UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

# Parámetros de la recombinación meiótica en aves y su relación con diferentes grados de homogeneidad cariotípica

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lucía del Priore

Directora de tesis: Dra. María Inés Pigozzi

Consejero de Estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 10 de Marzo de 2017

# Parámetros de la recombinación meiótica en aves y su relación con diferentes grados de homogeneidad cariotípica

**Resumen**

La recombinación permite la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis y contribuye a la producción de nuevas variantes alélicas que son esenciales para el mantenimiento de la diversidad. El patrón de distribución de los eventos de recombinación o *crossing over* puede ser influenciado por características del cariotipo y del genoma, como ser el tamaño de los cromosomas, la posición del centrómero y el contenido de secuencias repetitivas. La manera en que las características del cariotipo influyen en el número y la distribución del *crossing over* se ha analizado principalmente en los mamíferos, y dentro de este grupo, la mayor atención se ha centrado en los roedores y en el ser humano. En las aves, por su parte, no se han realizado análisis sistemáticos semejantes. A diferencia de los mamíferos, las aves se caracterizan por tener genomas relativamente pequeños, números cromosómicos altos en la mayoría de las especies y por tener cariotipos asimétricos, con pocos macrocromosomas identificables por pares y un gran número de microcromosomas que no se distinguen entre sí mediante técnicas citogenéticas convencionales. Por lo expuesto, se planteó como objetivo general de este trabajo de tesis determinar en qué medida las características cariotípicas de las aves influyen en el patrón de los eventos de recombinación. Para ello se analizó la distribución del *crossing over* por medio de la inmunodetección de la proteína MLH1, que marca los sitios de recombinación sobre los complejos sinaptonémicos durante el paquitene. Con este fin se seleccionaron 5 especies del Superorden Galloanserae: 4 especies del Orden Galliformes (*Gallus domesticus*, *Coturnix japonica*, *Excalfactoria chinensis*, *Numida meleagris*) y una especie del orden Anseriformes (*Anas platyrhynchos*). Todas las especies tienen las características típicas del cariotipo aviario, con variantes morfológicas en los macrocromosomas en relación al cariotipo considerado ancestral para la clase. Se analizaron un total de 860 núcleos y se contabilizaron aproximadamente 45490 focos entre las cinco especies estudiadas. En la mayoría de las especies analizadas se observó que los focos de MLH1 se distribuyen de forma multimodal a lo largo de los brazos cromosómicos, y que esta distribución sigue patrones distintivos en los macrocromosomas bibraquiados vs los acrocéntricos. En *N. meleagris* la distribución del *crossing over* se aparta del patrón general observado en las otras especies, ya que los focos de MLH1 se encuentran fuertemente localizados hacia extremos opuestos de los bivalentes. En esta especie, la tasa de recombinación (TR) global es significativamente más baja que en las demás especies

estudiadas. Estos datos demuestran que el patrón de recombinación a gran escala a lo largo de los brazos cromosómicos puede variar significativamente en ausencia de rearreglos cariotípicos drásticos. Puesto que las TRs muestran diferencias amplias dentro de un mismo orden, y que estas diferencias son iguales o aún mayores que las existentes entre especies de órdenes diferentes, proponemos que las TRs no tendrían una señal filogenética marcada en la clase Aves.

**Palabras clave**: aves, Galloanserae, cariotipo, cromosomas, meiosis, complejo sinaptonémico, recombinación meiótica, inmunolocalización, mapa genético, MLH1, tasas de recombinación.

# Parameters of meiotic recombination in birds and their relationship with different degrees of karyotypic homogeneity

**Abstract**

Recombination allows faithful chromosomal segregation during meiosis and contributes to the production of new heritable allelic variants that are essential for the maintenance of genetic diversity. It is known that the pattern of crossover (CO) distribution is affected by karyotypic features such as chromosome size, centromere position and the repetitive DNA content. The way that karyotype features affects the number and distribution of the CO events has been analyzed mainly in mammals, especially in rodents and humans. To the contrary, in birds, such systematic analyses have not been done. Unlike mammals, birds are characterized by small genome sizes, high and relatively constant chromosomal numbers between species, with the presence of asymmetric karyotypes consisting of few macrochromosomes and large numbers of microchromosomes that cannot be identified in conventional cytogenetic preparations. For all the above, the main objective of this thesis was to determine how the karyotypic characteristics affect the distribution and frequency of crossing over in birds. To this end, the pattern of CO was analyzed using immunolocalization of the MLH1 protein, which marks the CO sites along synaptonemal complexes during pachytene. To perform the analysis, 5 species belonging to the Galloanserae Superorder were selected: 4 species from the order Galliformes (*Gallus domesticus*, *Coturnix japonica*, *Excalfactoria chinensis*, *and Numida meleagris*) and 1 species from the order Anseriformes (*Anas platyrhynchos*). These species have typical avian karyotypes with morphological variations of macrochromosomes respect to the ancestral avian karyotype. A total of 860 nuclei were analyzed and approximately 45490 foci were counted among the five species tested. It was observed that, in most cases, MLH1 foci show a multimodal profile along chromosome arms with distinctive patterns in biarmed vs. acrocentric macrochromosomes. A departure from this general feature was found in the helmeted guineafowl (*N. meleagris*), where MLH1 foci are strongly localized towards opposite ends of the bivalents. Furthermore, the global CO rate in this species is notably lower compared to the other analyzed species. Altogether these data suggest that broad-scale recombination patterns can be significantly modified in the absence of drastic karyotypic rearrangements. These results also show that differences in recombination levels are larger within a taxon (Galliformes) than between groups, suggesting that CO rates might not show a strong phylogenetic signal in birds.

**Key-words**: birds, chromosomes, chromosome morphology, crossover rate, Galloanserae, genetic map, immunolocalization, karyotype, karyotypic homogeneity, meiosis, meiotic recombination, MLH1, synaptonemal complex, recombination pattern.

**Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires por brindarme el marco académico para el desarrollo de la carrera de doctorado.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por brindarme el lugar de trabajo para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas de inicio y de finalización otorgadas, las cuales constituyeron un soporte económico para que pueda llevar a cabo el doctorado. También por los subsidios otorgados a mi directora, los cuales financiaron el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. María Inés Pigozzi por su papel como directora durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura y de doctorado. Gracias por la enseñanza y consejos diarios, tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Renzo Adilardi, por este último año como compañeros de laboratorio.

A todos los integrantes del INBIOMED, particularmente a compañeros y autoridades del piso 10. Gracias por la ayuda y el interés mostrado en mi trabajo que para todos ellos constituía un tema diferente a lo que están acostumbrados. Gracias también, por las charlas durante los almuerzos que hicieron más ameno este trabajo.

También gracias a la Dra. Roberta Sciurano, Lic. Mónica Rhan, al Dr. Luis Rossi y al Dr. Juan Pablo Luaces, por la buena predisposición a prestar ayuda cuando fue necesario.

A mi familia, Mamá, Papá (que siempre está presente), al Abuelo Luis, a mis hermanas Ani y Manu, y a Kevin por el apoyo y el amor constante. Por aguantarse mis comentarios científicos durante las charlas de todos los días. Sin ustedes no hubiese podido. Los quiero.

A mis tías Miriam y Teresita, y a toda mi familia. Gracias por su interés y preocupación.

A los amigos que coseché durante esta carrera, Lily, Gaby, Nadine, Celes, Eli, Mari, Ivi y Pablo L. Gracias por acompañarme durante todos estos años tanto profesionalmente como personalmente. Gracias por la ayuda y el consejo.

A mis amigos de la vida, a Jaz, Vale, Orne, Gi, Gus y Pablo M. Aunque nunca terminaron de entender esta profesión fuera de lo común, siempre estuvieron conmigo.

# Índice

**Resumen** ..... **2**

**Abstract** ..... **4**

**Agradecimientos** ..... **6**

**Abreviaturas** ..... **9**

**I. Introducción** ..... **11**

I.1. Características del genoma y el cariotipo de las Aves y del clado Galloanserae ..... 12
I.2. Los cromosomas en la meiosis y el mecanismo del *crossing over* ..... 14
I.2.a. El complejo sinaptonémico en la profase meiótica ..... 18
I.2.b. La profase I analizada mediante los ejes meióticos y sus proteínas asociadas ..... 19
I.3. Diferentes enfoques para analizar el *crossing over* ..... 21
I.3.a. Mapas de ligamiento ..... 21
I.3.b. Marcadores citológicos del *crossing over*: quiasmas, nódulos de recombinación y focos de MLH1 ..... 23
I.4. Inmunolocalización de MLH1: una metodología para abordar diferentes problemáticas ..... 27
I.4.a. Frecuencia de recombinación y morfología cromosómica ..... 27
I.4.b. Relación entre rearreglos cromosómicos y el *crossing ove* ..... 30
I.4.c. Confección de mapas de la recombinación utilizando la localización de MLH1 ..... 31
I.5. Objetivos ..... 33

**II. Materiales y Métodos** ..... **34**

II.1. El material de estudio ..... 35
II.2. Aspectos éticos de los procedimientos experimentales ..... 36
II.3. Cariotipo mitótico ..... 37
II.3.a. Cultivos cortos de médula ósea ..... 37
II.3.b. Obtención de cromosomas mitóticos a partir de embriones ..... 38
II.3.c. Captura de imágenes de cromosomas mitóticos ..... 39
II.4. Cariotipo meiótico ..... 39
II.4.a. Microextendidos de CS de ovocitos ..... 39
II.4.b. Microextendidos de CS de espermatocitos ..... 40
II.4.c. Inmunodetección de los ejes meióticos y de proteínas centroméricas ..... 41
II.4.d. Captura y procesamiento de las imágenes ..... 42
II.5. Recuento de los estadios de la profase I en la codorniz común y el pato ..... 42
II.6. Comparación del cariotipo mitótico y meiótico ..... 43
II.6.a. Medición de la longitud e índice centromérico (IC) de los cromosomas mitóticos y meióticos ..... 43
II.7. Análisis de la recombinación ..... 45
II.7.a. Inmunodetección de SMC3, centrómeros y de MLH1 ..... 45
II.7.b. Recuento de focos de MLH1 ..... 46
II.7.c. Recuento de quiasmas en espermatocitos en diacinesis/metafase I ..... 47
II.7.c.i. Técnica de Evans ..... 47
II.7.c.ii. Tinción y captura de imágenes ..... 48

II.7.c.iii. Comparación entre el número de quiasmas y el número de focos de MLH1 ..... 49
II.7.d. Estimación del tamaño del genoma y la tasa de recombinación ..... 49
II.7.e. Construcción de los mapas de recombinación: mapas de MLH1-cM ..... 50

**III. Resultados ..... 51**

III.1. *Gallus domesticus* ..... 52
III.1.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *G. domesticus* ..... 52
III.1.b. Análisis de la recombinación en *G. domesticus* ..... 56
III.2. *Coturnix japonica* ..... 61
III.2.a. Determinación de la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene ..... 61
III.2.b. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *C. japonica* ..... 62
III.2.c. Análisis de la recombinación de *C. japonica* ..... 64
III.2.c.i. Estabilidad de los focos de MLH1 durante el paquitene ..... 64
III.2.c.ii. Recuento de focos de MLH1 en machos y hembras de *C. japonica* ..... 65
III.3. *Excalfactoria chinensis* ..... 72
III.3.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *E. chinensis* ..... 72
III.3.b. Análisis de la recombinación de *E. chinensis* ..... 74
III.3.b.i. Estabilidad de los focos de MLH1 durante el paquitene ..... 74
III.3.b.ii. Recuento de focos de MLH1 en *E. chinensis* ..... 75
III.4. *Numida meleagris* ..... 79
III.4.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *N. meleagris* ..... 79
III.4.b. Análisis de la recombinación de *N. meleagris* ..... 82
III.5. *Anas platyrhynchos* ..... 87
III.5.a. Determinación de la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene ..... 87
III.5.b. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *A. platyrhynchos* ..... 88
III.5.c. Análisis de la recombinación de *A. platyrhynchos* ..... 90

**IV. Discusión ..... 95**

IV.1. Correspondencia entre cromosomas mitóticos, CSs y contenido de ADN ..... 96
IV.2. Relación entre la longitud del CS y el número de eventos de *crossing over* ..... 98
IV.3. Comparación del análisis de la recombinación mediante el recuento de focos de MLH1 y otros métodos ..... 99
IV.4. Variación en la frecuencia y el patrón de recombinación ..... 105
IV.4.a. Efecto del sexo en la recombinación ..... 105
IV.5. Relación entre morfología cromosómica y *crossing over* ..... 107
IV.6. Presencia de dos patrones de recombinación ..... 112
IV.7. Relación entre filogenia y *crossing over* ..... 114

**V. Conclusiones ..... 119**

**VI. Bibliografía ..... 122**

**Abreviaturas**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutado

ATR: Ataxia Telangiectasia y proteína relacionada con Rad3 o proteína relacionada con FRAP 1

cM: centimorgan

CO: *Crossover*

CS: Complejo Sinaptonémico

DMC1: *DNA meiotic recombinase 1*

DSB: *Double Strand Break*

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*

IC: Índice Centromérico

Mb: Megabases

MLH1: MutL *Homolog* 1

MLH3: MutL *Homolog* 3

NCO: *No Crossover*

NF: Número Fundamental

NGS: *Next Generation Sequencing*

NR: Nódulo de Recombinación

p: brazo corto

PRDM9: *Positive-Regulatory Domain zinc finger protein* 9

q: brazo largo

RAD51: proteína homóloga a la recombinasa bacteriana RecA

REC8: proteína de la recombinación meiótica componente del eje de cohesinas

RPA: *Replication Protein A*

SEI: *Single End Invasion*

SMC: *Structural Maintenance of Chromosomes*

SMC1A y B: *Structural Maintenance of Chromosomes 1A and B*

SMC3: *Structural Maintenance of Chromosomes 3*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfismos de nucleótido simple

STAG3: *Cohesin subunit SA-3*

SYCE1 y 2: *SYnaptonemal complex Central Element protein 1 and 2*

SYCP1, 2 y 3: *SYnaptonemal Complex Protein 1*

TEX12: *Testis Expressed 12*

TR: Tasa de Recombinación

ZMM: acrónimo para las proteínas de la levadura Zip1/Zip2/Zip3/Zip4, Msh4/Msh5, Mer3

# I. Introducción

## I.1. Características del genoma y el cariotipo de las Aves y del clado Galloanserae

Las aves aparecen por primera vez en el registro fósil hace aproximadamente 150 millones de años y desde entonces han tenido lugar tres radiaciones principales que dieron origen a las aves vivientes actuales que comprenden unas 10000 especies (Ostrom 1976; Xu *et al.* 2011; Gill y Donsker 2016). La primera radiación se produjo hace 120-130 millones de años, dando origen a dos clados: Paleognathae y Neognathae. El primer grupo está representado por las aves más primitivas -ratites y tinamiformes-, mientras que el resto de las especies existentes se encuentran entre las Neognatas. Una segunda radiación dio origen al clado Galloanserae y al resto de las especies hace unos 80-90 millones de años (Griffin *et al.* 2007). Los análisis filogenéticos y moleculares apoyan el origen monofilético de las Paleognathae, y también el origen monofilético de las Galloanserae como grupo hermano del resto de las aves contemporáneas que se incluyen en las denominadas Neoaves (Hackett *et al.* 2008; Jetz *et al.* 2012; Prum *et al.* 2015). El superorden Galloanserae, después de las ratites, contiene representantes con características ancestrales en comparación con la Neoaves más modernas (Griffin *et al.* 2007).

Desde el punto de vista de la información genética las aves tienen características exclusivas tales como un contenido de ADN relativamente pequeño dentro de los vertebrados, distribuido en numerosos cromosomas. Las mediciones del contenido genómico en casi 900 especies de aves muestra que, en la mayoría de las especies, el contenido genómico haploide (valor C) es de 1.0-1.3 Gb, señalando la existencia de una variación interespecífica limitada. A modo de comparación, el tamaño genómico de los mamíferos presenta variaciones del 100% o más entre especies, oscilando entre 2.2 y 4.9 Gb. Se ha sugerido que el pequeño tamaño del genoma de las aves evolucionó en respuesta a los requerimientos de conservación de la energía asociados al vuelo (Hughes y Piontkivska 2005). Es posible que uno de los factores más importantes del tamaño genómico reducido sea el número relativamente bajo de copias de ADN repetitivo en comparación con otros vertebrados. Se estima que los genomas de los mamíferos y reptiles están formados por 30-50% de ADN repetitivo, mientras que los genomas de las aves presentan aproximadamente un 10% (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004; Warren *et al.* 2010).

El cariotipo de la mayoría de las aves se caracteriza por la presencia de números cromosómicos altos, con 6-10 macrocromosomas que son distinguibles por pares e incluyen a los cromosomas sexuales Z y W claramente heteromórficos, y numerosos microcromosomas que no son distinguibles por técnicas citológicas convencionales. A diferencia de los mamíferos, las hembras son el sexo heterogamético y no se han encontrado excepciones a

esta regla en ninguna especie. El tamaño del cromosoma Z se encuentra ampliamente conservado en la mayoría de las aves y en el pollo (*Gallus domesticus*) representa el 6-7% del genoma (Shoffner 1974; Capanna *et al.* 1987). Las aves tienen una menor variación del número cromosómico que otros grupos de vertebrados. Un cariotipo aviario típico consta de un número diploide de 76 a 80 cromosomas, con macrocromosomas de tamaño grande e intermedio (de 10-3 µm de longitud) y muchos microcromosomas de menos de 3 µm. La consistencia en el número cromosómico es indicio de estabilidad cariotípica, una idea que está respaldada por estudios citogenéticos y de mapeo comparativo. Mediante ZOO-FISH, que utiliza sondas generadas a partir de cromosomas enteros que son aplicadas de manera cruzada entre especies, se ha demostrado un elevado grado de conservación de la sintenia, incluso entre linajes evolutivamente lejanos separados por más de 80 millones de años (Shetty *et al.* 1999; Nanda *et al.* 2008). En contraste con la baja tasa de rearreglos intercromosómicos, los rearreglos intracromosómicos ocurren frecuentemente, particularmente en la forma de inversiones (Aslam *et al.* 2010; Volker *et al.* 2010).

