyological study of Accipitridae (Aves : Falconiformes), with karyotypic descriptions of 16 species new to cytology. *Genetica* 65 : 89-107.

de Boer, P. y de Jong, J.H. (1989). Chromosome pairing and fertility in mice. In : Gillies, C.B., ed. *Fertility and chromosome pairing : Recent studies in plants and animals*. Boca Raton : CRC Press 37-76.

De Lucca, E.J. (1984). Chromosomal evolution of South American Columbiformes (Aves). *Genetica* 62 : 177-185.

Del Mazo, J. Y Gil Alberti, L. (1986). Multistranded organization of the lateral elements of the synaptonemal complex in the rat and mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 41 : 219-224.

Dietrich, A.J.J., van Marle, J., Heyting, C. and Vink, A.C.G. (1992). Ultrastructural evidence for a triple structure of the lateral element of the synaptonemal complex. *J. Struct. Biol.* 109 : 196-200.

Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karasaikakis, A., Spyropoulos, B. y Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins : occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* 107 : 2749-2760.

- Dominguez-Steglich, M. y Schmid, M. (1993).** Sex-linkage of the chicken ornithine transcarbamilase gene. (1993). *Hereditas* 118 : 1-5.
- Dvorák, J., Halverson, J.L., y Gulick, P. (1992).** cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in gallinaceous birds. *J. Hered.* 83 : 22-25.
- Ellis, N. y Goodfellow, P.N. (1989).** The mammalian pseudoautosomal region. *T. Genet.* 5 : 406-410.
- Ellis, N., Yen, p., Neiswanger, K. Shapiro, L.J. y Goodfellow, P.N. (1990).** Evolution of the pseudoautosomal boundarie in Old World monkeys and great apes. *Cell* 63 : 977-
- Endler, J.A. (1980).** Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34 : 76-91.
- Evans, E.P., Breckon, G. y Ford, C.E. (1964).** An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3 : 289-294.
- Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. y Cattnach, B.M. (1982).** Meiotic crossing-over between the X and Y chromosomes of the male mice carrying the sex reversing (*sxr*) factor. *Nature* 300 : 443-445.
- Feduccia, A. (1995).** Explosive evolution in tertiary birds and mammals. *Science* 267 : 637-638.
- Felsenstein, J. (1974).** The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78 : 737-756.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A., Takahashi, C.S. (1993).** B-chromosome polymorphism in fishes of the genus *Rhamda* (Siluroidei, Pimelodidae). *First B-chromosome conference*, Madrid, España.
- Fisher, R.A. (1935).** The sheltering of lethals. *Am. Nat.* 69 : 446-455.
- Foresti, F., Oliveira, C., Almeida-Toledo, F.F. y Maistro, E.L. (1993).** A survey on B-chromosome occurrence in neotropical fishes. *First B-chromosome conference*, Madrid, España.
- Frederic, J. (1961).** Contribution a l'etude du karyotype chez le poulet. *Arch. Biol.* 72 : 185-209.
- Gillies, C.B. (1972).** Reconstruction of the *Neurospora crassa* pachytene karyotype from serial sections of synaptonemal complexes. *Chromosoma* 36 : 119-130.
- Gillies, C.B. (1979).** The relationships between synaptonemal complexes, recombination nodules and crossing over in *Neurospora crassa* bivalents and translocation quadrivalents. *Genetics* 91 : 1-17.
- Gillies, C.B. (1983).** Ultrastructural studies of the association of homologous and non-homologous parts of chromosomes in mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Maydica* 28 : 265-287.
- Glamann, J. (1986).** Crossing over in the male mouse as analysed by recombination nodules and bars. *Carlsberg Res. Commun.* 51 : 143-162.
- Gorlov, I.P., Zhelezova, A.I. y Gorlova, O. (1994).** Sex differences in chiasma distribution along two marked mouse chromosomes : differences in chiasma distribution as a reason for sex differences in recombination frequency. *Genet. Res. Camb.* 64 :161-166.
- Green, D.M., Kezer, J. y Nussbaum, R.A. (1987).** Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstteri*. **Chromosoma**

95 : 339-344.

Green, D.M. (1990). Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33 : 818-824.