Específicamente dentro del orden Galliformes, el cariotipo ancestral parece estar conservado en todos los linajes con escasos rearreglos intercromosómicos (Stock y Bunch 1982; Shibusawa *et al.* 2001; Shibusawa *et al.* 2002; Shibusawa *et al.* 2004a; Shibusawa *et al.* 2004b; Griffin *et al.* 2007), siendo el cariotipo del pollo representativo del cariotipo ancestral de este orden. Por medio de técnicas de citogenética molecular, diferentes rearreglos fueron observados principalmente en los macrocromosomas 1, 2 y 4 (Figura 1). El cromosoma 4 de los Galliformes actuales es el resultado de una fusión céntrica entre el cromosoma 4 acrocéntrico ancestral y un microcromosoma. En el linaje de las codornices ha sido identificada en el cromosoma 2 una inversión paracéntrica en el brazo corto de la codorniz china (*Excalfactoria chinensis*) y una inversión pericéntrica en la codorniz común (*Coturnix japonica*) (Shibusawa *et al.* 2001; Shibusawa *et al.* 2004b). En la codorniz común, además, fue descripta una inversión pericéntrica en el cromosoma 1 (Shibusawa *et al.* 2001). En la gallina de Guinea (*Numida meleagris*) se observó una fusión entre los cromosomas ancestrales 6 y 7 que resultó en el cromosoma 5 metacéntrico de la especie (Shibusawa *et al.* 2002). Este rearreglo lleva a la reducción de su número diploide y a un mayor número de brazos cromosómicos o número fundamental (NF). El cariotipo del pato (*Anas platyrhynchos*), una especie representativa del orden Anseriformes, presenta una morfología ancestral con rearreglos intracromosómicos en los macrocromosomas más pequeños detectados por medio del mapeo con sondas del pollo (Schmid *et al.* 2000; Schmid *et al.* 2005).

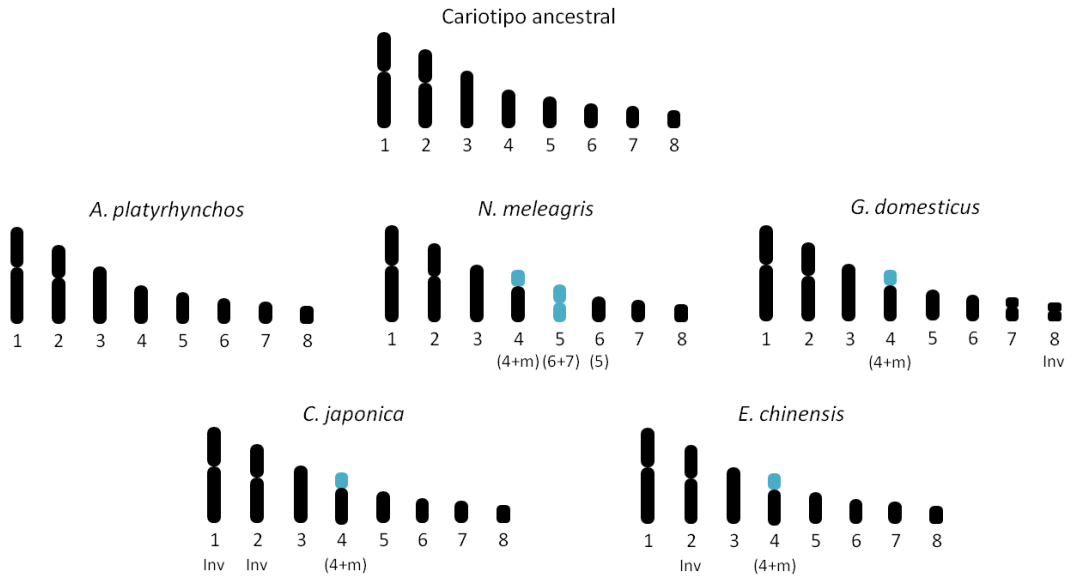


**Figura 1**: Idiograma de los macrocromosomas del cariotipo ancestral de Galloanserae y los cromosomas ortólogos en las cinco especies analizadas. Se indican los macrocromosomas con rearreglos inter- e intracromosómicos. Los números de los cromosomas del cariotipo ancestral se muestran entre paréntesis. Inv: inversión, m: microcromosoma. .

## I.2. Los cromosomas en la meiosis y el mecanismo del *crossing over*

La meiosis es un proceso fundamental por el cual el número de cromosomas de las células germinales diploides es reducido a la mitad. La producción de gametas haploides a partir de células germinales diploides requiere de una ronda de replicación del ADN acoplada a dos divisiones nucleares sucesivas. En la mayoría de los organismos, durante la primera división meiótica, se produce la sinapsis de los cromosomas homólogos y la recombinación recíproca o *crossing over*. El término recombinación se usa en el texto como sinónimo del *crossing over* o recombinación recíproca. La recombinación genera diversidad genética y también establece la conexión física entre los cromosomas homólogos necesaria para una correcta segregación durante la segunda división. La falta de recombinación afecta la segregación de los cromosomas homólogos con graves consecuencias en la formación de las gametas. Por lo tanto, las fallas en la regulación del *crossing over* pueden conducir a la letalidad cigótica o a aneuploidías (revisado en Hassold *et al.* 2007).

La profase de la primera división meiótica se divide tradicionalmente en diferentes etapas basadas en los cambios de la morfología cromosómica que fueron descriptos inicialmente mediante microscopía de luz. En la primera de estas etapas, el leptotene, los cromosomas se observan como filamentos delgados que han comenzado a condensarse pero

aún no muestran signos de apareamiento homólogo. Cuando los cromosomas se individualizan y se condensan durante la profase temprana, las cromátides hermanas comienzan a organizarse a lo largo de estructuras denominadas elementos axiales. En la mayoría de los organismos, la interacción de secuencias homólogas, depende de rupturas de cadena doble (DSBs, en inglés *double strand breaks*) inducidas durante el leptotene temprano a medio. Estos eventos son necesarios para el alineamiento de los cromosomas homólogos. A continuación, durante el estadio de cigotene, una estructura proteica especializada denominada complejo sinaptonémico (CS), comienza a ser ensamblada entre los cromosomas homólogos alineados. Cuando los cromosomas alcanzan el estado de sinapsis completa, la etapa se denomina paquitene, y está definida por la asociación continua y estrecha de los homólogos unidos por el CS. El CS consiste en dos elementos axiales alineados y unidos por los filamentos transversales que corren entre ellos (ver más adelante). En el contexto del CS los elementos axiales se denominan elementos laterales (Figura 2). Posteriormente, durante el estadio de diplotene, los cromosomas meióticos experimentan una fase de descondensación, durante la cual el CS se desarma y los cromosomas homólogos se separan excepto en los sitios de los quiasmas. Los quiasmas, que son la manifestación física de los eventos de recombinación recíproca, mantienen unidos a los cromosomas homólogos durante la diacinesis a medida que los cromosomas se condensan previamente al comienzo de la metafase I (Page y Hawley 2004).

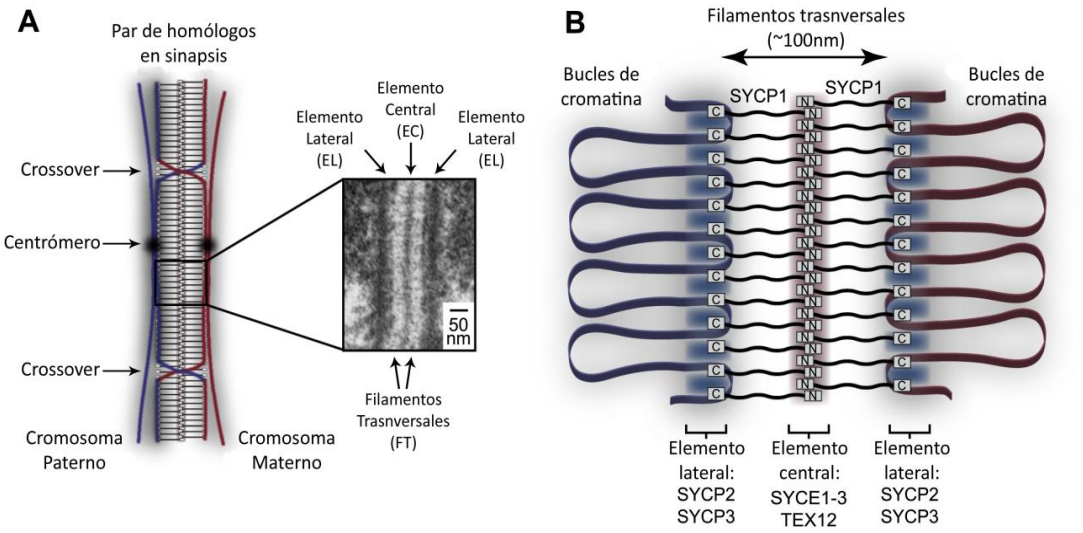


**Figura 2:** Esquema de la estructura tripartita del complejo sinaptonémico (CS). A) El CS es la estructura que mantiene unidos a los cromosomas homólogos durante la profase I, permitiendo la recombinación y la formación de los *crossovers* (COs). El CS presenta una estructura tripartita en la cual los filamentos transversales (FT) funcionan como un puente entre el elemento central (EC) y los elementos laterales (EL). El recuadro reproduce una imagen de microscopía electrónica del CS de Kouznetsova *et al.* (2011) bajo licencia de atribución de *Creative Commons*. B) Modelo de ensamblaje del CS. SYCP1 forma los FT, con sus extremos N- y C-terminales localizados en los elementos centrales y laterales respectivamente. El EC contiene a las proteínas SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12, mientras que el EL contiene a las proteínas SYCP2 y SYCP3 (tomado de Syrjanen *et al.* 2014).

La recombinación meiótica se inicia por la inducción en leptotene de DSBs programadas en el ADN. La proteína helicasa SPO11 cataliza la formación de las DSBs para generar un intermediario ADN-proteína en el que SPO11 se une covalentemente al extremo 5' del ADN (Bergerat *et al.* 1997; Keeney *et al.* 1997). SPO11 es removida por una escisión endonucleolítica y los extremos 5' del ADN son procesados para producir un extremo 3' de hebra simple sobresaliente a ambos lados de cada ruptura. Uno de estos extremos 3' busca regiones de homología y forma un intermediario denominado bucle-D o bucle de desplazamiento al invadir la cromátide del cromosoma homólogo sin rupturas en la hebra de ADN en un proceso denominado invasión del extremo de hebra simple (SEI, del inglés *single end invasión*) que depende de las recombinasas RAD51 y DMC1 (Bishop *et al.* 1992; Shinohara *et al.* 1992). Tanto RAD51 como DMC1 poseen un papel crucial en la búsqueda de homología y en la invasión del extremo 3'. En los estadios de cigotene y paquitene, el extremo 3' invasor provee un molde para la síntesis de ADN y reparación de las rupturas, formando moléculas de unión entre cromátides homólogas o hermanas. Durante la reparación entre cromátides homólogas los intermediarios de recombinación pueden ser procesados por un complejo de proteínas denominado ZMM (ver más adelante, Sección I.2.b), formando las uniones dobles de

*Holliday* (dHJ, del inglés *double Holliday Junction*) que dan como resultado los eventos de *crossing over*. Alternativamente, las moléculas de unión pueden ser procesadas por otros complejos de proteínas para producir los eventos de *no-crossover* (NCO, que resultan en la conversión génica) (revisado en Mercier *et al.* 2015) (Figura 3). La formación de un CO "obligatorio" entre cada par de homólogos es necesaria para la apropiada segregación reduccional. Por lo tanto, los mecanismos involucrados en la regulación de la formación y reparación de las DSBs gobernarían en términos generales a la formación de los eventos de recombinación (Kumar y De Massy 2010).

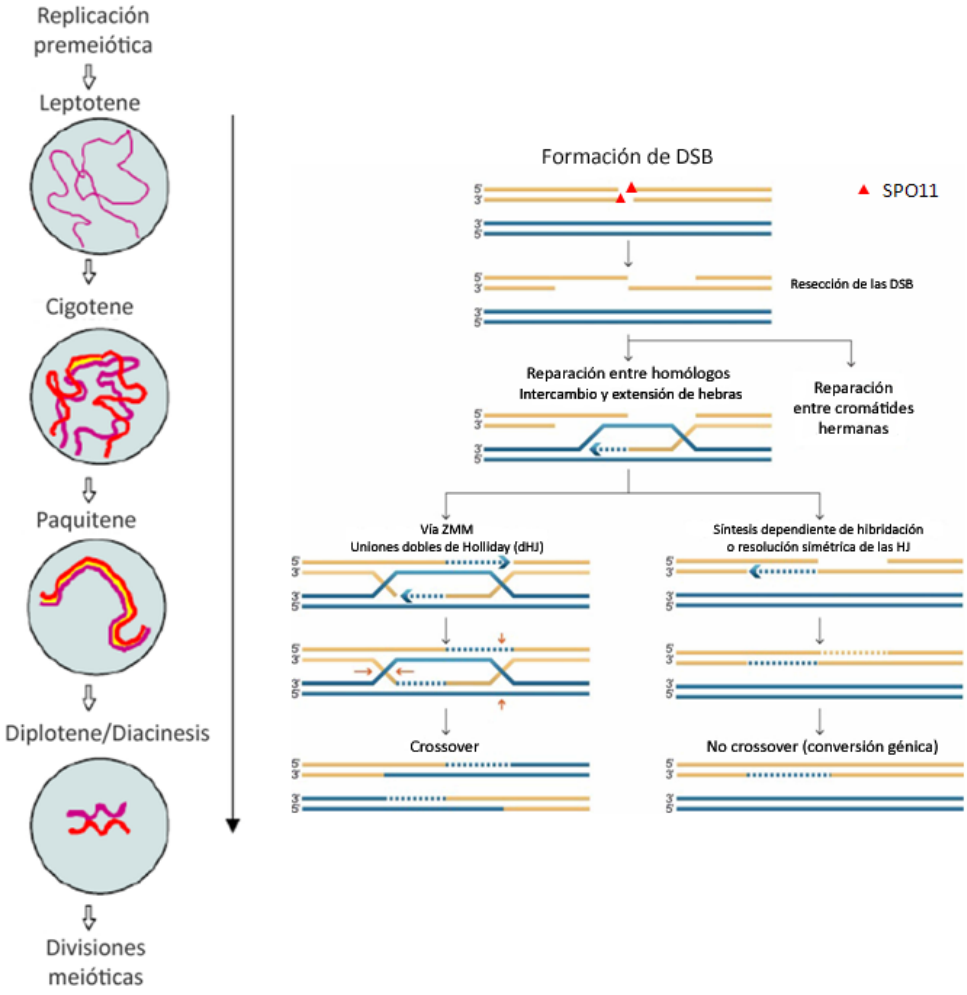


**Figura 3.** Mecanismo molecular de los eventos de *crossovers* (COs) y *no-crossovers* (NCOs). La formación de las DSBs se produce en el estadio de leptotene y requiere de la proteína SPO11 (triángulos rojos). Los extremos de las DSBs son procesados produciendo extremos sobresalientes 3' que pueden ser reparados por medio de la reparación entre cromátides hermanas o mediante la reparación entre cromosomas homólogos. La reparación entre cromosomas homólogos produce tanto los eventos de COs como los eventos NCOs que resultan en conversión génica. Los COs surgen de la resolución de las uniones dobles de *Holliday* (dHJ) (flechas naranjas) por medio de la vía del complejo proteico ZMM, mientras que los NCO son formados por el proceso que incluye la síntesis dependiente de la hibridación de hebras o de la resolución simétrica de las uniones de *Holliday* (HJ). (Adaptado de Kumar y De Massy 2010; Lake y Hawley 2016).

### I.2.a. El complejo sinaptonémico en la profase meiótica

Los eventos moleculares que determinan la sinapsis y la recombinación de los cromosomas homólogos se producen en el marco estructural provisto por los ejes meióticos simples, presentes en los estadios más tempranos de la profase I y, posteriormente, en relación al CS que se observa en el estadio de paquitene. El CS fue inicialmente descripto por Moses (1956) y Fawcett (1956) en espermatocitos de un crustáceo y del ser humano, respectivamente. Numerosos estudios del CS en una amplia variedad de organismos, desde eucariontes unicelulares hasta plantas y animales superiores, revelaron que está evolutivamente conservado y restringido a la meiosis. Los análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica revelaron que el CS es una estructura tripartita compuesta por dos elementos laterales y un elemento central. Los elementos laterales se disponen paralelos entre sí y equidistantes con el elemento central (Figura 2). Numerosos filamentos transversales se localizan entre los elementos laterales y el elemento central de manera perpendicular (revisado en Schmekel y Daneholt 1995). El ensamblado y desensamblado del CS se correlaciona con la progresión de la profase I, como fue mencionado previamente. En diversos estudios se aislaron e identificaron tres proteínas principales del CS de mamíferos: SYCP1, SYCP2 y SYCP3, generando anticuerpos monoclonales contra las mismas (Heyting *et al.* 1985; Heyting *et al.* 1989; Meuwissen *et al.* 1992; Dobson *et al.* 1994; Lammers *et al.* 1994; Offenberg *et al.* 1998). Mediante inmunocitoquímica se determinó que SYCP1 es un componente de los filamentos transversales, mientras que SYCP2 y SYCP3 forman parte de los elementos axiales/elementos laterales. Posteriormente fueron identificadas cuatro proteínas del elemento central, SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12 (Costa *et al.* 2005; Hamer *et al.* 2006; Schramm *et al.* 2011). Cuando se observan al microscopio óptico común o mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta, los ejes proteicos de los cromosomas en profase I se denominan de manera general ejes meióticos. Esta denominación se utiliza para referirse indistintamente a los ejes simples como a los CSs ya formados.

Además de las proteínas específicas de los CSs, es generalmente aceptado que los elementos laterales están formados por complejos de cohesinas (revisado en de Boer y Heyting 2006; Revenkova y Jessberger 2006). En los mamíferos, el complejo de cohesinas mitótico consiste en heterodímeros de proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas (en inglés *Structural Maintenance of Chromosomes*, SMC) que son SMC1A y SMC3, y dos proteínas no SMC, RAD21 y SCC3. Aunque los complejos de cohesinas son más conocidos por su función en la cohesión de las cromátides hermanas en la mitosis y la meiosis, también es importante su participación en la formación de los elementos axiales durante la

meiosis (Klein *et al.* 1999; Pelttari *et al.* 2001). Más aún, existen cohesinas específicas de la meiosis como SMC1B, REC8 y STAG3. SMC1B es paráloga a SMC1A (Revenkova *et al.* 2001), REC8 está relacionada con RAD21 (Klein *et al.* 1999), y STAG3 es homóloga a SCC3 (Pezzi *et al.* 2000; Prieto *et al.* 2001). La proteína REC8 aparece en la cromatina luego de la fase S pre meiótica y forma estructuras similares a los elementos axiales entre las cromátides hermanas. Luego SMC1B, SMC3, SYCP2 y SYCP3 son ensambladas a lo largo de estas estructuras lineales que contienen a REC8 para formar los elementos axiales (Eijpe *et al.* 2003). En metafase I, estas proteínas (SMC1B, SMC3 y SYCP3) son removidas, aunque persisten en los brazos de los bivalentes en metafase I y se acumulan cerca de los centrómeros hasta la anafase II.

### I.2.b. La profase I analizada mediante los ejes meióticos y sus proteínas asociadas

El CS se estudió en sus comienzos al microscopio electrónico, ya sea en cortes de células meióticas o en microextendidos de núcleos completos que permiten ver todos los CSs al mismo tiempo. Al microscopio electrónico y con tinciones apropiadas, en algunos organismos se han observado estructuras electrodensas asociadas a los ejes meióticos alineados durante el cigotene. Estas estructuras se denominaron nódulos tempranos, por comparación con los nódulos tardíos o nódulos de recombinación (NR) que se observan durante el paquitene (Carpenter 1975b; Anderson y Stack 2005)

Los microextendidos de CS se han convertido en una herramienta muy útil en el estudio de la meiosis al combinarse con hibridación *in situ* fluorescente (en inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) o la inmunolocalización de proteínas (revisado en Zickler y Kleckner 1999). La inmunofluorescencia indirecta de proteínas de los ejes meióticos, permite una excelente visualización de los mismos comparable, en la mayoría de los casos, a la microscopía electrónica en cuanto a la información obtenida. De manera similar a la inmunodetección de proteínas propias de los elementos laterales, como SYCP3, la inmunomarcación de SMC3 permite visualizar los elementos laterales del CS y distinguir las etapas de la profase meiótica (Figura 4). En el estadio de leptotene (Figura 4A), comienzan a aparecer fragmentos pequeños y delgados de SMC3 que representan a los cromosomas no sinapsados. En cigotene (Figura 4B) la señal de SMC3 se visualiza más brillante, es decir que los ejes meióticos comienzan a observarse con un mayor grosor lo que representa el comienzo de la sinapsis. En paquitene (Figura 4C), todos los autosomas han completado la sinapsis. Finalmente, en el estadio de diplotene (Figura 4D) se observa que los cromosomas tienen un

aspecto de "cadena", lo cual indica que ha comenzado la desinapsis quedando unidos en aquellos puntos en los que se produjo la recombinación.

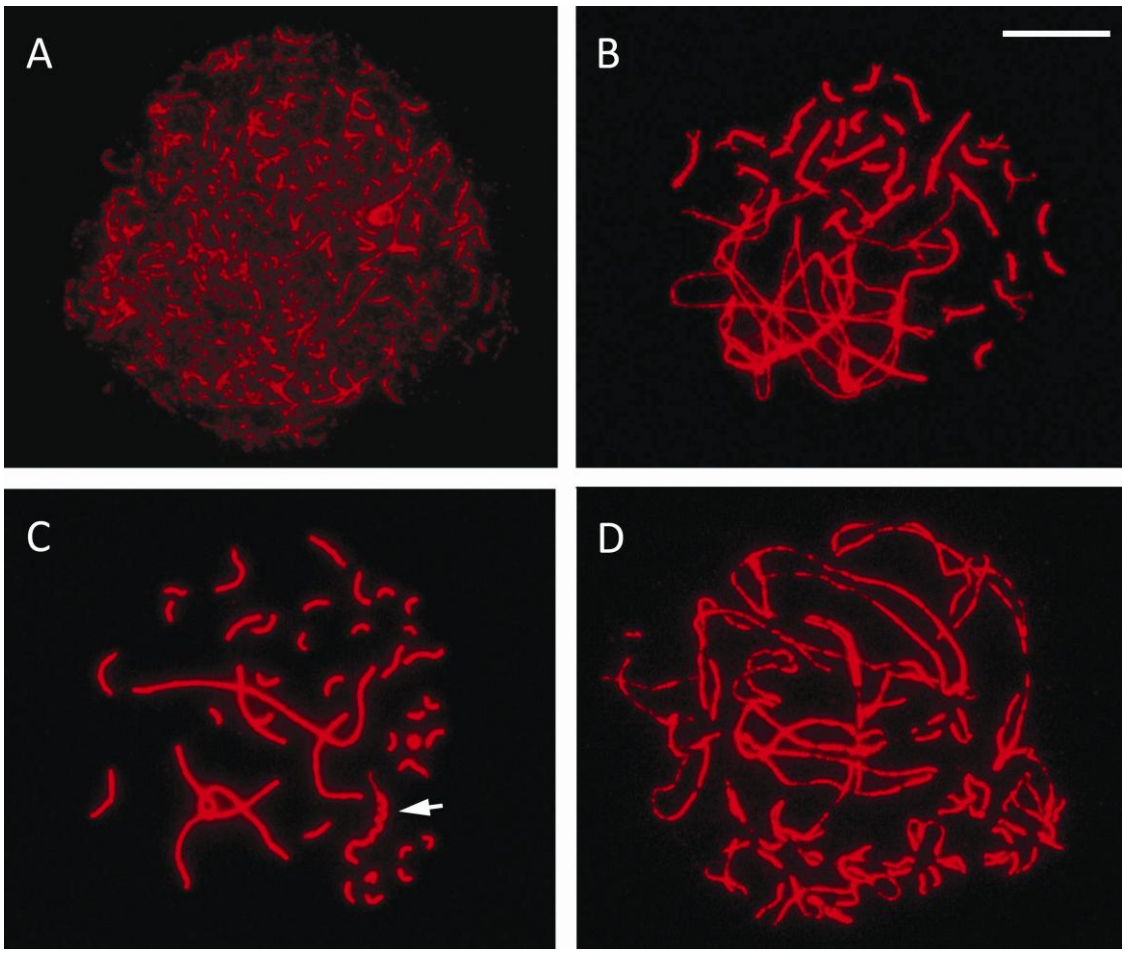


**Figura 4**: Estadios de la profase I de ovocitos de pollo visualizados por inmunodetección de SMC3. A) Leptotene. B) Cigotene. C) Paquitene. D) Diplotene. La flecha señala al par ZW. Barra= 10µm.

Además del seguimiento de la sinapsis mediante la inmunomarcación de los ejes meióticos, la inmunofluorescencia indirecta permitió identificar la distribución temporal y espacial de las proteínas involucradas en el procesamiento de las DSBs, como ser RAD51/DMC1, que se corresponden con los nódulos tempranos observados por microscopía electrónica (Bishop 1994; Terasawa *et al.* 1995; Ikeya *et al.* 1996; Moens *et al.* 1997; Tarsounas *et al.* 1999). La denominación nódulos tempranos se relaciona con el momento de su aparición durante la profase I y también hace referencia a la composición proteica de estas estructuras. También se ha determinado que la proteína RPA y las quinasas ATM y ATR colocalizan y forman parte de los nódulos tempranos (Plug et al. 1998). Un subgrupo de los NR tempranos

se transforma en NR tardíos al experimentar cambios en la composición de las proteínas que los forman a medida que los intermediarios recombinacionales son procesados. La inmunodetección de proteínas meióticas en combinación con ensayos bioquímicos en organismos con genotipos silvestres y mutantes, ha demostrado que el ensamblado del CS requiere de un grupo de proteínas denominadas colectivamente como ZMM por el nombre de sus componentes identificados inicialmente en las levaduras (revisado en Lynn *et al.* 2007). Este complejo proteico está involucrado en la creación de intermediarios tempranos de la recombinación que promueven la polimerización de componentes de los elementos axiales del CS y su apareamiento (Ross-Macdonald y Roeder 1994; Hollingsworth *et al.* 1995; Chua y Roeder 1998; Nakagawa y Ogawa 1999; Agarwal y Roeder 2000; Novak *et al.* 2001; Bardhan *et al.* 2010). Los intermediarios tempranos de la recombinación maduran vía el complejo ZMM para designar las interacciones de recombinación que resultarán en eventos de *crossing over*. En los sitios designados como COs, en el estadio de paquitene aparece la proteína MLH1, que es un componente típico de los NRs tardíos. Esta proteína presente en organismos eucariontes pertenece a la familia homóloga a MutL de *Escherichia coli* que se encarga de la reparación de heteroduplex de ADN. En combinación con otras proteínas MLH1, está implicada funcionalmente en los eventos finales de la recombinación meiótica. Los espermatocitos de ratones *mlh1-/-* muestran estadios de paquitene y diplotene normales, pero tienen reducidos niveles de quiasmas, lo cual lleva a la formación de univalentes en metafase I y a la detención de la meiosis en el estadio de paquitene (Baker *et al.* 1996; Edelmann *et al.* 1996; Woods *et al.* 1999). Estudios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que MLH1 actúa en asociación con MLH3 durante la recombinación meiótica para promover la resolución de etapas tardías del *crossing over* (Wang *et al.* 1999). En diversos vertebrados y plantas superiores, MLH1 forma "focos" sobre los CSs que se corresponden en número con los eventos de *crossing over* determinados por el recuento de quiasmas o mediante mapas de ligamiento (ver más adelante Sección I.3.b).

## I.3. Diferentes enfoques para analizar el *crossing over*

### I.3.a. Mapas de ligamiento

Un mapa genético es un conjunto de loci con herencia Mendeliana ordenados y con las distancias entre loci adyacentes conocidas o estimadas. Los loci con herencia Mendeliana estable se conocen como loci marcadores o simplemente marcadores. Por lo

tanto, un mapa genético se caracteriza por dos aspectos principales: (1) el orden de los marcadores y (2) las distancias entre marcadores. La distancia genética entre dos loci se define como el número promedio de puntos donde ocurre la recombinación entre dos loci en una gameta y su unidad de medida es el morgan (M) o el centimorgan (cM) (revisado en Hoh y Ott 2005).

Los mapas de ligamiento tienen un mayor poder de resolución de los eventos de recombinación contiguos que otros métodos y permiten relacionar directamente las distancias genéticas con la secuencia de ADN. Sin embargo, existen algunas desventajas del uso de los mapas de ligamiento para estimar la recombinación, y también su construcción presenta desafíos importantes. Por ejemplo, aunque las distancias físicas y genéticas mantienen proporcionalidad aproximada a nivel de cromosomas enteros (Ott 1999), en ciertas regiones genómicas pueden encontrarse fuertes desviaciones entre las dos medidas. Como regla general, los loci que se encuentran a corta distancia en el mismo cromosoma tienden a manifestar niveles de recombinación menores que aquéllos que se encuentran físicamente más separados. Sin embargo, esta generalización tiene muchas excepciones que surgen debido a que los COs no se distribuyen homogéneamente en todo el genoma, sino que los eventos de recombinación ocurren de manera preferencial en ciertos sitios, denominados sitios calientes de recombinación (en inglés *hotspots*) y que tienen unas pocas kb de longitud. Otras regiones, en cambio, presentan una baja probabilidad de que se produzcan eventos de recombinación y se denominan desiertos de recombinación (en inglés *coldspots*). Como consecuencia, en algunas regiones cromosómicas, loci cercanos pueden mostrar tasas de recombinación mucho mayores que los que se encuentran a mayor distancia. La proporcionalidad de las distancias físicas y genéticas también se ve afectada por la existencia de interferencia genética que implica que un CO inhibe la formación de otros en la cercanía. Otras dificultades relacionadas con la construcción de los mapas de ligamiento es que requieren análisis durante varias generaciones y muchas veces esta fuente de información es difícil de obtener. También es necesario el análisis de un gran número de marcadores polimórficos, que garanticen la cobertura de la longitud total de los cromosomas. En los últimos años el número de genomas secuenciados ha ido en aumento, lo cual significó una gran ventaja para conocer el orden de los marcadores. Sin embargo, los mapas de ligamiento generados a partir de secuenciación de genomas completos se utilizan para identificar familias que tienen más probabilidades de segregar variantes genéticas y para guiar la interpretación de los resultados de secuenciación del exoma y del genoma completo, pero no proveen mapas de la recombinación a nivel cromosómico (Bailey-Wilson y Wilson 2011). Asimismo, debido a la gran cantidad de marcadores descriptos gracias a las nuevas herramientas de secuenciación resulta imposible

analizar todos los órdenes de marcadores posibles, por lo que se deben usar algoritmos que muchas veces distorsionan las frecuencias de recombinación reales.

### I.3.b. Marcadores citológicos del *crossing over*: quiasmas, nódulos de recombinación y focos de MLH1

Alternativamente a un método indirecto como los mapas de ligamiento, el *crossing over* se puede analizar de manera directa mediante marcadores citológicos como los quiasmas, los NRs y los focos de la proteína MLH1.

Como fue señalado anteriormente, los quiasmas son la manifestación visual de los eventos de recombinación durante las etapas de diacinesis/metafase I. La observación y el análisis de los quiasmas ha sido el enfoque tradicional para estimar la frecuencia de la recombinación y para determinar la localización física de los COs, especialmente en organismos con cromosomas grandes. Puesto que los quiasmas son el resultado del *crossing over*, la distribución y frecuencia de estos marcadores en los cromosomas constituyen mapas físicos de la recombinación. Sin embargo, existen algunos inconvenientes cuando se utilizan los quiasmas para confeccionar mapas de *crossing over*. Por ejemplo, durante el estadio en el que los quiasmas son visibles a menudo es difícil relacionar cada uno de los bivalentes contraídos con un par cromosómico o grupo de ligamiento específico. Además, cuando los cromosomas son pequeños es dificultoso el recuento o la individualización de los quiasmas que se encuentran muy cercanos entre sí. El recuento de quiasmas es excepcionalmente eficaz para mapear los eventos de recombinación en aquéllos organismos que desarrollan cromosomas plumulados en los ovocitos en diplotene, como los anfibios y las aves (Callan 1982). En el estadio plumulado los bivalentes se encuentran más extendidos que los cromosomas en diacinesis/metafase I y por esta razón presentan una mayor resolución para el recuento de los quiasmas. Aunque ofrecen una resolución excepcional por su tamaño, los cromosomas plumulados permiten obtener un mapa del *crossing over* sólo en las hembras y su manipulación es extremadamente dificultosa. Adicionalmente, las torsiones son a menudo indistinguibles de los quiasmas, los bivalentes más grandes suelen romperse y, en las aves, los bivalentes más pequeños se pierden al realizar las preparaciones (Hutchison 1987; Rodionov *et al.* 1992a). Como resultado de estos inconvenientes los mapas físicos del *crossing over* basados en la frecuencia y distribución de los quiasmas no son fácilmente comparables con los mapas de ligamiento (Sherman y Stack 1995).

Los nódulos tempranos se observan sobre CSs recién formados desde el estadio de cigotene hasta el paquitene temprano y se cree que participan en el chequeo de homología que precede y acompaña a la sinapsis (Albini y Jones 1987; Carpenter 1987; Anderson y Stack 1988). Por otro lado, los NR tardíos se asocian al CS desde el paquitene medio y están involucrados con la recombinación recíproca y, la mayoría de ellos contienen la proteína reparadora de heteroduplex MLH1 (ver más adelante) (Moens *et al.* 2002). La observación al microscopio electrónico de los NRs asociados al CS durante el paquitene y la correlación de los NRs con los eventos de recombinación en *Drosophila* (Carpenter 1975a) proporcionó un método alternativo al recuento de quiasmas para la construcción de los mapas citológicos de la recombinación. Luego de esta demostración en *Drosophila*, se determinó que existe una estrecha correspondencia entre su número y el número de quiasmas en otros organismos como el ser humano (Solari 1980), algunas plantas (Sherman y Stack 1995; Anderson *et al.* 2003), en hongos y en insectos (revisado en Stack *et al.* 1989).

En las aves, particularmente en el pollo (*G. domesticus*) se observó una correspondencia entre el número de NRs en ovocitos (Rahn y Solari 1986), el número de quiasmas en cromosomas plumulados (Rodionov *et al.* 1992b) y el número de quiasmas en espermatocitos de esta misma especie (Pollock y Fechheimer 1978). En otra especie de la clase Aves, como la paloma (*Columba livia*), se analizó la frecuencia y distribución de los NRs en espermatocitos, observándose una equivalencia con la frecuencia y distribución de los quiasmas (Pigozzi y Solari 1999b). La presencia de un NR localizado en el par ZW del pollo demostró la existencia de recombinación en el par ZW de las aves (Rahn y Solari 1986), lo que posteriormente fue corroborado mediante estudios similares en otras especies de aves Neognatas pertenecientes a los órdenes de Galliformes, Anseriformes, Passeriformes y Columbiformes (Solari 1992; Solari y Pigozzi 1993; Pigozzi y Solari 1998, 1999a). La recombinación localizada en el par ZW heteromórfico de las aves Neognatas demostró la existencia de una región de homología próxima a los telómeros de ambos cromosomas sexuales, es decir, una región pseudoautosómica como la del par XY de los mamíferos (revisado en Solari 1993). La observación de un único NR en el par ZW del pollo concuerda con la presencia de un quiasma localizado en el par ZW en el estadio plumulado en la misma especie y en otras aves Neognatas (Solovei *et al.* 1993). La localización del evento de recombinación en el par sexual de las hembras contrasta con la recombinación libre del bivalente ZZ, como se demostró mediante la visualización de los NRs en el par ZZ de la paloma (Pigozzi y Solari 1999b).