Griffiths, R., Daan, S. y Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc. R. Soc. Lond.* 263 : 1251-1256.

Guyer, M.F. (1916). Studies on the chromosomes of the common fowl as seen in testes and in embryos. *Biol. Bull.* 31 : 221-268.

Haig, J. (1978). The accumulation of deleterious genes in a population — Muller's ratchet. *Theor. Pop. Biol.* 14 : 251-267.

Haldane, J.B.S. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12 : 101-109.

Halverson J.L. y Dvorák J. (1993). Genetic control of sex determination in birds and the potential for its manipulation. *Poultry Sci.* 72 : 890-896.

Hance, R.T. (1926). Sex and the chromosomes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Morph.* 43 : 119-145.

Hedin, M.C., Sudman, P.D. Greenbaum, I.F. y Sites, J.W. (1990). Synaptonemal complex analysis of sex chromosomes pairing in the common ground skink, *Scincella lateralis* (Sauria, Scincidae). *Copeia* 1990 : 1114-1122.

Henderson, S.A. (1963). Chiasma distribution at diplotene in a locust. *Heredity* 18 : 173-190.

Heng, H.Q., Tsui, L.C., Moens, P.B. (1994). Organization of heterologous DNA inserts on the mouse meiotic chromosome core. *Chromosoma* 103 : 401-407.

Heng, H.Q., Chamberlain, J.W., Xiao-Mei Shi, Spyropoulos, B., Moens, P. (1996). Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal position. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 93 : 2795-2800.

Hewitt, G.M. (1976). Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera, Acrididae). *Chromosoma* 56 : 381-391.

Hewitt, G.M. (1979). Animal cytogenetics. 3. Insecta. 1. Orthoptera. Grasshoppers and crickets. *Gebrüder Borntraeger, Berlin*.

Hogan, K.M., Jarrel, G.H. Ryder, E.J., y Greenbaum, F.J. (1992). Heterosynapsis and axial equalization of the sex chromosomes of the northern bobwhite quail. *Cytogenet. Cell Genet.* 60 : 131-134.

Holm, P.B. y Rasmussen, S.W. (1980). Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in diploid *Bombix* males. *Carlsberg Res. Commun.* 45 : 484-548.

Hori, T., Suzuki, Y., Solovei, I., Saitoh, Y., Hutchison, N., Ikeda, J., Macgregor, H., Mizuno, S. (1996). Characterization of DNA sequences constituting the terminal heterochromatin of the chicken Z

chromosome. *Chrom. Res.* 4 : 411-426.

Howell, W.M. y Black, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizing regions with a protective colloidal developer : a 1-step method. *Experientia* 36 : 1014-1015.

Hughes, G.C. (1963). The population of germ cells in the developing female chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11 : 513-536.

Hutchison, N. (1987). Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. *J. Cell Biol.* 105 : 1493-1500.

Jafaar, H., Gabriel-Robez, O. y Rumpler, Y. (1993). Chromosomal anomalies and disturbance of transcriptional activity at the pachytene stage of meiosis : relationship to male sterility. *Cytogenet. Cell Genet.* 64 : 273-280.

Johanisson, R. y Winking, H. (1994). Synaptonemal complexes of chains and rings in mice heterozygous for multiple Robertsonian translocations. *Chrom. Res.* 2 : 137-145.

John, B. y Lewis, K.R. (1965). *The meiotic system*. Protoplasmatologia VI/F1. Berlin-Heidelberg-New York : Springer

Jones, G.H. (1987). Chiasmata. In : Moens, P.B., ed. *Meiosis*. London : Academic Press, pp. 213-244.

Jones, G.H. y Croft, J.A. (1989). Chromosome pairing and chiasma formation in spermatocytes and oocytes of *Dendrocoelum lacteum* (Turbellaria, Tricladida) ; a cytogenetical and ultrastructural study. *Heredity* 63 : 97-106.

Jones, G.H. y d'Azkue, D. (1993). Synaptonemal complex karyotyping : an appraisal based on a study of *Crepis capillaris*. *Chromosome Res.* 1 : 197-203.

Jones, R.N. y Rees, H. (1982). *B-chromosomes*. London : Academic Press.