A pesar de la estabilidad de los NR como marcadores del *crossing over* en paquitene, en algunas especies no son fáciles de visualizar en consecuencia, el número de NR

resulta menor que el número de quiasmas (Rasmussen y Holm 1978; Goldstein y Triantaphyllou 1981; Gillies 1983; Kehlhoffner y Dietrich 1983). Asimismo, resulta laborioso obtener números suficiente de núcleos para realizar análisis estadísticos de la distribución del *crossing over*.

Un enfoque alternativo para el mapeo de los eventos de *crossing over* ha sido desarrollado mediante la localización citológica de los sitios de recombinación a lo largo de los cromosomas en paquitene usando anticuerpos contra la proteína MLH1, que se encarga de la reparación de los errores de apareamiento. El uso de inmunofluorescencia en microextendidos de células meióticas, revela que la proteína MLH1 aparece formando focos discretos a lo largo de los CSs lineales que representan a los bivalentes sinapsados en paquitene. La relación entre los focos de MLH1 y los eventos de recombinación fue demostrada inicialmente en espermatocitos humanos y de ratón (Barlow y Hultén 1998a, b). En ambas especies, el número de focos de MLH1 en paquitene medio se corresponde con el número de eventos de recombinación analizados mediante los mapas de ligamiento u otros métodos citológicos como ser el recuento del número de quiasmas. También se comprobó que las diferencias observadas en el número de focos entre machos y hembras son similares a las diferencias observadas en el número de quiasmas en el ratón (Baker *et al.* 1996) y en el ser humano (Barlow y Hultén 1998a, b). Otra evidencia a favor de que MLH1 se corresponde con los eventos de *crossing over* es que los focos de MLH1 en machos de ratón y en el ser humano exhiben interferencia (Barlow y Hultén 1998a, b; Anderson *et al.* 1999), es decir que la presencia de un foco reduce la probabilidad de la presencia de otro en la cercanía (Jones y Franklin 2006; Berchowitz y Copenhaver 2010). Durante el diplotene parte de los focos de MLH1 permanecen sobre los cromosomas y luego se observan en el sitio de convergencia de los ejes meióticos a nivel de los quiasmas, apoyando la idea de la correspondencia de los focos de MLH1 y los NRs tardíos o maduros (Baker *et al.* 1996; Marcon y Moens 2003). En las aves los focos de MLH1 también pueden ser evidenciados utilizando anticuerpos comerciales contra la proteína MLH1 humana, como se ha demostrado en especies de diversos órdenes (Pigozzi 2001; Pigozzi y Solari 2005; Calderón y Pigozzi 2006). Inicialmente en el pollo se demostró la equivalencia del número de focos en ovocitos con los NRs en la misma especie y con los quiasmas observados en los cromosomas plumulados (Pigozzi 2001).

El recuento de focos de MLH1 da como resultado un mapa del *crossing over* a nivel citológico. Este recuento de focos puede convertirse en un mapa genético dado que, un foco de MLH1 por meiosis en un determinado intervalo sobre el cromosoma equivale a 50 unidades de mapa (centimorgan, cM). El recuento de focos de MLH1 en microextendidos en paquitene ha permitido construir mapas de la distribución del *crossing over* para cromosomas

específicos en mamíferos, aves y plantas (Froenicke *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Calderón y Pigozzi 2006; Lhuissier *et al.* 2007; Pigozzi 2007; Basheva *et al.* 2008; Borodin *et al.* 2008; Pigozzi 2008; Garcia-Cruz *et al.* 2011; Vozdova *et al.* 2013; Mary *et al.* 2014). En las aves, el mapeo de focos de MLH1 en ovocitos permitió obtener una excelente predicción de la longitud genética total en el pollo, que luego fue confirmada por el extensivo mapeo de ligamiento en esta especie (Pigozzi 2001; Groenen *et al.* 2009). Además, el mapeo de MLH1 en machos y hembras otorga evidencia adicional de la existencia de tasas de recombinación similares en ambos sexos en las aves (Calderón y Pigozzi 2006), como fue previamente sugerido por el recuento de NRs en el pollo y la paloma (Rahn y Solari 1986; Pigozzi y Solari 1999a). En resumen, una amplia investigación en mamíferos, aves y plantas ha demostrado que los focos de MLH1 proveen una excelente estimación de la longitud genética genómica total, así como la frecuencia y distribución de los eventos de recombinación en los cromosomas individuales.

El método de MLH1 para la medición de la tasa de recombinación ofrece varias ventajas notables por sobre los enfoques genéticos tradicionales: 1) debido a que los eventos de *crossing over* se observan directamente, las estimaciones de la tasa de recombinación no se ven afectadas por el muestreo binomial de los cromosomas recombinantes en la meiosis; 2) es posible analizar un gran número de espermatocitos y ovocitos para lograr estimaciones precisas de la recombinación global en un sólo individuo y no es necesario el análisis de un gran número de recombinantes; 3) aunque es un método laborioso, su costo es menor con respecto a los costos del genotipado de la descendencia de un único individuo, lo cual es requerido en los métodos basados en el análisis del *pedigree*; y 4), la estimación de la distancia genética entre COs a lo largo de los cromosomas meióticos no depende de la densidad de marcadores moleculares polimórficos.

Como fue explicado en secciones anteriores, el evento que inicia el proceso de recombinación meiótica es la formación de numerosas DSBs en el ADN. La reparación homóloga de las DSBs puede seguir cualquiera de las siguientes tres vías: 1) NCO, que resulta en conversión génica; 2) CO con interferencia (CO de clase I, producido por la vía 1); o 3) CO sin interferencia (CO de clase II, producido por la vía 2). En algunos organismos se ha demostrado que los focos de MLH1 marcan los COs de clase I sobre los CSs (por ejemplo, Froenicke *et al.* 2002; Lhuissier *et al.* 2007). La vía de resolución de las DSBs que produce los COs de tipo II, no muestra interferencia en los intervalos marcadores analizados y no son marcados por los focos de MLH1 (de los Santos *et al.* 2003; Higgins *et al.* 2004; Chelysheva *et al.* 2012). La vía 1 (es decir la que se marca mediante anticuerpos contra MLH1) produce la mayoría de los eventos de recombinación, mientras que la vía 2 produce alrededor entre un 5 y un 30% de los COs, dependiendo de los organismos (de los Santos *et al.* 2003; Berchowitz *et al.* 2007; Osman *et al.*

2011). Específicamente en el tomate (*Solanum lycopersicum*) se ha podido observar que hay una mayoría de NRs que coinciden con los focos de MLH1 (COs de clase I), mientras que un 18% de los NRs no se marcan el anticuerpo contra MLH1 (COs de clase II) (Anderson *et al.* 2014). En consecuencia, el número de focos de MLH1 en el tomate, es inferior al número de NRs y de quiasmas

A diferencia de lo observado en el tomate, el número promedio de quiasmas observado en los cromosomas plumulados del pollo y la codorniz tienen una coincidencia casi perfecta con el número de focos de MLH1 en paquitene habiéndose determinado por dos grupos de trabajo de manera independiente (Rodionov *et al.* 1992b; Pigozzi 2001; Rodionov y Chechik 2002; Calderón y Pigozzi 2006; del Priore y Pigozzi 2015b). Asimismo, la longitud del mapa genético del pollo determinada por el recuento de focos de MLH1 es de 3250 cM (Pigozzi 2001), muy similar a los 3228 cM la obtenida mediante análisis de ligamiento en la misma especie (Groenen *et al.* 2009). Es posible que las vías de reparación de DSBs en las aves difiera de las observadas en los mamíferos y algunas plantas, o tal vez el número de eventos de *crossing over* clase II es muy bajo en las aves y no son puestos en evidencias debido al error estadístico inherente al procedimiento de recuento citológico del *crossing over.*

## I.4. Inmunolocalización de MLH1: una metodología para abordar diferentes problemáticas

### I.4.a. Frecuencia de recombinación y morfología cromosómica

La inmunolocalización de MLH1 y de proteínas del CS ha sido ampliamente utilizada para analizar cuestiones básicas de la meiosis temprana como es la frecuencia de recombinación y su relación con la longitud del CS autosómico. En los espermatocitos humanos se han descripto variaciones interindividuales en la frecuencia promedio de recombinación entre individuos, basándose en el número de focos de MLH1 (Laurie y Hultén 1985; Lynn *et al.* 2002; Hassold *et al.* 2004; Sun *et al.* 2005). En numerosos estudios se ha observado que las mujeres poseen aproximadamente el doble de eventos de recombinación que los varones, mientras que la longitud de los CSs por célula en mujeres también es el doble que en los varones, sugiriendo una correlación positiva entre la frecuencia de recombinación y la longitud del CS autosómico (Rasmussen y Holm 1978; Bojko 1985; Tease *et al.* 2002; Tease y Hultén 2004; Codina-Pascual *et al.* 2006). Otros estudios demostraron una fuerte correlación

entre la longitud promedio de cada bivalente autosómico y el número de focos de recombinación por bivalente en varones (Sun *et al.* 2004).

Otro aspecto que es posible analizar mediante la inmunolocalización de la proteína MLH1, es la manera en que se distribuyen los focos de esta proteína a lo largo de los CSs. Usando esta metodología, la frecuencia y distribución de los sitios de *crossing over* ha sido examinada en diversos organismos (Tabla 1). Analizando la distribución de los focos de MLH1 a lo largo de los bivalentes se ha observado un patrón general en la distribución de los focos: una alta frecuencia de focos cerca de los telómeros y una baja frecuencia en la zona cercana al centrómero (Anderson *et al.* 1999; Pigozzi y Solari 1999b; Pigozzi 2001; Froenicke *et al.* 2002; Lynn *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Calderón y Pigozzi 2006; Sun *et al.* 2006; Borodin *et al.* 2007; Basheva *et al.* 2008; Borodin *et al.* 2008).

**Tabla 1**: Análisis del *crossing over* mediante de la localización de MLH1[a]

| Especie o Grupo Taxonómico | Aporte | Referencia |
|---|---|---|
| **Mamíferos euterios** | La tasa de recombinación tiene un fuerte componente filogenético, el cual parece ser direccional y estar sujeto a la selección natural. | (Segura *et al.* 2013) |
| **Ser humano** | Frecuencia y distribución de la recombinación de todos los autosomas de varones y mujeres. | (Tease *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Codina-Pascual *et al.* 2006) |
| **Platyrrhini (primates)** | Heterogeneidad interespecífica en el comportamiento recombinacional. | (Garcia-Cruz *et al.* 2011) |
| **Ratón** | Mapas de la recombinación de los autosomas y correspondencia de los focos de MLH1 con los quiasmas. | (Anderson *et al.* 1999; Froenicke *et al.* 2002) |
| **Caballo** | Análisis de la distribución y correspondencia de los focos de MLH1 con los quiasmas. | (Al-Jaru *et al.* 2014) |
| **Bovidae** | Diferencias significativas entre especies con igual número fundamental autosómico, las cuales difieren en una única fusión céntrica. | (Vozdova *et al.* 2013) |
| **Cerdo** | Análisis de la recombinación en cromosomas individuales. | (Mary *et al.* 2014) |
| **Perro** | Análisis del patrón general de la recombinación. | (Basheva *et al.* 2008) |
| **Gato** | Esta especie se caracteriza por la mayor densidad de recombinación y la menor interferencia dentro de los mamíferos. | (Borodin *et al.* 2007) |
| **Tomate** | Comparación entre los mapas de NR y los de MLH1. | (Lhuissier *et al.* 2007) |
| ***Arabidopsis thaliana*** | El CO obligatorio se marca con MLH1 y es generado por la vía 1 de *crossing over.* | (Chelysheva *et al.* 2010) |
| **Pollo** | Análisis de la distribución de los focos de MLH1 en macro y microbivalentes. | (Pigozzi 2001) |
| **Diamante mandarín** | Análisis de la recombinación en el cromosoma restringido y en el cromosoma Z. | (Pigozzi y Solari 2005; Pigozzi 2008) |
| **Codorniz y diamante mandarín** | Igual recombinación entre sexos y diversidad de patrones de la recombinación interespecíficos. | (Calderón y Pigozzi 2006) |
| **Tinamiformes** | Análisis de la diferenciación de los cromosomas sexuales mediante localización de MLH1. | (Pigozzi 2011) |

[a] Dada la extensa literatura disponible se citan sólo algunos de los trabajos en los que se utilizó la inmunodetección de MLH1 para el análisis de la recombinación.

Los mecanismos por los cuales las células regulan la distribución de los COs a lo largo de los cromosomas no se conocen aún, pero parecería que el número y distribución de

COs dependen del tamaño y la morfología cromosómica. Cromosomas más grandes tienden a acumular una mayor cantidad de COs y cada brazo cromosómico generalmente presenta al menos un evento de recombinación (Kauppi *et al.* 2004). Por otro lado, la morfología cromosómica tiene un rol mecánico en la distribución del *crossing over*, probablemente debido a las fuerzas que están asociadas con el apareamiento y sinapsis de los cromosomas durante la profase temprana (Parvinen y Soderstrom 1976; Scherthan *et al.* 1996; Woglar *et al.* 2013). Consistente con el rol de la morfología cromosómica en el modelado de la recombinación, se ha observado que el número de brazos cromosómicos o NF autosómico de un cariotipo muestra una fuerte correlación en el número promedio de COs en los mamíferos (Pardo-Manuel De Villena y Sapienza 2001).

### I.4.b. Relación entre rearreglos cromosómicos y el *crossing over*

Los rearreglos cromosómicos tienen un efecto notable en la frecuencia de *crossing over* y en su distribución. En organismos con polimorfismos Robertsonianos como la musaraña común (Borodin *et al.* 2008) y el ratón doméstico (Merico *et al.* 2003) y en humanos portadores de una translocación recíproca (Pigozzi *et al.* 2005) se ha analizado el patrón de distribución de los eventos de recombinación mediante la localización de los focos de MLH1. En la musaraña y en el ratón fue observada una reducción en el número de eventos de recombinación proximales y una distribución más distal en homocigotas metacéntricos comparada con la distribución en homocigotas acrocéntricos. De manera similar, en el cuadrivalente que se forma como resultado de la translocación recíproca entre los cromosomas 11 y 14 del paciente estudiado, se observó una reducción en el número de eventos de recombinación y notables cambios en la distribución de los focos de MLH1 a lo largo de alguno de los elementos que forman el cuadrivalente. El recuento de focos de MLH1 también ha permitido demostrar cambios en el patrón de distribución del *crossing over* en presencia de rearreglos intracromosómicos. Por ejemplo, en el diamante mandarín, *Taeniopygia guttata* (Estrildidae, Passeriformes), se demostró que hay una supresión total de la recombinación dentro de un segmento cromosómico involucrado en una inversión en los individuos heterocigotas (del Priore y Pigozzi 2015a).

### I.4.c. Confección de mapas de la recombinación utilizando la localización de MLH1

El mapeo físico de secuencias a nivel de todo un genoma es la base para el aislamiento de genes y para ensamblar las secuencias a escala cromosómica con precisión. Realizar un mapa de la recombinación basado en marcadores citológicos de la recombinación durante el paquitene permitiría predecir la localización física de todos los marcadores mapeados genéticamente sobre los cromosomas meióticos, sin necesidad de utilizar costosos y repetidos experimentos de localización mediante FISH.

Puesto que el mapeo de focos de MLH1 permite relacionar la cantidad de recombinación con una posición citológica dada en el cromosoma meiótico y los mapas de ligamiento dan la cantidad de recombinación entre genes o secuencias marcadoras, es posible combinar estas dos aproximaciones metodológicas para predecir directamente la posición de marcadores mapeados genéticamente con su posición física sobre el cromosoma. Los mapas de ligamiento no poseen información de la distancia real, expresada en base a la longitud cromosómica o a la distancia física, es decir el número de pares de bases de ADN, entre dichos marcadores. Esto se debe a que, como fue mencionado previamente, el *crossing over* no se distribuye uniformemente a lo largo de los cromosomas. Como resultado, los mapas de ligamiento no pueden simplemente superponerse sobre los cromosomas para determinar la posición física de los genes. Para ello es necesario establecer la proporcionalidad entre los mapas de MLH1 y los mapas de ligamiento. Al establecerse la relación entre ambos mapas de un organismo sería posible predecir la distancia genética entre marcadores por un método exclusivamente citológico. O a la inversa, si conocemos la distancia genética de un marcador con respecto al extremo del cromosoma podemos predecir su localización física sin realizar FISH. Esta proporcionalidad ya ha sido establecida en el maíz (Anderson *et al.* 2004) y en el tomate (Chang *et al.* 2007; Sato *et al.* 2012). Además de los antecedentes en el tomate y el maíz, existe un antecedente similar para un número pequeño de marcadores ligados a los cromosomas 3 y 4 en el ratón (Froenicke *et al.* 2002) utilizando el mapa de recombinación citológico basado en la distribución de focos de MLH1 (revisado en Gerton y Hawley 2005).

Cuando se construyen mapas genéticos se asume que hay una correlación lineal entre la distancia genética y la distancia física entre los marcadores, aunque esto ocurre sólo excepcionalmente en algunos segmentos cromosómicos. Estas suposiciones y prácticas llevan a distorsiones de las longitudes de mapa y a otros errores que podrían evitarse si se utilizaran complementariamente datos de frecuencia y distribución de la recombinación obtenidas por métodos citológicos. Un problema frecuente de los mapas de ligamiento es la "inflación" de su longitud, que se origina por la utilización de un número de marcadores menor

que el apropiado o cuando no se depuran los datos de manera suficiente para desestimar COs dobles que aparecen en el análisis computacional de los datos pero que en realidad no existen. Un ejemplo, concreto de este tipo de situaciones la encontramos en el mapa de ligamiento de *G. domesticus*. El último mapa promedio publicado tiene 3228 cM y es considerablemente menor que el publicado previamente que tenía 4200 cM (Schmid *et al.* 2005; Groenen *et al.* 2009). Resulta apropiado volver a mencionar que el número de crossovers determinado por recuento de focos de MLH1 en *G. domesticus* (Pigozzi 2001) demostró que hay en promedio 65 focos en los ovocitos de esta especie, por lo cual la longitud de mapa estimada por este método citológico es de 3250 cM (65 focos de MLH1 x 50 cM), muy cercana a la del mapa de ligamiento de esta especie actualizado en el año 2009 (Groenen *et al.* 2009).

El uso focos de MLH1 como marcadores de la recombinación está ampliamente justificado a partir de resultados anteriores que demuestran que dichos focos son una expresión citológica del *crossing over* en las aves y en mamíferos. Construir un mapa de MLH1 es igualmente factible en machos y hembras de las especies a analizar. Por ello puede obtenerse un mapa consenso en cM, de la misma manera que se logra con un mapa de ligamiento tradicional cuando existe una densidad de marcadores suficiente. Es importante utilizar cromosomas en paquitene para analizar la recombinación, porque los focos de MLH1 se observan en este estadio, que es cuando se resuelven los eventos de *crossing over*. El mapa en cM generado por MLH1 (mapa de MLH1-cM) es directamente trasladable a los cromosomas mitóticos, a diferencia de lo que ocurre entre un mapa de ligamiento tradicional, ya que se ha observado en las aves una correlación entre el cariotipo mitótico y meiótico (Pigozzi y Solari 1997, 1998; del Priore y Pigozzi 2015b). Finalmente, los cromosomas en paquitene ofrecen mayor resolución en caso de que existan marcadores cercanos entre sí cuyo orden presente un conflicto entre el mapa de ligamiento y su localización previa sobre cromosomas mitóticos.

## I.5. Objetivos

Con base en lo expuesto se planteó como objetivo general establecer las relaciones básicas entre la frecuencia y distribución del *crossing over* y la morfología cromosómica en aves con una estructura típica del cariotipo.

A partir de este objetivo general, se seleccionaron 5 especies de Galloanserae teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Su característica de grupo monofilético que conforma la segunda radiación evolutiva dentro de la clase Aves
- El conocimiento previo de los rearreglos del cariotipo en las especies del grupo durante su divergencia evolutiva
- La disponibilidad de mapas de ligamiento para comparar las tasas de recombinación con las obtenidas mediante el mapeo de focos de MLH1
- La accesibilidad al material experimental a fin de asegurar la factibilidad de los estudios meióticos

Objetivos particulares:

- Verificar la existencia de una proporcionalidad entre los cromosomas mitóticos y sus CSs
- Determinar si la longitud de los CSs son predictivas del contenido de ADN de un par cromosómico dado
- Comprobar si en las aves los focos de MLH1 representan la mayoría de los eventos de recombinación
- Relacionar la morfología cromosómica con la frecuencia y distribución del *crossing over*
- Establecer si la estructura cromosómica conservada dentro de las Galloanserae determina una distribución típica del *crossing over*
- Generar una propuesta sobre la relación entre tasas de recombinación y filogenia en la clase Aves

# II. Materiales y Métodos

## II.1. El material de estudio

En el presente trabajo de Tesis se estudiaron citológicamente 5 especies de la clase Aves, pertenecientes a dos órdenes diferentes (Anseriformes y Galliformes), incluidos en el superorden Galloanserae. Todas las especies tienen números cromosómicos altos, con la presencia de numerosos microcromosomas, y características propias en cuanto a la morfología de los pares cromosómicos mayores 1-8, que se explican para cada especie en los resultados. El detalle de las especies analizadas es el siguiente:

| **Especie** | **Nombre vulgar** | **Familia** | **Orden** | **2n** |
|---|---|---|---|---|
| • *Anas platyrhynchos* | pato doméstico | Anatidae | Anseriformes | 80 |
| • *Numida meleagris* | gallina de Guinea | Numididae | Galliformes | 76 |
| • *Gallus domesticus* | pollo | Phasianidae | Galliformes | 78 |
| • *Coturnix japonica* | codorniz común | Phasianidae | Galliformes | 78 |
| • E*xcalfactoria chinensis* | codorniz china | Phasianidae | Galliformes | 78 |

Todos los animales y huevos utilizados se obtuvieron de criaderos comerciales. Los individuos de la especie *G. domesticus* pertenecen a una línea de pollos parrilleros desarrollada por la compañía Arbor Acres.

En cada especie se analizó el cariotipo mitótico y los cromosomas meióticos en paquitene; estos últimos para analizar el *crossing over*. El *crossing over* se analizó en los ovocitos de todas las especies, con la excepción de *E. chinensis*, ya que no fue posible conseguir huevos fértiles de esta especie. El paquitene se desarrolla en el testículo de machos adultos, mientras que en los ovocitos el paquitene se observa antes de la eclosión o próxima a este momento. Por este motivo, se incubaron huevos en condiciones de humedad y temperatura controladas durante el tiempo de incubación correspondiente para cada especie: 21 días para el pollo, 18 días para la codorniz común, 27 días para el pato y 28 días para la gallina de Guinea.

El inicio de la meiosis en el sexo femenino no es sincrónico en todos los ovocitos, de manera que antes de la eclosión y en días subsiguientes co-existen en el ovario poblaciones de ovocitos en diferentes estadios de la profase I, como se demostró inicialmente en el pollo (Hughes 1963). En *G. domesticus* el pico máximo de paquitenes en las hembras se encuentra en el día posterior a la eclosión (Día +1) y su duración es de unas 24 hs (Hughes 1963; del

Priore y Pigozzi 2012). En las hembras de las demás especies analizadas se determinó el momento de máxima frecuencia de paquitenes mediante recuentos de los estadios de la profase I en hembras de diferentes edades antes y después de la eclosión (Tabla2). Solamente en el pato el pico de paquitenes ocurre antes de la eclosión, el día 25 de incubación (E25).

**Tabla 2**: Detalle de los Individuos analizados por especie, sexo y edad para el recuento de focos de MLH1 y para determinar el pico de paquitenes en las hembras.

| Especie | Sexo | Tipo de recuento | Edad | N° de individuos |
|---|---|---|---|---|
| ***G. domesticus*** | ♀ | Focos de MLH1 | Día +2 | 6 |
| ***C. japonica*** | ♀ | Estadios | Día E16 | 3 |
| | | | Día +2 | 2 |
| | | | Día +4 | 2 |
| | | | Día +7 | 3 |
| | | Focos de MLH1 | Día +2 | 3 |
| | ♂ | Focos de MLH1 | > 6 semanas | 2 |
| ***E. chinensis*** | ♂ | Focos de MLH1 | > 6 semanas | 2 |
| ***N. meleagris*** | ♀ | Focos de MLH1 | Día 0 | 2 |
| ***A. platyrhynchos*** | ♀ | Estadios | Día E25 | 3 |
| | | | Día +1 | 2 |
| | | | Día +7 | 4 |
| | | Focos de MLH1 | Día E25 | 3 |

### II.2. Aspectos éticos de los procedimientos experimentales

En todos los procedimientos que involucraron a los animales empleados para este estudio se aplicaron los lineamientos de la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (National Research Council 1996) y el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio (Organización Mundial de la Salud 2005). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, UBA (EXP-UBA 2350/2013). Las aves fueron eutanasiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico o bien utilizando una cámara de $CO_2$, según los protocolos indicados en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (National Research Council 1996).

## II.3. Cariotipo mitótico

Aunque los cariotipos de las especies utilizadas en este trabajo están descriptos en la bibliografía, el análisis de los cromosomas mitóticos permite descartar rearreglos mayores del cariotipo que pudieran presentarse en los individuos analizados. Por otra parte, los cromosomas mitóticos se utilizaron para realizar mediciones de las longitudes relativas e índices centroméricos a fin de compararlos con estos mismos parámetros en los CSs.

### II.3.a. Cultivos cortos de médula ósea

Soluciones:

- Colchicina (Sigma-Aldrich), concentración 10 µg/ml
- Solución salina de Hanks (Sigma-Aldrich, N° Cat. H9394)
- Solución hipotónica de KCl 0.56%
- Fijador: metanol:ácido acético glacial (3:1)
- Solución de Giemsa 4%, pH=7
- Solución de buffer fosfato (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 2 mM en agua destilada
- DAPI: solución stock de concentración 0.2 µg/ml

Procedimiento:

1. Previamente a la eutanasia, los animales recién eclosionados fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de colchicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.3 µg/gr de peso del animal.
2. Al cabo de dos horas desde la inyección con colchicina, se extrajo la médula ósea del fémur inyectando solución de Hanks a través de la cavidad medular. El material obtenido fue disgregado e incubado durante 20 minutos en una solución hipotónica de KCl 0.56% a 37°C.
3. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm en una centrífuga de mesa. Se descartó el sobrenadante y se fijó al material con fijador metanol:ácido acético glacial (3:1), dejando al material a 4°C hasta en día siguiente.

4. Se realizaron uno o dos cambios con el mismo fijador y se goteó el material sobre un portaobjetos enfriado en hielo. El fijador se evaporó mediante el calor de la llama de un mechero o sobre una placa metálica expuesta al vapor en un baño térmico a 55°C.
5. Las preparaciones obtenidas se colorearon durante 5 minutos en una solución de Giemsa. Alternativamente se utilizó DAPI (dilución 1:100 de una solución stock) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de la tinción con DAPI los preparados se montaron bajo cubreobjetos utilizando una solución de DABCO (1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano) en glicerol al 90% para retrasar el desvanecimiento de la fluorescencia.

### II.3.b. Obtención de cromosomas mitóticos a partir de embriones

Para la obtención de preparaciones de cromosomas mitóticos a partir de embriones se incubaron huevos fértiles durante 6 días en condiciones controladas de humedad y temperatura.

Soluciones:

- Colchicina (Sigma-Aldrich), concentración 10 µg/ml
- Solución salina de Hanks (Sigma-Aldrich, N° Cat. H9394)
- Solución hipotónica de KCl 0.56%
- Fijador: metanol:ácido acético glacial (3:1)
- Solución de Giemsa 4%, pH=7
- Solución de buffer fosfato (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 2 mM en agua destilada.
- DAPI: solución stock de concentración 0.2 µg/ml

Procedimiento:

1. Se inyectó a cada huevo 0.3 µl de una solución de colchicina (Sigma Aldrich) de 10 µg/ml, dejándolos durante 1 hora a 37°C.

2. Luego de disgregar el material fue expuesto a una solución hipotónica de KCl 0.56% durante 20 minutos a 37°C.
3. El procedimiento continúa como en el punto 3 del cultivo corto de médula ósea.

### II.3.c. Captura de imágenes de cromosomas mitóticos

Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara CCD Olympus DP73 acoplada a un microscopio Zeiss Axiophot.

## II.4. Cariotipo meiótico

### II.4.a. Microextendidos de CS de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron a partir del ovario izquierdo que es el único funcional en la mayoría de las aves. El ovario se diseccionó utilizando una tijera tipo Vannas que permite cortar todo el ovario de una sola vez, y se colocó en solución de Hanks para quitar restos de sangre y otros tejidos antes de realizar los microextendidos. Las preparaciones se realizaron inmediatamente luego de cada disección.

Soluciones:

- Sacarosa 100 mM, pH 8.5 ajustado con buffer borato de sodio 0.05 M
- Fijador: paraformaldehído (PFA) 1% en agua desionizada a pH 8.5, ajustado con buffer borato de sodio + Tritón X-100 (concentración final 0.15%)
- Solución de lavado: Photoflo 200 (Kodak) al 0.08% en agua desionizada

Procedimiento:

1. El ovario completo se maceró entre dos vidrios esmerilados añadiendo una gota de sacarosa 100 mM. El tejido disgregado se resuspendió en 200 a 240 µl de sacarosa 100 mM, evitando que queden agregados tisulares.

2. En una cámara húmeda se colocaron portaobjetos limpios en posición horizontal y se cubrieron con 3 o 4 gotas de fijador (aproximadamente 100 µl).
3. En cada portaobjetos con fijador se colocaron 30 µl de la suspensión celular.
4. Los portaobjetos se dejaron en la cámara húmeda y luego de 2 horas se lavaron las preparaciones con Photoflo 0.08%.

### II.4.b. Microextendidos de CS de espermatocitos

Soluciones:

- Sacarosa 100 mM, pH 8.5 ajustado con buffer borato de sodio 0.05 M
- Fijador: paraformaldehído (PFA) 1% en agua desionizada a pH 8.5, ajustado con buffer borato de sodio + Tritón X-100 (concentración final 0.15%)
- Buffer de extracción e hipotonía en agua desionizada (pH 8.5): tris-HCl 30 mM, sacarosa 50 mM, citrato de sodio 17 mM, EDTA 5mM (Peters *et al.* 1997)
- Solución de Hanks (Sigma-Aldrich, N° Cat. H9394)

Procedimiento:

1. Se disecaron los testículos y se colocaron en solución de Hanks a temperatura ambiente, luego de quitar la túnica albugínea, una porción de la masa testicular se incubó en buffer de extracción e hipotonía durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Se maceraron pequeñas cantidades de túbulos seminíferos entre dos vidrios esmerilados añadiendo una gota de sacarosa 100 mM. Luego se agregó más sacarosa hasta que la suspensión celular sea apenas opalescente.
3. Luego el procedimiento continúa como en el punto 2 de los microextendidos de CS de ovocitos.

Las preparaciones de CS de ovocitos y espermatocitos se utilizaron inmediatamente o se guardaron en freezer a -70°C para su posterior utilización en distintos procedimientos de inmunodetección (ver a continuación y más adelante).

### II.4.c. Inmunodetección de los ejes meióticos y de proteínas centroméricas

Para realizar la determinación del momento del desarrollo en el que se observa la mayor frecuencia de ovocitos en paquitene se realizó la inmunodetección de los ejes meióticos.

Soluciones:

- PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 2 mM en agua destilada
- PBT: BSA 3% en PBS + Tween-20 0.05%
- DAPI: solución stock de concentración 0.2 µg/ml

Procedimiento:

1. Se realizó el bloqueo en PBT 10% (3 lavados de 10 minutos cada uno).
2. Luego, del bloqueo se incubó a 37°C con anticuerpo primario diluido en PBT, durante unas 16 horas:
   - Anti-SMC3 (Chemicon, Millipore, dilución 1:10000).
3. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS + 0.05% Tween-20.
4. Posteriormente se realizó la incubación a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con TRITC (fluorescencia roja), diluido en PBT:
   - Cabra anti-conejo para los CSs (Jackson ImmunoResarch, dilución 1:50).
5. Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con PBS + 0.05% Tween-20.
6. Se coloreó con DAPI (dilución 1:100) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se realizó un lavado con PBS + 0.05% Tween-20.

8. Finalmente se montó en DABCO para retrasar el desvanecimiento de la fluorescencia.

Para realizar la medición de la longitud y del índice centromérico (IC) de los bivalentes se realizó la inmunodetección simultánea de los ejes meióticos y de proteínas centroméricas. Las soluciones utilizadas y el procedimiento son los mismos que para la inmunodetección de los ejes meióticos pero se utiliza un suero autoinmune (Laboratorio IFI, dilución 1:50) para la detección de las proteínas centroméricas. Este es un suero de pacientes con síndrome CREST, enfermedad en la que se generan autoanticuerpos contra proteínas del centrómero. El producto utilizado es de uso habitual para diagnóstico de enfermedades autoinmunes con patrón centromérico. La detección se realizó mediante un anticuerpo secundario cabra anti-humano marcado con FITC (fluorescencia verde, Jackson ImmunoResearch, dilución 1:50).

### II.4.d. Captura y procesamiento de las imágenes

De los ovocitos y espermatocitos en paquitene se obtuvieron dos imágenes, una para los CSs y otra para los centrómeros. Estas imágenes fueron corregidas en brillo y contraste, y acopladas utilizando el programa Photoshop CS2 (Adobe). Para la construcción de los cariogramas comparativos de cromosomas mitóticos y los CSs correspondientes, cada cromosoma o CS se linearizó utilizando un comando específico del programa Image J que hace lineales objetos que presentan curvas sin introducir distorsiones en los mismos (Kocsis *et al.* 1991). Para cada especie, los cromosomas linearizados y su CS se ordenaron en un cariograma utilizando el programa Photoshop CS2 (Adobe).

## II.5. Recuento de los estadios de la profase I en la codorniz común y el pato

El recuento de los estadios de la profase meiótica se realizó directamente al microscopio de fluorescencia en preparaciones de ovocitos con la inmunomarcación de SMC3 que permite visualizar los elementos laterales del CS y distinguir las etapas de la profase meiótica. Teniendo en cuenta la definición morfológica de los estadios de la profase I (ver

Introducción, Sección I.2.b), se realizó el recuento de cada uno de ellos para determinar el momento en el que se produce la mayor frecuencia de ovocitos en paquitene.