Jones, R.N. y Puertas, M.J. (1995). Los cromosomas B. En : *Seminarios de citogenética* (eds. J. Gosálves y C. García de la Vega). Servicio de publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid 91-123.

Kaelbling, M. y Fechheimer, N.S. (1983). Synaptonemal complexes and the chromosome complement of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 35 : 87-

Kallman, K.D. (1970). Sex determination and restriction of sex-linked pigment patterns to the X and Y chromosomes in populations of a poeciliid fish, *Xiphophorus maculatus*, from the Belize and Sibun rivers of British Honduras. *Zoologica* 55 : 151-190.

Kayano, H. (1971). Accumulation of B-chromosomes in the germ line of *Locusta migratoria*. *Heredity* 27 : 119-127.

Keitges, E., Rivest, M., Siniscalco, M. y Gartler, S.M. (1985). X-linkage of steroid sulfatase in the

mouse is evidence for a functional Y-linked allele. *Nature* 315 : 226-227.

Kezer, J. Sessions, S.K. y Leon, P. (1989). The meiotic structure and behavior of the strongly heterochromatic XY sex chromosomes of morphological plethodontid salamanders of the genus *Oedipina*. *Chromosoma* 83 : 397-442.

Kierszenbaum, A. Y Tres, L. (1974). Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J. Cell Biol.* 60 : 39-53.

Kodama, H., Saitoh, H., Tone, M., Kuhara, S., Sasaki, Y. y Mizuno, S. (1987). Nucleotide sequences and unusual electrophoretic behavior of the W chromosome-specific repeating DNA units of the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Chromosoma* 96 :18-25.

Kohler, D.C., Schaadt, C.P. y Vekemans, M.J.J. (1989). Chromosome banding studies of the osprey, *Pandion halietus* (Aves, Falconiformes). *Genome* 32 : 1037-1040.

Kunkel, L.M. y Smith, K.D. (1982). Evolution of human Y-chromosome DNA. *Chromosoma* 86 : 209-228.

Lacadena, J.R. (1996). *Citogenética*. Editorial complutense, Madrid.

Laurie, D.A. y Hultén, M. (1985). Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann. Human. Genet.* 49 : 203-214.

Lawrie, N.M., Tease, C. y Hultén, M.A. (1995). Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosomes. *Chromosoma* 140 : 308-314.

Levin, I., Crittenden, L. y Dodgson, J. (1993). Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics* 16 : 224-230.

Levin, I., Santagelo, L. Cheng, H. Crittenden, L.B. y Dodgson, B. (1994). An autosomal genetic linkage map of the chicken. *J.Hered.* 85 : 79-85.

Loyez, M. (1906). Recherches sur le développement ovarien des oeufs méroblastiques à vitellus nutritif abondant . *Arch. Anat. Micr.* 8 : 69-397.

Luykx, P. (1974). The organization of meiotic chromosomes. In : *The Cell nucleus*. Vol. II. Edited by H. Busch. Academic Press, NY. p.163.

Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190 : 372-373.

Lyon, M.F. (1992). Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 26 : 17-28.

Maguire, M.P. (1974). The need for a chiasma binder. *J. Theoret. Biol.* 48 : 485-487.

Maguire, M.P. (1990). Sister chromatid cohesiveness : vital function, obscure mechanism. *Biochem. Cell Biol.* 68 : 1231-1242.

- Maguire, M.P.** (1995). Is the synaptonemal complex a disjunction machine. *J. Hered.* 86 : 330-340.
- Maynard Smith, J.** (1978). Some consequences of sex and recombination-II : The Muller's ratchet. In : *The evolution of sex*. Cambridge University Press.
- Mayr, B. y Auer, H.** (1988). A method to induce Giemsa staining resistance of avian W chromosomes : detection of an additional W chromosome in a turkey. *Genome* 30 : 395-398.
- McCarrey, J.R. y Dilworth, D.D.** (1992). Expression of *Xist* in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. *Nature Genet.* 2 : 200-203.
- McClintock, B.** (1933). The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase meiosis in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 19 : 192-237.
- Mengden, G.A.** (1981). Linear differentiation of the C-band pattern of the W chromosome in snakes and birds. *Chromosoma* 83 : 275-287.
- Mengden, G.A. y Stock, A.D.** (1980). Chromosomal evolution in serpentes ; a comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrids and boid genera. *Chromosoma* 79 : 53-64.
- Meuwissen, R.L., Offenber, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A. Van Iersel, M. y Heyting, C.** (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11 : 5091-5100.
- Miller, R.A.** (1938). Spermatogenesis in a sex-reversed female and in normal males of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Anat. Record* 70 : 155-183.
- Minezawa, M., Harada, M., Jordan, O.C. y Borda, J.** (1985). Cytogenetics of bolivian endemic red howler monkeys (*Alouatta seniculus sara*) : accesory chromosomes and Y-autosome translocation related numerical variations. *Kyoto Univ. Overseas Res. Rep. of New World monkeys* 5 : 7-16.
- Miura, I., Ohtani, H., Kashiwagi, A., Hamada, H., Nakamura, M.** (1996). Structural differences between between XX and ZW sex lampbrush chromosomes in *Rana rugosa* females (Anura : Ranidae). *Chromosoma* 105 : 237-241.
- Moens, P.B. y Spyropoulos, B.** (1995). Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma* 104 : 175-182.
- Monesi, V.** (1965). Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma* 17 : 11-21.
- Moroi, Y. Peebles, C., Fritzler, M.J., Steigerwald, J. y Tan, E.M.** (1980). Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77 : 1627-1631.
- Moses, M.J.** (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 : 215-218.
- Moses, M.J.** (1968). The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 2 : 363-368.

- Moses, M.J. (1977a). The synaptonemal complex and meiosis. En : *Molecular human cytogenetics*. Sparkes, R., Comings, D. y Fox, F., Eds. Academic Press Inc.
- Moses, M.J. (1977b). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma* 60 : 99-125.
- Moses, M.J. (1977c). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* 60 :127-137.
- Moses, M.J. y Poorman, P.A. (1981). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. II.Synaptic Adjustment in a tandem duplication. *Chromosoma* 81 : 519-535.
- Moses, M.J., Slatton, G.H., Gambling, T.M. y Starmer, C.F.R. (1977). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).III. Quantitative evaluation. *Chromosoma* 60 : 345-375.
- Moses, M.J., Poorman, P.A., Roderick, T.H. y Davisson, M.T. (1982). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV.Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84 : 454-474.
- Moses, M.J., Dresser, M. y Poorman, P.A. (1984). Composition and role of the synaptonemal complex. In : *Controlling events in meiosis*. Vol. 38. Edited by C.W. Evans and H.G. Dickenson. The Company of Biologists, Cambridge, U.K.. pp. 245-270.
- Muller, H.J. (1918). Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics* 3 : 422-499.
- Muller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 1 : 2.
- Müntzig, A. (1963). Effects of accesory chromosomes in diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 49 : 371-426.
- Müntzig, A. (1974). Accesory chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* 8 : 243-266.
- Muro, Y., Masumoto, H., Yoda, K. Nozaki, N. Ohashi, M. y Okazaki, T. (1992). Centromere protein B assembles human centromeric α -satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J. Cell Biol.* 116 : 585-596.
- Nardi, I., Andronico, F., de Lucchini, S. y Batistoni, R. (1986). Cytogenetics of the European plethodontid salamanders of the genus *Hydromantes* (Amphibia, Urodela). *Chromosoma* 94 : 377-388.
- Nei, M. (1969). Linkage modification and the sex difference in recombination. *Genetics* 63 : 681-699.
- Nei, M. (1975).