## II.6. Comparación del cariotipo mitótico y meiótico

### II.6.a. Medición de la longitud e índice centromérico (IC) de los cromosomas mitóticos y meióticos

Las mediciones de la longitud e IC se realizaron utilizando el programa MicroMeasure versión 3.3 (http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure/). Este programa registra las longitudes absolutas a partir de los datos de magnificación de la imagen y de su resolución. En el caso de microextendidos de CS devuelve en un archivo Excel las longitudes absolutas y relativas, índices centroméricos y otros parámetros, como distancias absolutas y relativas al centrómero. En las metafases mitóticas fue posible identificar por longitud e índice centromérico los primeros 6 pares cromosómicos y el cromosoma Z en la mayoría de las especies. En el pollo se identificaron también los pares autosómicos 7 y 8 y el cromosoma W. Los pares restantes son acrocéntricos y sus longitudes decrecen de manera gradual por lo cual no es posible distinguirlos en la mayoría de las metafases. Los pares de macrocromosomas autosómicos se compararon con los CSs para establecer si existe correspondencia en cuando a tamaño relativo e IC entre ambos tipos de cromosomas. Para la medición de los cromosomas mitóticos se seleccionaron metafases en las que estuvieran presentes todos los pares de macrocromosomas. Por lo tanto, las longitudes relativas se calcularon dividiendo la longitud absoluta de cada par autosómico identificado por la longitud absoluta total los primeros 6 u 8 pares de autosomas, dependiendo de cuántos pares se identificaron. Como en algunos cromosomas acrocéntricos el brazo p es difícil de observar, las mediciones se realizaron considerando uno de los extremos como el centrómero. En estos casos no se consigna el índice centromérico en los resultados. Los brazos cortos que pudieron medirse en los cromosomas mitóticos están formados mayormente por heterocromatina y coinciden con los brazos donde no se observaron eventos de recombinación. Como los CS ofrecen mejor resolución, el NF autosómico en cada especie se determinó a partir de los núcleos en paquitene, aunque se expresa como NF diploide para una mejor comparación con el número diploide de la especie.

Para las mediciones de los CSs se seleccionaron solamente núcleos completos, en los cuales los bivalentes estuvieran completamente sinapsados y sin estiramientos de los

ejes meióticos. Para comparar los CSs con los cromosomas mitóticos, se calcularon las longitudes relativas y los ICs de los 6 CSs mayores (y los CSs 7 y 8 en el pollo) de la misma manera que para los pares mitóticos, es decir, relativizando las longitudes respecto de la longitud total representada por los primeros 6 u 8 bivalentes. Como los CSs de los microbivalentes tienen una longitud que permite su medición, para realizar determinados análisis, como la tasa de recombinación de macro- y microbivalentes, se midió además la longitud total del set de CSs autosómicos. Los microbivalentes fueron agrupados en tres grupos:

A) del CS 7 o 9 (dependiendo de la especie) al 13: con 1 o 2 focos de MLH1;

B) del CS 14 al 22: con mayoritariamente 1 foco de MLH1;

C) del CS 23 al 37, 38 o 39 (dependiendo de la especie): con 1 foco de MLH1.

El par sexual (ZZ o ZW) fue excluido de las mediciones porque en la meiosis femenina, el eje correspondiente al cromosoma Z no tiene una longitud constante durante el paquitene. Durante la profase I, el par ZW presenta ejes meióticos de distinta longitud al inicio del paquitene, reflejando dicha diferencia de tamaño. La sinapsis de los ejes del par sexual comienza por un extremo (extremo sináptico) y prosigue hasta completar un CS que tiene la longitud aproximada al eje del cromosoma W, y que en su mayor parte representa una sinapsis heteróloga (Solari 1977, 1992; Solari y Pigozzi 1993). La porción remanente de eje simple del cromosoma Z se acorta en un proceso de ajuste sináptico (igualación), y se va enrollando alrededor del eje del cromosoma W que permanece lineal. Al final del paquitene la diferencia de longitud de ambos ejes se reduce notablemente y el CS formado tiene un aspecto ondulante característico. Por lo tanto, durante el paquitene la longitud relativa del cromosoma Z respecto a la longitud del set completo varía, razón por la cual el par ZW fue excluido de la medición de la longitud del set. El bivalente ZZ no experimenta estas modificaciones, pero no se incluyó en las mediciones de la longitud del set de los espermatocitos para hacer equiparables las comparaciones con los datos obtenidos a partir de los ovocitos.

Cuando se analizó la posibilidad de variaciones interindividuales en la longitud de set de CSs, se evaluó la normalidad de la distribución de los datos para determinar si debía utilizarse un *test* paramétrico (ANOVA o *Test* de t) o no paramétrico (Kruskal-Wallis o Mann-Whitney) en los análisis estadísticos. Este análisis de normalidad de los datos, los análisis de regresión lineal y de correlación entre las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos y de los CSs correspondientes se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.01.

## II.7. Análisis de la recombinación

En las preparaciones de CS obtenidas previamente se realizó la inmunodetección de la proteína SMC3, de los centrómeros y de la proteína MLH1 para el análisis de la recombinación en las cinco especies.

### II.7.a. Inmunodetección de SMC3, centrómeros y de MLH1

Soluciones:

- Solución de PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 2 mM en agua destilada
- PBT: BSA 3% en PBS + Tween-20 0.05%
- Solución de lavado: PBS + 0.05% Tween-20
- DNAsa: solución stock de concentración 10 mg/ml
- DAPI: solución stock de concentración 0.2 µg/ml

Procedimiento:

1. Se realizó una digestión con DNAsa (dilución 1:200 de una solución stock), durante 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Luego se Lavaron las preparaciones con PBS y se bloqueó con PBT 10% realizando 3 lavados de 10 minutos cada uno.
3. Se incubó a 37°C con anticuerpos primarios diluidos en PBT, durante unas 16 horas:
   - Anti-SMC3 (Chemicon, Millipore, dilución 1:10000).
   - Suero CREST (Laboratorio IFI, dilución 1:50).
   - Anti-MLH1 (BD Biosciences, dilución 1:30).
4. Luego de la inmunodetección se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con solución de lavado.
5. Se realizó la incubación a temperatura ambiente con anticuerpo secundario, diluido en PBT:
   - Cabra anti-ratón marcado con FITC (fluorescencia verde) para los focos de MLH1 (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:30).

6. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno.
7. Posteriormente se incubó de manera simultánea y a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluorocromos, diluidos en PBT:
   - Cabra anti-conejo marcado con TRITC (fluorescencia roja) para los CSs (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:100).
   - Burro anti-humano marcado con Cy3 (fluorescencia roja) para los centrómeros (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:200).
   - Cabra anti-ratón marcado con FITC (fluorescencia verde) para los focos de MLH1 (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:30).
8. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno.
9. Se coloreó con DAPI (dilución 1:100 de una solución stock) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
10. Se realizó un último lavado, y se montaron las preparaciones en DABCO para retrasar el desvanecimiento de la fluorescencia.

### II.7.b. Recuento de focos de MLH1

De los ovocitos y espermatocitos en paquitene se obtuvieron dos imágenes, una para los CSs y los centrómeros y otra para los focos de MLH1. Estas imágenes fueron procesadas y acopladas utilizando el programa Photoshop CS2 (Adobe). Sólo se tuvieron en cuenta aquellos núcleos que cumplieran con los siguientes criterios: 1) la relación de la señal de SMC3 y MLH1 fuera lo suficientemente alta como para la identificación inequívoca de los focos de MLH1 y de los CSs; 2) que los bivalentes estén completamente sinapsados y que no se observen estiramiento de los ejes; y 3) que los centrómeros, representados por la señal del suero CREST, estén marcados claramente. Se tuvieron en cuenta aquellos núcleos en los cuales los bivalentes presentaran al menos un foco, exceptuando la posibilidad de un microbivalente sin focos. En el recuento de focos no se tuvo en cuenta al par sexual, ya que en el par ZW de las hembras de las especies analizadas la recombinación se encuentra restringida a un único evento de recombinación recíproca en la región pseudoautosómica (Solari 1992; Solari y Pigozzi 1993) (ver Introducción, Sección I.3.b) mientras que el par ZZ de los machos recombina libremente. Se realizó el recuento de focos en los microbivalentes agrupados en los mismos tres grupos que para la medición de la longitud absoluta y relativa (Sección II.6.a).

Para el recuento de los focos totales y por bivalente, y la determinación de la posición de los focos sobre los CSs se utilizó el programa MicroMesure versión 3.3 (http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure/), con el cual se obtuvieron las distancias absolutas y relativas de los focos al centrómero para la construcción de los mapas de la recombinación (ver más adelante).

Para evaluar la posibilidad de variaciones interindividuales se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. En todos los sets de datos se evaluó la normalidad de los mismos para luego realizar un *test* paramétrico (ANOVA o *Test* de t) o no paramétrico (Kruskal-Wallis o Mann-Whitney). Utilizando el mismo software estadístico, se realizó el análisis de regresión lineal y de correlación entre el número promedio de focos en los macrocromosomas y microcromosomas de cada especie y la longitud promedio de los mismos obtenida previamente. Por otro lado también se analizó en las cinco especies la frecuencia del número de focos totales por núcleo en paquitene analizado

Luego de recopilar los datos del recuento de focos, se determinó la longitud del mapa genético en cM total y de cada bivalente multiplicando el número promedio de focos por 50 cM. Se multiplica por 50 ya que como resultado de la recombinación genética meiótica se genera el 50% de gametas recombinantes y 50% de gametas no recombinantes.

### II.7.c. Recuento de quiasmas en espermatocitos en diacinesis/metafase I

La proteína MLH1, al igual que otras proteínas involucradas en la recombinación, aparecen de manera secuencial sobre los ejes meióticos. Por este motivo, el número de focos de MLH1 podría no ser suficientemente estable durante el paquitene como para estimar el número de eventos de recombinación. A fin de evaluar la estabilidad de MLH1 durante el paquitene, se comparó el número de quiasmas del bivalente 1 con el número de focos de MLH1 en el CS respectivo. El recuento se limitó al bivalente número uno para evitar posibles errores de interpretación de la configuración de los quiasmas o la identificación errónea de los bivalentes más cortos en el estadio de metafase I.

#### II.7.c.i. Técnica de Evans

Para el recuento de quiasmas en los machos de *C. japonica* y *E. chinensis* se obtuvieron preparaciones de espermatocitos en el estadio de diacinesis/metafase I mediante la técnica de Evans (Evans *et al.* 1964).

Soluciones:

- Solución de Hanks (Sigma-Aldrich, N° Cat. H9394)
- Solución hipotónica citrato de sodio 1% o KCl 0.56%
- Fijador: metanol:ácido acético glacial (3:1)

Procedimiento:

1. Se disecaron los testículos removiendo la túnica albugínea y se colocó parte de los tubos seminíferos en una placa de Petri con solución de Hanks.
2. Se cortaron los túbulos con tijeras finas o se maceraron entre vidrios esmerilados para liberar las células del epitelio, luego se pipeteó suavemente y se dejó sedimentar en la placa. A continuación se tomó la suspensión celular con una pipeta descartable.
3. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante.
4. Se agregó de 5 a 10 ml de solución hipotónica de citrato de sodio 1% o de KCl 0.56%, se dividió la suspensión celular en dos tubos que se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A uno de los tubos (tubo *Prefijación*) se le agregaron 3 o 4 gotas de fijador.
5. Se centrifugaron ambas suspensiones durante 5 minutos a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante se fijaron los pellets con metanol:ácido acético glacial (3:1).
6. Al día siguiente, se hicieron 3 a 4 cambios de fijador antes de gotear el material sobre portaobjetos enfriados en hielo, secando luego al calor del mechero o sobre una placa metálica dispuesta sobre un baño térmico a 55°C.

### II.7.c.ii. Tinción y captura de imágenes

Las preparaciones obtenidas se colorearon durante 5 minutos en una solución de Giemsa 4% o con DAPI (dilución 1:100 de una solución stock 0.2 µg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de la tinción con DAPI los preparados se lavaron con

una solución de PBS 1X y Tween 0.05% y se montaron con DABCO para retrasar el desvanecimiento de la fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara CCD Olympus DP73 acoplada a un microscopio Zeiss Axiophot.

#### II.7.c.iii. Comparación entre el número de quiasmas y el número de focos de MLH1

Se comparó el recuento de quiasmas del bivalente 1 con el recuento de focos de MLH1 de este mismo bivalente. Se realizó el análisis estadístico utilizando el *test* de t con el programa estadístico GraphPad Prism 6.01.

### II.7.d. Estimación del tamaño del genoma y la tasa de recombinación

El contenido de ADN haploide en picogramos (pg) fue calculado promediando las mediciones del valor C disponibles en la literatura (Gregory 2016). Sólo se utilizaron los valores de las referencias que especificaran la metodología utilizada para la medición del contenido de ADN. Luego, el contenido de ADN en pg se convirtió a millones de pares de bases (Mb) al multiplicar por $0.978 \times 10^9$ (Dolezel *et al.* 2003). En el pollo el cromosoma Z representa aproximadamente el 6% del total del genoma (Schmid *et al.* 2005; Wahlberg *et al.* 2007) y su tamaño y contenido génico se encuentra conservado entre las especies (Itoh *et al.* 2006). Por lo tanto del tamaño total del genoma en Mb se sustrajo el 6% ya que tanto la medición de la longitud de los CSs y el recuento de focos se realizó sobre el set autosómico. El tamaño en Mb de los primeros 8 o 6 macrocromosomas se estimó al multiplicar su longitud relativa al set autosómico completo por el contenido del genoma haploide en Mb. Al realizar esta estimación se asume que la longitud del CS es proporcional al tamaño del genoma, como se ha observado previamente en el pollo (Pigozzi 2001). En los Resultados (Sección III.1.a) se muestra que hay una excelente correlación entre el tamaño de los primeros 8 macrocromosomas obtenido en el ensamblado del genoma del pollo (www.ensembl.org, publicación nro. 86 del ensamblado del genoma; Warren *et al.* 2016) y el tamaño en Mb obtenido a partir de los datos del contenido de ADN como se explicó anteriormente. Esta fuerte correlación da soporte a esta metodología para el cálculo del tamaño de los cromosomas en aquellas especies que no poseen un genoma secuenciado como el pollo.

### II.7.e. Construcción de los mapas de recombinación: mapas de MLH1-cM

Para la construcción de los mapas de recombinación la posición de los focos de MLH1 medidas en relación al centrómero fueron convertidas a valores absolutos al multiplicar por la longitud promedio de cada brazo cromosómico. La posición de los focos de MLH1 en el brazo corto de los bivalentes bibraquiados primero se relativizó al telómero para poder construir los histogramas del bivalente completo. En el caso de los focos localizados en el brazo largo de los bivalentes se adicionó la longitud absoluta promedio del brazo corto. Con los datos de todos los núcleos analizados en cada especie se realizó el análisis de la frecuencia relativa y absoluta tomando como intervalo un porcentaje constante de la longitud de cada CS. Las frecuencias de focos de cada histograma se pueden convertir a cM al multiplicar el número de focos en cada intervalo del CS por 50 y luego dividirlo por el número total de CSs observados.

Para obtener los mapas acumulativos de cM se sumaron los valores en cM de los intervalos adyacentes a lo largo de cada CS comenzando en el telómero del brazo corto.

En machos y hembras de la codorniz común, las frecuencias acumulativas de focos en los 6 bivalentes analizados se compararon mediante un *test* de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la existencia de diferencias de la distribución del *crossing over* entre sexos. Todos los análisis de la distribución de la frecuencia de focos a lo largo de los CSs y el *test* estadístico de Kolmogorov-Smirnov se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.01.

# III. Resultados

## III.1. *Gallus domesticus*

El pollo, *G. domesticus*, pertenece a la familia Phasianidae del orden Galliformes. Su número diploide es de 78 cromosomas y es posible identificar los 8 pares cromosómicos mayores y el par sexual por tamaño e índice centromérico (IC), tanto en metafases de cromosomas mitóticos como en extendidos de CS (Figura 5 A-D). El número fundamental (NF) en esta especie es de 88 para el set completo y 20 para los primeros seis macrocromosomas o 28 si se consideran los macrocromosomas 1 a 8.

### III.1.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *G. domesticus*

En las metafases obtenidas por cultivos cortos de médula ósea (Figura 5A) se contó un número diploide de 78 cromosomas, aunque fueron frecuentes los recuentos menores a este número. En las preparaciones de cromosomas mitóticos de las aves es común que los microcromosomas se encuentren muy cercanos entre sí lo que impide distinguir algunos de los cromosomas más pequeños como elementos separados. En *G. domesticus* los macrocromosomas 1, 2, 4, 7 y 8 son submetacéntricos, mientras que los cromosomas 3, 5 y 6 son acrocéntricos (Figura 5C). Los pares 9 a 78 se consideran en el presente trabajo como microcromosomas. Todos estos cromosomas son acrocéntricos, según se determinó mediante microscopía electrónica en trabajos previos (Rahn y Solari 1986). El único cromosoma Z presente en las hembras es similar en tamaño al par 4, pero es metacéntrico (IC=0.46) por lo cual puede distinguirse de este par autosómico que es submetacéntrico. El cromosoma W tiene un tamaño similar al par 7 aunque se distingue de este par autosómico por su IC mayor (Figura 5A). En la Tabla 3 se resumen estos parámetros de los cromosomas mitóticos que sirven para determinar la correspondencia con los CSs respectivos.

La Figura 5B muestra un núcleo de un ovocito en paquitene con los 38 bivalentes autosómicos y el par ZW. A partir de núcleos completos como el de la figura, se determinó la longitud promedio del set autosómico y las longitudes promedio e IC de los 8 CSs más largos, que en esta especie, pueden asignarse a los pares mitóticos correspondientes (Tabla 3). Las mediciones de los restantes CSs se dividieron en tres grupos según los criterios establecidos en los Materiales y Métodos (Sección II.6.a), para luego obtener la longitud relativa promedio que representa cada uno de estos grupos en el set total. Estos CSs se corresponden con los de los microbivalentes que son indistinguibles entre sí, acrocéntricos y con longitudes que oscilan en promedio entre 2 y 5 µm (Tabla 3). La longitud promedio del set

de CSs en los ovocitos de *G. domesticus* es 191.4 µm, de los cuales aproximadamente el 58% corresponde a los macrobivalentes 1 a 8. Al comparar las longitud del set se encontraron diferencias significativas entre individuos (Kruskal-Wallis; $P<0.05$), probablemente porque en una de las hembras se registró una mayor variación en la longitud absoluta del set. Como las longitudes relativas promedio de los macrobivalentes en esta hembra no se apartan de las obtenidas en las demás hembras analizadas, los núcleos fueron incluidos en los cálculos para realizar el cariotipo de CSs y el mapa de focos de MLH1.

Es importante destacar que los CSs tienen índices centroméricos son muy similares a los de los cromosomas mitóticos (Figura 5C, Tabla 3) y que la longitudes relativas de cada CS en los núcleos en paquitene guarda una excelente correlación y proporcionalidad con la de los respectivos pares mitóticos (Figura 5D; $r=0.99$, $P<0.0001$). Aunque los CSs mayores son entre cuatro y cinco veces más largos que los cromosomas en mitosis la posición de la señal centromérica en los CSs es la esperada según la constricción primaria que se observa en los cromosomas mitóticos mayores (Figura 5C, Tabla 3). Esta concordancia entre los macrocromosomas mitóticos y los CSs en paquitene demuestra que es posible identificar a un par cromosómico o grupo de ligamiento dentro del cariotipo de CSs.

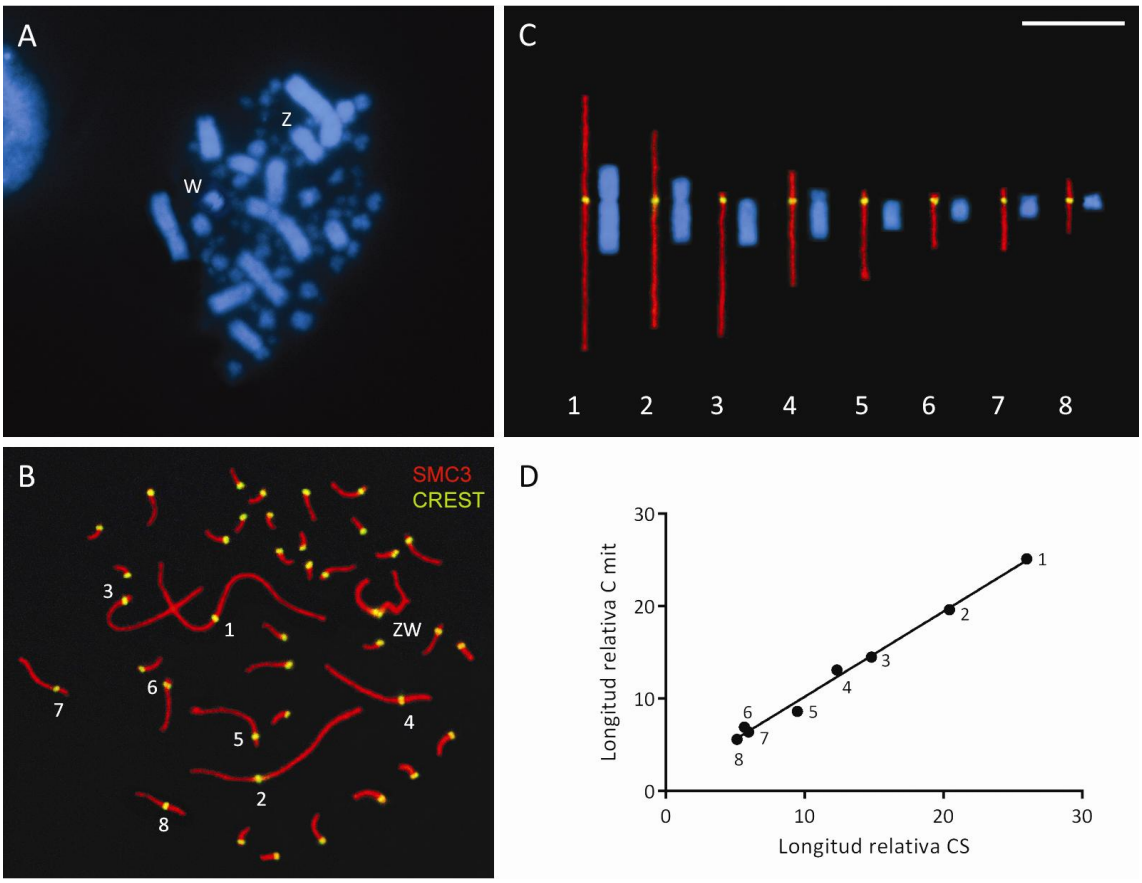


**Figura 5**: Comparación de los cariotipos mitótico y de CSs en *G. domesticus.* A) Metafase mitótica teñida con DAPI. Se señala con letras los cromosomas Z y W. B) Núcleo en paquitene donde se observan los 38 bivalentes autosómicos y el par ZW. Los CSs están marcados con anti-SMC3 que reconoce los elementos laterales del CS, y los centrómeros con suero anticentromérico. Se indican los bivalentes 1 a 8 y el par sexual. C) Cariograma de los cromosomas mitóticos y de los CSs. Se numeran los pares 1-8 ordenados por tamaño decreciente. D) En el gráfico se puede observar la proporcionalidad entre las longitudes relativas de macrocromosomas mitóticos y sus CSs (análisis de regresión lineal, $r^2$=0.99; $y$ = 0.9221$x$ + 0.9847; correlación de Pearson, $r$=0.99; P<0.0001). Barra=10 µm.

**Tabla 3:** Longitud e índice centromérico promedio de los cromosomas mitóticos y de los CSs de *G. domesticus*

| | Par | LA (µm) | | LR (%) | | IC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C Mit | CS | C Mit | CS | C Mit | CS |
| Macrocromosomas | **1** | 6.1 (0.9) | 28.5 (5.1) | 25.1 (1.9) | 26.0 (2.4) | 0.41 (0.02) | 0.41 (0.03) |
| | **2** | 4.8 (0.5) | 22.6 (5.5) | 19.6 (1.4) | 20.4 (2.2) | 0.36 (0.02) | 0.35 (0.03) |
| | **3** | 3.5 (0.7) | 16.3 (2.9) | 14.5 (1.2) | 14.8 (0.9) | - | 0.03 (0.02) |
| | **4** | 3.2 (0.6) | 13.6 (2.6) | 13.1 (1.1) | 12.3 (1.0) | 0.28 (0.04) | 0.24 (0.03) |
| | **5** | 2.1 (0.4) | 10.4 (2.0) | 8.6 (0.7) | 9.5 (0.9) | - | 0.09 (0.03) |
| | **6** | 1.7 (0.3) | 6.2 (1.4) | 6.9 (0.8) | 5.7 (0.9) | - | 0.05 (0.05) |
| | **7** | 1.6 (0.3) | 6.5 (1.1) | 6.4 (0.9) | 6.0 (0.6) | 0.34 (0.04) | 0.24 (0.05) |
| | **8** | 1.4 (0.3) | 5.6 (0.8) | 5.6 (1.0) | 5.1 (0.5) | 0.39 (0.03) | 0.38 (0.05) |
| Micros | **9-13** | - | 4.9 (1.1) | - | - | - | - |
| | **14-22** | - | 2.9 (0.6) | - | - | - | - |
| | **23-38** | - | 1.9 (0.3) | - | - | - | - |
| **Z** | | 3.1 (0.6) | - | - | - | 0.46 (0.04) | - |
| **Set autosómico** | | - | 191.4 (25.8) | - | - | - | - |

LA: longitud absoluta. LR: longitud relativa. IC: índice centromérico. C Mit: cromosomas mitóticos. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. Metafases mitóticas N= 18. Ovocitos en paquitene: N= 138.

El ensamblado del genoma del pollo se encuentra en una etapa suficientemente avanzada como para obtener datos fiables del tamaño de los distintos pares cromosómicos en Mb (www.ensembl.org, publicación nro. 86 del genoma; Warren *et al.* 2016). Una regresión lineal muestra la proporcionalidad directa entre el tamaño de los cromosomas de dicho ensamblado y la longitud relativa de los 8 CSs mayores (Figura 6A, $r=0.99$, $P<0.0001$). Para determinar si los CSs permiten predecir el tamaño en Mb de los pares cromosómicos, calculamos el tamaño en Mb de los macrobivalentes a partir de las longitudes relativas de sus CSs y el contenido de ADN de la especie, como se explicó en los Materiales y Métodos (Sección II.7.d). Una prueba de regresión entre el tamaño de los macrobivalentes obtenido de esta manera y el tamaño de los cromosomas equivalentes en el ensamblado del pollo demuestra que efectivamente la longitud de los CSs es un indicador confiable del tamaño en Mb en *G. domesticus* (Figura 6B). Teniendo en cuenta la correspondencia entre el cariotipo de los cromosomas mitóticos y de los CSs observada para todas las especies, consideramos que esta misma metodología permite predecir el tamaño en Mb de los macrocromosomas en las demás especies analizadas que no cuentan con un genoma secuenciado y ensamblado (ver Secciones siguientes).

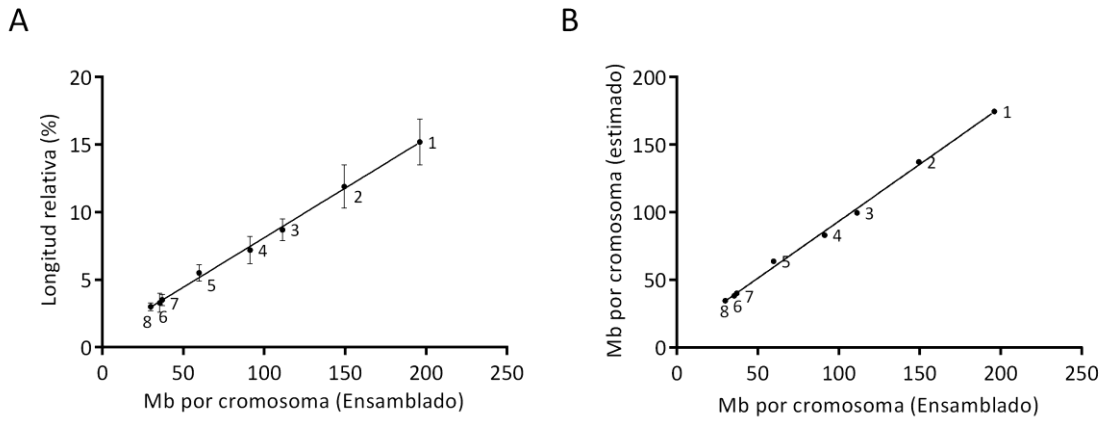


**Figura 6**: Estimación del tamaño en Mb de los macrobivalentes en *G. domesticus* a partir de la longitud relativa de los CSs. A) En este gráfico se observa una relación lineal y positiva entre el tamaño de los cromosomas obtenidos del ensamblado (Warren *et al.* 2016) y la longitud relativa de los CSs mayores (correlación de Pearson, $r$= 0.99, P<0.0001; análisis de la regresión lineal, $r^2$= 0.99, $y$= 0.07331$x$ + 0.7765). La barra vertical representa la desviación estándar de las mediciones de la longitud relativa. B) En el gráfico se puede observar que existe una relación lineal y positiva entre el tamaño en Mb de los cromosomas del ensamblado y el tamaño estimado en el presente trabajo a partir de la longitud relativa de los CSs y el contenido de ADN (correlación de Pearson, $r$=0.99, P<0.0001; análisis de la regresión lineal, $r^2$= 0.99, $y$= 0.8419$x$ + 0.9120). En ambos gráficos se numeran los cromosomas 1 a 8.

### III.1.b. Análisis de la recombinación en *G. domesticus*

Los focos de MLH1 son distinguibles como entidades discretas sobre cada CS, incluyendo los CSs más pequeños (Figura 7A). Para determinar el número promedio de focos por núcleo y en cada uno de los CSs mayores se analizaron 5244 bivalentes autosómicos en 138 ovocitos de 6 hembras (Tabla 4). El par sexual ZW tiene un único foco de MLH1, según se determinó en investigaciones previas lo que está en concordancia con la restricción de la recombinación a la región pseudoautosómica en todas las aves Neognatas analizadas hasta el momento (ver Introducción, Sección I.3.b). En promedio se contabilizaron 62.1 focos de MLH1 por núcleo con un mínimo de 51 focos y un máximo de 78 focos, siendo 60 el número de focos más frecuente (Figura 7B). El número promedio de focos totales por hembra varía entre 57.9 y 66.6, con diferencias significativas entre individuos (ANOVA, F=22.55, P<0.0001). Puesto que se analizaron hembras de la misma edad y el criterio de selección de los núcleos para el recuento de focos fue el mismo se considera que estas diferencias no son debidas al método sino que representan diferencias reales entre individuos de la línea comercial empleada.

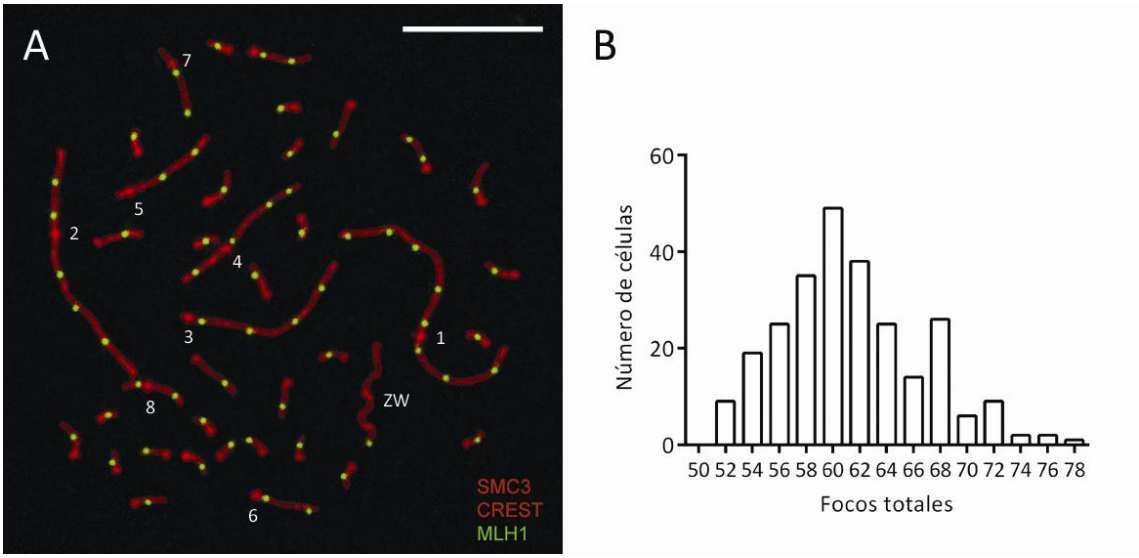


**Figura 7**: Inmunodetección y recuento de focos de MLH1 en ovocitos en paquitene de *G. domesticus*. A) Se observan los CSs de los macro- y microbivalentes de la especie luego de la inmunolocalización de SMC3, los centrómeros y de la proteína MLH1. Se identifican los macrobivalentes 1 a 8 y el par sexual ZW. B) Número de focos por ovocito en los 138 núcleos analizados. Se puede observar que el número de focos de MLH1 totales más frecuente es de 60 focos. Barra=10µm.

**Tabla 4**: Promedio de focos de MLH1, longitud del mapa genético y tasas de recombinación en *G. domesticus*

| | CS | N° focos | Equivalente en cM | LR (%) | Longitud estimada (Mb) | TR (cM/Mb) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Macrocromosomas | **1** | 7.2 (1.6) | 360 | 15.2 (1.7) | 174.6 | 2.1 |
| | **2** | 5.9 (1.2) | 295 | 11.9 (1.6) | 137.3 | 2.1 |
| | **3** | 4.1 (1.0) | 205 | 8.7 (0.8) | 99.6 | 2.1 |
| | **4** | 3.7 (0.9) | 185 | 7.2 (1.0) | 83.1 | 2.2 |
| | **5** | 2.9 (0.8) | 145 | 5.5 (0.6) | 63.7 | 2.3 |
| | **6** | 1.7 (0.5) | 85 | 3.3 (0.7) | 38.2 | 2.2 |
| | **7** | 1.8 (0.6) | 90 | 3.5 (0.4) | 40.1 | 2.2 |
| | **8** | 1.8 (0.6) | 90 | 3.0 (0.3) | 34.6 | 2.3 |
| | **1-6** | 25.6 (2.0) | 1280 | 51.9 (0.4) | 596.5 | 2.1 |
| Micros | **9-13** | 1.6 (0.6) | 80 | 2.6 (0.5) | 29.9 | 2.7 |
| | **14-22** | 1.1 (0.2) | 55 | 1.6 (0.3) | 18.4 | 3.0 |
| | **23-38** | 1.0 (0.1) | 50 | 1.0 (0.1) | 11.5 | 4.4 |
| **Set autosómico** | | 62.1 (5.4) | 3105 | - | 1149.2 | 2.7 |

LR: longitud relativa. TR: tasa de recombinación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

En los mismos 138 núcleos en paquitene sobre los que fue realizado el recuento de focos totales también se realizó el recuento de focos en los primeros 8 macrocromosomas y en los microcromosomas agrupándolos en tres grupos (Tabla 4). Por otro lado, haciendo un análisis entre la longitud promedio y el número promedio de focos de MLH1 de los macrobivalentes y de los tres grupos de microbivalentes se observó una correlación lineal y positiva entre estas dos variables (Figura 8; $r$=0.99, P<0.0001). La fuerte relación lineal entre la longitud de los CSs y el número de focos de MLH1, demuestra que hay una proporcionalidad entre la longitud del CS y el número de eventos de recombinación, y por lo tanto, con la longitud genética.