- Nicklas, B.M. (1961). Recurrent pole to pole movements of the sex chromosomes during prometaphase I in *Melanoplus differentialis* spermatocytes. *Chromosoma* 12 : 97-115.
- Ohno, S. (1961). Sex chromosomes and microchromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma* 11 : 484-498.
- Ohno, S. (1967). *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer Verlag, Berlin.
- Ohno, S., Stenius, C., Christian, L.C., Beçak, W y Beçak, M.L. (1964). Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae. *Chromosoma* 15 : 280-288.
- Oliveira, C., Foresti, F., Rigolino, M.G. y Tabata, Y.A. (1995). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae) : the process of autosome and sex chromosome synapsis. *Chromosome Res.* 3 : 182-190.
- Olmo, E. (1986). Reptilia. En : *Animal Cytogenetics*. John, B., Bauer, H., Kayano, H. y Levan, A., Eds., Vol. 4 : Chordata 3, G. Borntraeger, Berlin-Stuttgart.
- Olmo, E., Capriglione, T. y Odierna, G. (1989). Genome size evolution in vertebrates : trends and constraints. *Comp. Biochem. Physiol.* 92 : 447-453.
- Park, E.H. y Grimm, M. (1981). Distribution of C-band heterocromatin in the ZW sex chromosomes of European and American eels (Anguillidae, Teleostomi). *Cytogenet. Cell Genet.* 31 : 167-174.
- Peterson, D.G., Stack, S., Healy, S.M., Donohue, J.L. y Anderson, L.K. (1994). The relationship between synaptonemal complex length and genome size in four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia). *Chrom. Res.* 2 : 153-162.
- Pigozzi, M.I. y Solari, A.J. (1994). Regular segregation of the XY₁Y₂ trivalent and univalency in male meiosis of *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Biocell* 18(1) : 41-47 (1994).
- Pluta, A.F., Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Goldberg, I.G., Earnshaw, W.C. (1995). The centromere : hub of chromosomal activities. *Science* 270 : 1591-1594.
- Polani, E.P. (1972). Centromere localization at meiosis and the position of chiasmata in the male and female mouse. *Chromosoma* 36 : 343-374.
- Pollock, D.L. y Fechheimer, N.S. (1978). The chromosomes of cockerels during meiosis. *Cytogenet. Cell Genet.* 21 : 267-281.
- Poorman, P.A., Moses, M.J., Russel, L.B. y Cacheiro, N.L.A. (1981a). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosome rearrangements. I. Cytogenetic observations on a tandem duplication. *Chromosoma* 81 : 507-518.
- Poorman, P.A., Moses, M.J., Davisson, M.T. y Roderick, T.H. (1981b) Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. III. Cytogenetic observations on two paracentric inversions. *Chromosoma* 83 : 419-429.

- Rahn, M.I. y Solari, A.J. (1986). Recombination nodules in the oocytes of the chicken, *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 43 : 187-193.
- Randolph, L.F. (1928). Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.* 41 : 102.
- Rappold, G.A. (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.* 92 : 315-324.
- Reader, C. y Solari, A.J. (1969). The histology and cytology of the seminiferous epithelium of the mouse with Searle's X-autosome translocation. *Acta physiol. Lat-amer.* 19 : 249-256.
- Reed, K.M., Sudman, P.D., Sites, J. W. y Greenbaum, I.F. (1990). Synaptonemal complex analysis of sex chromosomes in two species of *Sceloporus*. *Copeia* 1990 : 1122-1129.
- Rice, W. (1987). Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* 116 : 161-167.
- Rice, W. (1991). Sexually antagonistic genes : experimental evidence. *Science* 256 : 1436-1439.
- Rice, W. (1994). Degeneration of a nonrecombining chromosome. *Science* 263 : 230-232.
- Rodionov, A.V., Myakoshina, A., Chelysheva, L.A. Solovei, I. y Gaginskaya, E. (1991). Chiasmata on lampbrush chromosomes of *Gallus domesticus* : a cytogenetic study of recombination frequency and linkage group lengths. *Genetika* 28 : 53-63.
- Rothfels, K., Aspden, M., y Mollison, M. (1963). The W chromosome of the budgerigar, *Melopsittacus undulatus*. *Chromosoma* 14 : 459-467.
- Ryttman, H., Tegelström, H. y Jansson, H. (1975). G- and C-banding in four related *Larus* species (Aves). *Heredity* 91 : 143-148.
- Sachs, L. (1955). The possibilities of crossing-over between the sex-chromosomes of the house mouse. *Genetica* 27 : 309-322.
- Saitoh, H. y Mizuno, S. (1992). Distribution of *Xho*I and *Eco*RI family repetitive DNA sequences into separate domains in the chicken W chromosome. *Chromosoma* 101 : 474-477.
- Saitoh, Y., Ogawa, A., Hori, T., Kunita, R. y Mizuno S. (1993). Identification and localization of two genes on the chicken Z chromosome : implication of evolutionary conservation of the Z chromosome among avian species. *Chromosome Res.* 1 : 239-251.
- Sapre, A.B. y Deshpande, D.S. (1987). Origin of B-chromosomes in *Cotix* L. through interspecific hybridization. *J. Hered.* 78 : 191-196.
- Schmid, M., Olert, J. y Klett, C. (1979). Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71 : 29-55.
- Schmid, M., Haaf, T., Geile, B. y Sims, S. (1983). Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*

88 : 69-82.

Schmid, M., Steinlen, C., Feichtinger, W., de Almeida C.G. y Duellman, W.E. (1988). Chromosome banding in Amphibia. XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 97 : 33-42.

Schmid, M., Enderle, E., Schindler, D. y Schempp, W. (1989) Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet.* 52 : 139-146.

Schmid, W. (1962). DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. *Cytogenetics* 1 : 344-352.

Sharp, P. (1982). Sex chromosome pairing during male meiosis in marsupials. *Chromosoma* 86 : 27-47.

Sherman, J.D. y Stack, S.M. (1992). Two-dimensional spreads of the synaptonemal complexes from solanaceous plants. V. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) karyotype and idiogram. *Genome* 35 : 354-359.

Sherman, J.D., Herikoff, L.A. y Stack, S.M. (1992). Silver staining two types of recombination nodules. *Genome* 35 : 907-915.

Sherman, J.D. y Stack, S.M. (1995). Two-dimensional spreads of the synaptonemal complexes from solanaceous plants. VI. High-resolution recombination nodule map for the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genetics* 141 : 683-708.

Shoffner, R.N. (1974). The chromosomes of birds, en *The Cell Nucleus*. Busch, H. Ed. Academic Press, New York 223-261.

Sibley, C.G. y Ahlquist, J.E. (1990). *Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution*. Yale University Press.

Solari, A.J. (1970a). Spatial relationship of the X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 29 : 217-236.

Solari, A.J. (1970b). The behavior of chromosomal axes during diplotene in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 31 : 217-230.

Solari, A.J. (1971). The behavior of chromosomal axes in Searle's translocation. *Chromosoma* 34 : 99-112.

Solari, A.J. (1973). The behavior of chromosomal axes during male meiotic prophase. En : *The regulation of mammalian reproduction*. S.J. Segal, R. Crozier, P.A. Corfman y P.G. Condliffe eds. C. Thomas Pub., Springfield, p. 91-99.

Solari, A.J. (1974a). The behavior of the XY pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 38 : 273-317.

Solari, A.J. (1974b). The relationships between the chromosomes and axes in the chiasmatic XY

- Armenian hamster (*Cricetulus migratorius*). *Chromosoma* 48 : 89-106.
- Solari, A.J. (1977). Ultrastructure of the synaptic autosomes and the ZW bivalent in chicken oocytes. *Chromosoma* 64 : 155- 165.
- Solari, A.J. (1980a). Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* : 315-337.
- Solari, A.J. (1980b). Recombination bars in human synaptonemal complexes spreads with sodium dodecyl sulfate. *Actas V Congr. Latinoam. Genética* 115-123.
- Solari, A.J. (1981). Chromosomal axes during and after diplotene. *Int. Cell. Biol. Pap. Int. Congr. Cell Biol.* 2^{do} 1980. 178-186.
- Solari, A.J. (1989). Sex chromosome pairing and fertility in the heterogametic sex of mammals and birds. En : *Fertility and chromosome pairing : recent studies in plants and animals*. C.B. Gillies Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 78-107.
- Solari, A.J. (1992). Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes. *Cytogenet. Cell Genet.* 59 : 52-56.
- Solari, A.J. (1994). *Sex chromosomes and sex determination in vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Solari, A.J. y Bianchi, N.O. (1975). The synaptic behaviour of the X and Y chromosomes in the marsupial *Monodelphis dimidiata*. *Chromosoma* 52 : 11-25.
- Solari, A.J. y Counce, S. (1977). Synaptonemal complex karyotyping in *Melanoplus differentialis*. *J. Cell. Sci.* 26 : 226-250.
- Solari, A.J. y Rahn, M.I. (1985). Asymmetry and resolution of the synaptonemal complex in the XY pair of *Chinchilla laniger*. *Genetica* 67 : 63-71.
- Solari, A.J. y Agopian, S. (1987). Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterocromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. *Microscopia Electrónica y Biología Celular* 11 : 179-195.
- Solari, A.J. y Tandler, C.J. (1991). Presence of a centromeric filament during meiosis. *Genome* 34 : 6-888-894.
- Solari, A.J. y Pigozzi, M.I. (1993). Recombination nodules and axial equalization in the ZW pairs of the Peking duck and the Guinea fowl. *Cytogenet. Cell. Genet.* 64 : 268-272.
- Solari, A. J. y Pigozzi, M. I. (1994) Fine structure of the XY body in the XY₁Y₂ trivalent of the bat *Artibeus lituratus*. *Chrom. Res.* 2 (1) : 53-58.
- Solari, A.J., Dresser, M.E. (1995). High resolution cytological localization of the *XhoI* and *EcoRI* repeat sequences in the pachytene ZW bivalent of the chicken. *Chrom. Res.* 3 : 87-93.

- Solari, A.J., Fechheimer, N.S. y Bitgood, J.J. (1988). Pairing of ZW gonosomes and the localized recombination nodule in two Z-autosome translocations in *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 48 :130-136.
- Solari, A.J., Espinosa, M.B., Vitullo, A.D. y Merani, M.S. (1989). Meiotic behaviour of gonosomically variant females of *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 52 : 57-61.
- Solari, A.J., Thorne, M.H. y Sheldon, B.L. (1991). Synaptonemal complexes of triploid (ZZW) chickens : Z-Z pairing predominates over Z-W pairing. *Genome* 34 : 718-726.
- Solari, A.J., Merani, M.S. y Burgos, M.H. (1993). Dissociation of the synaptonemal complex in the XY body of *Galea musteloides* (Rodentia, Caviidae). *Biocell* 17 : 25-37.
- Solovei, I.V., Khutinayeva, M.A., Chelysheva, L.A., Rodionov, A.V. y Gaginskaya, E.R. (1990). Lampbrush sex bivalents in birds : identification and structure. *Tsitologiya* 32 : 816-823.
- Solovei, I., Gaginskaya, E., Hutchison, N. y Macgregor, H. (1993). Avian sex chromosomes in the lampbrush form : the ZW lampbrush bivalents from six species of birds. *Chrom. Res.* 1 :153-166.
- Speed, R.M. (1977). The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. *Chromosoma* 64 : 241-254.
- Speed, R.M. (1982). Meiosis in the fetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface spreading. *Chromosoma* 85 : 427-437.
- Speed, R.M. (1986). Oocyte development in XO fetuses of man and mouse : the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma* 94 : 115-124.
- Stack, S. (1984). Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J. Cell Sci.* 71 : 159-176.
- Stack, S. y Anderson, L.K. (1986). Two-dimensional spreads of the synaptonemal complexes from solanaceous plants. II. Synapsis in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Amer. J. Bot.* 73 : 264-281.
- Stack, S., Anderson, L.K. y Sherman, J.D. (1989). Chiasmata and recombination nodules in *Lilium longiflorum*. *Genome* 32 : 486-498.
- Stephenson, E.M., Robinson, E.S. y Stephenson, N.G. (1972). Karyotype variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia : Anura). *Can. J. Genet. Cytol.* 14 : 691-702.
- Stephos, K. y Arrighi, F.E. (1971). Heterochromatic nature of W chromosome in birds. *Exp. Cell Res.* 68 : 228-231.
- Stock, A.D. y Bunch, T.D. (1982). The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes. *Cytogenet. Cell Genet.* 34 : 136-148.
- Suka, N., Shinohara, Y., Saitoh, Y., Saitoh, H., Ohtomo, K., Harata, M., Shpigelman, E. y

- Mizuno, S. (1993). W-heterochromatin of chicken ; its unusual DNA components, late replication, and chromatin structure. *Genetica* 88 : 93-105.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75 : 304-306.
- Switonski, M., Gustavsson, I., Höjer, K. y Plöen, L. (1987). Synaptonemal complex analysis of the B-chromosomes i spermatocytes of the silver fox (*Vulpes vulpes* Desm.). *Cytogenet. Cell Genet.* 45 : 84-92.
- Sybenga, J. (1975). Meiotic configurations. *Monographs on teoretical and applied genetics*. Vol. I. Springer-Verlag.
- Takagi, N., Sasaki, M. (1974). A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma* 46 : 91-120.
- Takagi, N., Itoh, M. y Sasaki, M. (1972). Chromosome studies in four species of Ratitae (Aves). *Chromosoma* 36 : 281-291.
- Tandler, C.J. y Solari, A.J. (1991). An "axis-like" material in the centromeric region of metaphase-I chromosomes from mouse spermatocytes. *Genetica* (The Hague), 84 : 39-49.
- Tegelström, H. y Ryttman H. (1981). Chromosomes in birds (Aves) : evolutionary implications of macro- and microchromosome numbers and lengths. *Hereditas* 94 :225-233.
- Tiersch, T.R. y Wachtel, S.S. (1991). On the evolution of genome size in birds. *J. Hered.* 82 : 363-368.
- Toder, R., Rumpler, Y., von Holst, D., y Schempp, W. (1993). An X-Y homologous pairing segment in tree shrews (*Tupaia*). *Cytogenet. Cell Genet.* 63 : 135-140.
- Tone, M., Sakaki, Y., Hashiguchi, T. y Mizuno, S. (1984). Genus specificity and extensive methylation of the W chromosome-specific repetitive DNA sequences from the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Chromosoma* 89 : 228-237.
- Venturini, G., D'Ambrogi, R. and Capanna, E. (1986). Size and structure of the bird genome :i. DNA contentof 48 species of neognathae. *Comp. Biochem. Physiol.* 85 : 61-65.
- von Wettstein, D., Rasmussen, S.W. y Holm, P.B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *An. Rev. Genet.* 18 : 331-413.
- Wagenmann, M., Epplen, J.T., Bachmann, K., Engel, W. y Engel, J. (1981). DNA sequence organisation in relation to genome size in birds. *Experientia* 37 : 1274-1276.
- Wallace, H. y Wallace, B.M.N. (1995). Complete meiotic pairing of crested newt chromosomes. *Genome* 38 : 1105-1111.
- Wang, L.H., Collins, A., Lawrence, S., Keats, B.J. y Morton, N.E. (1994). Integration of gen maps : chromosome X. *Genomics* 22 : 590-604.

- Weber, B., Weissenbach, J., Schempp, W.** (1988). X-Y crossing-over in the chimpanzee. *Hum. Genet.* 80 : 301-303.
- Weith, A. y Traut, W.** (1980). Synaptonemal complexes with associated chromatin in a moth, *Ephestia kuehniella* Z. *Chromosoma* 78 : 275-291.
- Westergaård, M. y von Wettstein, R.** (1972). The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 6 : 71-110.
- Wettstein, R. y Sotelo, A.J.** (1967). Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. *J. Microscopie.* 6 : 557-576.
- White, M.J.D.** (1973). *Animal cytology and evolution*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Wilkes, T.M., Francki, M.G., Langridge, P. Karp, A., Jones, N. y Forster, J.W.** (1995). Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chrom. Res.* 3 : 466-472.
- Willard, H.F.** (1990). Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet.* 6 : 410-416.
- Wolf, U., Schempp, W. y Scherer, G.** (1992). Molecular biology of the human Y chromosome. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 121 : 147-213.
- Yamamoto, T.** (1963). Induction of functional sex reversal in genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics* 48 : 293-306.
- Yunis, E.J., Torres de Caballero, O.M., Ramirez, C. y Ramirez, Z.E.** (1976). Chromosomal variation in the primate *Alouatta seniculus seniculus*. *Folia primatol.* 25 : 215-224.
- Zickler, D.** (1977). Development of the synaptonemal complex and the "recombination nodules" during meiotic prophase in seven bivalents of the fungus *Sordaria macrospora*. *Chromosoma* 61 : 289-316.