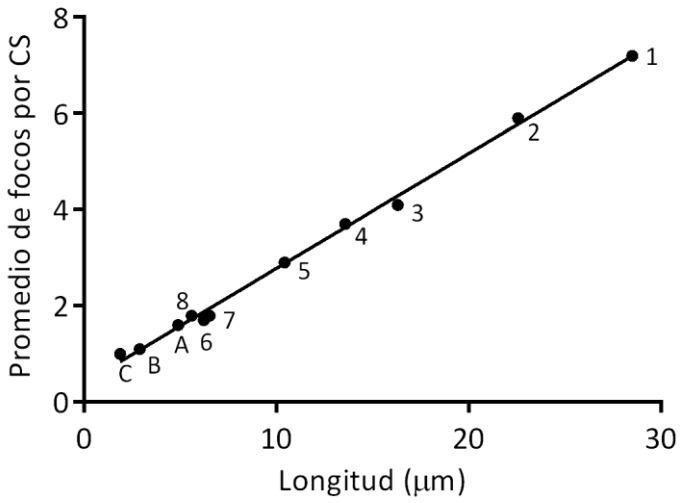


**Figura 8**: Relación entre los focos de MLH1 y la longitud de los CSs mayores en *G. domesticus*. Existe una correlación positiva entre la longitud del CS y el número promedio de focos observados en los macrobivalentes 1 a 8 y en los tres grupos de microbivalentes (análisis de la regresión, $r^2$=0.99; $y$ = 0.2388$x$ + 0.3878; correlación de Pearson, $r$=0.98, P<0.0001). A: microcromosomas 9-13. B: microcromosomas 14-22. C: microcromosomas 23-38.

Dado que cada foco es el precursor de un quiasma, y que cada quiasma es el equivalente a 50 cM, el recuento de focos totales promedio corresponde a una longitud total del mapa genético de 3105 cM. A partir de esta longitud total y del tamaño genómico estimado para la especie se obtiene una tasa de recombinación (TR) global de 2.7 cM/Mb (Tabla 4). Para establecer la TR de cada macrobivalente se combinaron los datos de la longitud genética en cM obtenida a partir del promedio de focos por CS con el tamaño en Mb de dichos bivalentes (Tabla 4). Un cálculo similar se realizó para los tres grupos de microbivalentes, observándose que la TR en los microcromosomas más pequeños (23 a 38) es 1.6 veces mayor

que la TR de global. Esto se debe a que cada microbivalente debe tener un CO obligatorio a pesar de su pequeño tamaño.

A partir del recuento de focos por bivalente, se construyeron histogramas que representan la distribución de los focos a lo largo de cada uno de los 8 bivalentes mayores identificados en el cariotipo de CSs (Figura 9).

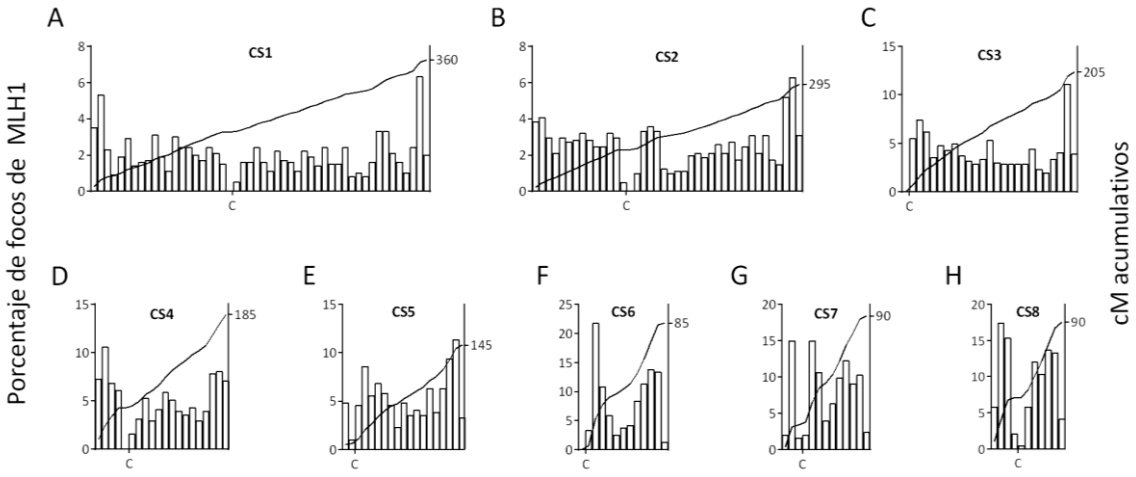


**Figura 9**: Distribución de los eventos de recombinación en los primeros 8 bivalentes autosómicos de *G. domesticus*. Para cada bivalente, el eje *x* representa la posición de los focos de MLH1 a lo largo del CS, con el brazo p hacia la izquierda y el q hacia la derecha. En el eje *y* de la izquierda se representa el porcentaje de focos de MLH1 por intervalo. En el eje *y* de la derecha se representan los cM acumulativos a lo largo de los intervalos. Cada intervalo representa 0.6 µm. La letra C señala la posición del centrómero. El valor al final de la curva representa la longitud total en cM de cada bivalente.

La distribución de los focos de MLH1 a lo largo de los macrobivalentes muestra diferencias entre los bivalentes bibraquiados y los bivalentes acrocéntricos. Los bivalentes bibraquiados tienen niveles máximos de recombinación en las regiones más distales, una menor cantidad de eventos de recombinación en la zona pericentromérica y una distribución bimodal o multimodal en los segmentos intersticiales de los brazos cromosómicos (Figura 9 A, B, D, G y H). En cambio, los bivalentes acrocéntricos muestran frecuencias elevadas de focos en las regiones teloméricas y subteloméricas, y también en las regiones cercanas al centrómero en el brazo largo (Figura 9 C, E y F). En los bivalentes acrocéntricos 3 y 6 (Figura 9 C y F) no se observaron focos en el brazo corto que está formado principalmente por heterocromatina (Stock y Bunch 1982; Schmid *et al.* 1989).

En algunos bivalentes se observaron algunas excepciones a este patrón general. Por ejemplo, en el CS2 (submetacéntrico) no se observa un aumento marcado del número de focos en los segmentos más distales del brazo corto y los eventos de recombinación se distribuyen de manera más homogénea que en el brazo corto que en el brazo largo. En el CS5 (acrocéntrico), el primer intervalo proximal al centrómero del brazo p presenta un escaso número de focos (Figura 9 E).

En cuanto a la distribución acumulativa de los cM a lo largo de los intervalos, cabe destacar que los bivalentes mayores presentan una distribución lineal mientras que en los bivalentes más pequeños, a partir del bivalente número 6, la curva se vuelve escalonada debido a la presencia de regiones con una disminución marcada de la frecuencia de focos.

## III.2. *Coturnix japonica*

La codorniz común, *C. japonica*, al igual que *G. domesticus* pertenece a la familia Phasianidae del orden Galliformes, y se estima que su divergencia del género *Gallus* se produjo hace aproximadamente unos 42 millones de años (www.timetree.org/, Hedges *et al.* 2015). Su número diploide es de 78 cromosomas y es posible identificar los seis primeros macrocromosomas de acuerdo a su longitud e IC en núcleos en paquitene y en metafase mitótica. El NF autosómico para la codorniz común es de 80 para el set completo y 16 para los primeros seis macrocromosomas.

### III.2.a. Determinación de la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene

De acuerdo a la morfología de los ejes meióticos durante la profase I meiótica se realizó el recuento de los estadios leptotene, cigotene, paquitene y diplotene directamente al microscopio de fluorescencia en preparaciones de embriones de 16 días de incubación (Día E16), de hembras de dos días post eclosión (Día +2), de cuatro (Día +4) y siete días post eclosión (Día +7). De esta manera se determinó que la máxima frecuencia de paquitenes se observa dos días luego de la eclosión (Figura 10).

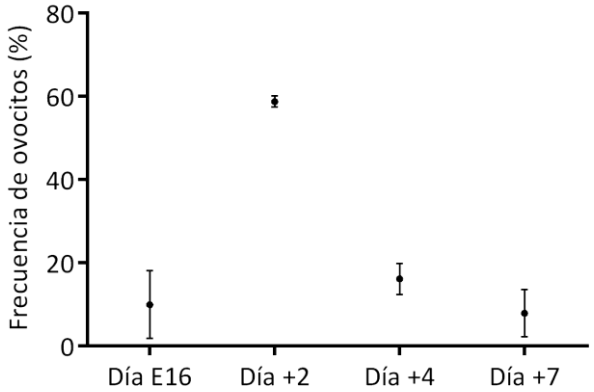


**Figura 10**: Frecuencia de ovocitos en paquitene en *C. japonica* antes y después de la eclosión. Se observa que la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene (58.7%) se produce a los dos días post-eclosión.

### III.2.b. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *C. japonica*

El cariotipo de los cromosomas mitóticos de esta especie se analizó a partir de 24 metafases teñidas con DAPI (Figura 11A). En la Tabla 5 se resumen los datos de las mediciones de las longitudes absolutas y relativas junto con el índice centromérico de los primeros seis pares de macrocromosomas y del cromosoma Z. En los dos pares cromosómicos mayores se pueden observar brazos cortos distinguibles (IC=0.31 y 0.43 respectivamente), mientras que en los cromosomas 3 a 6 el brazo p es muy pequeño y con frecuencia difícil de observar. El resto de los cromosomas del cariotipo (7 a 78) no pueden ordenarse por pares y son considerados microcromosomas. El cromosoma Z de la codorniz tiene un tamaño similar al cromosoma número 4 y presenta una morfología submetacéntrica (IC=0.44). El cromosoma W es del tamaño semejante al de un microcromosoma por lo cual no es posible identificarlo sin técnicas adicionales.

El cariotipo de CSs se confeccionó a partir de ovocitos y espermatocitos en paquitene luego de la de las mediciones de la inmunodetección de la proteína SMC3 y de proteínas centroméricas (Figura 11B). La longitud de todos los CSs del set autosómico se midió en 30 núcleos pertenecientes a los dos machos y 30 núcleos de las tres hembras. No se encontraron diferencias significativas en la longitud del set de CSs entre las hembras (ANOVA, F=0.01866, P=0.9815), ni entre los dos machos analizados (*Test* de Mann-Whitney, P>0.05); tampoco se encontraron diferencias entre sexos para la longitud del set (*Test* de Mann-Whitney, P>0.05). En las hembras la longitud promedio del set es de 186.5 µm y en los machos es de 202.1 µm. La longitud del set autosómico promedio para la especie es de 194.3 µm, de los cuales el 44.5% corresponde a los macrobivalentes 1 a 6.

Una característica particular de esta especie, es la presencia de microcromosomas bibraquiados (Calderón y Pigozzi 2006). En el presente trabajo se determinó que de los 32 microcromosomas, 27 son bibraquiados (Figura 10B). Esta diferencia con respecto a los microcromosomas del pollo podría deberse a la acumulación de heterocromatina en un brazo luego de la formación de múltiples neocentrómeros (Zlotina *et al.* 2012).

Las mediciones comparativas entre los cromosomas mitóticos y meióticos indican que los CSs mayores en la codorniz son de 3 a 5 veces más largos que sus cromosomas mitóticos correspondientes (Figura 11C), aunque sus longitudes relativas e ICs muestran una notable correspondencia (Figura 11D, Tabla 5).

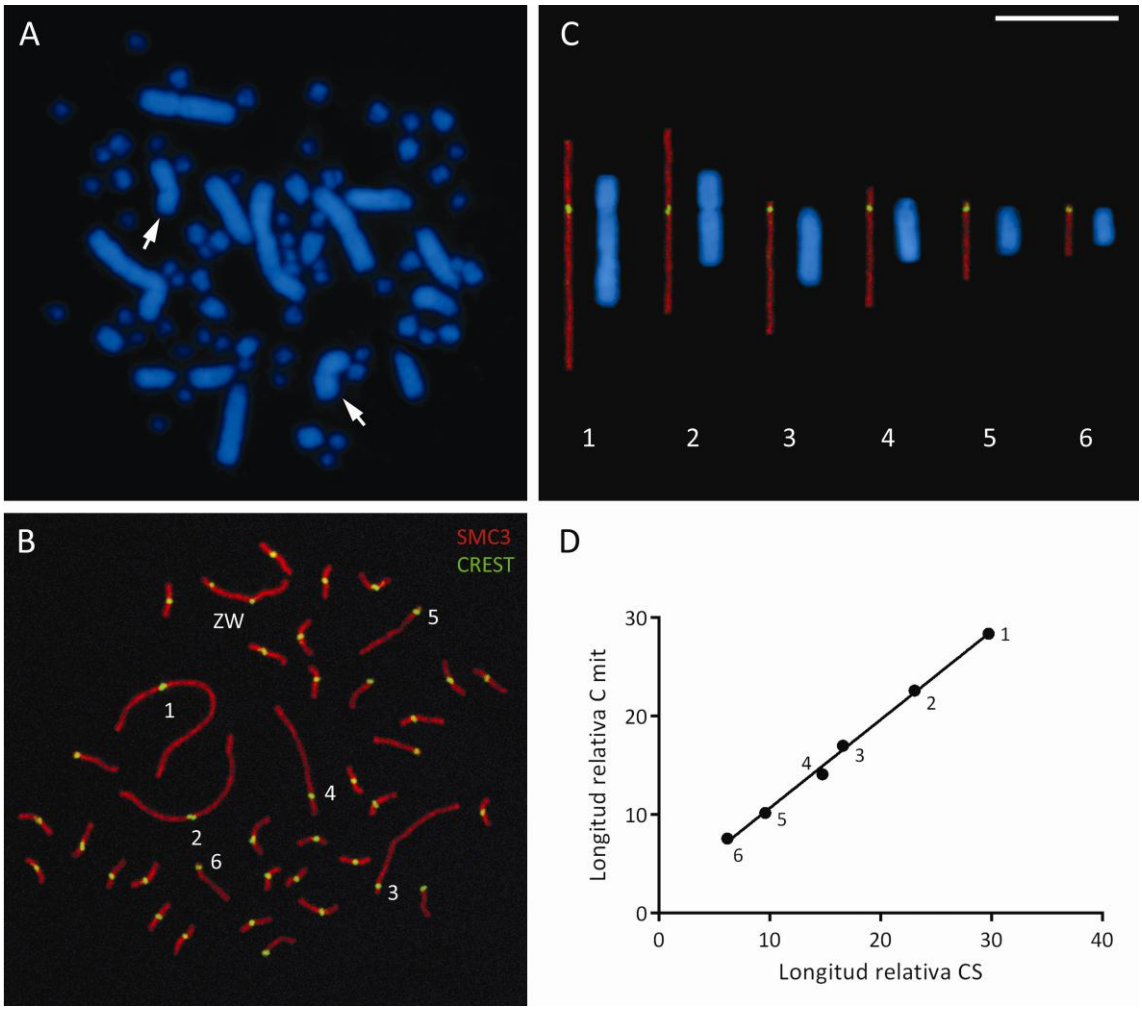


**Figura 11**: Comparación del cariotipo mitótico y meiótico de *C. japonica.* A) Metafase mitótica de un macho teñida con DAPI. Las flechas señalan a los dos cromosomas Z. B) Ovocito en paquitene que muestra el set completo de 38 bivalentes autosómicos y el par ZW. Los CSs están marcados con anti-SMC3 que reconoce los elementos laterales del CS, y los centrómeros con suero anticentromérico. Los números junto a las señales centroméricas indican los bivalentes 1 a 6. C) Cariograma comparativo de los CSs y de los cromosomas mitóticos. Se enumeran los pares 1 a 6 ordenados por tamaño decreciente. D) En el gráfico se puede observar la proporcionalidad entre la longitud relativa de los CSs y de los cromosomas mitóticos en esta especie (análisis de regresión lineal, $r^2$=0.99; $y$ = 0.8979$x$ + 1.685; correlación de Pearson, $r$=0.99, P<0.0001). Barra=10 µm.

**Tabla 5:** Longitud e índice centromérico promedio de los cromosomas mitóticos y de los CSs de *C. japonica*

| | Par | LA (µm) | | LR (%) | | IC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C Mit | CS | C Mit | CS | C Mit | CS |
| Macrocromosomas | 1 | 8.1 (2.1) | 26.4 (4.9) | 28.4 (2.2) | 29.8 (5.6) | 0.31 (0.04) | 0.29 (0.02) |
| | 2 | 6.5(1.6) | 20.5 (4.1) | 22.6 (1.6) | 23.0 (4.4) | 0.43 (0.03) | 0.43 (0.02) |
| | 3 | 4.8 (1.0) | 14.7 (2.7) | 17.0 (1.1) | 16.6 (3.0) | - | 0.03 (0.03) |
| | 4 | 4.0 (0.9) | 13.1 (2.2) | 14.1 (1.1) | 14.8 (2.5) | 0.06 (0.07) | 0.11 (0.05) |
| | 5 | 2.9 (0.5) | 8.5 (1.4) | 10.2 (1.3) | 9.6 (1.6) | - | 0.03 (0.04) |
| | 6 | 2.1 (0.4) | 5.5 (0.9) | 7.6 (1.6) | 6.2 (1.0) | - | 0.03 (0.04) |
| Micros | 7-13 | - | 4.3 (0.5) | - | - | - | - |
| | 14-22 | - | 3.6 (0.4) | - | - | - | - |
| | 23-38 | - | 2.9 (0.3) | - | - | - | - |
| Z | | 3.9 (0.7) | - | - | - | 0.44 (0.03) | - |
| Set autosómico | | - | 194.3 (7.8) | - | - | - | - |

LA: longitud absoluta. LR: longitud relativa. IC: índice centromérico. C Mit: cromosomas mitóticos. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. Metafases mitóticas N= 24. Núcleos en paquitene: N= 60.

### III.2.c. Análisis de la recombinación de *C. japonica*

#### III.2.c.i. Estabilidad de los focos de MLH1 durante el paquitene

Las proteínas involucradas en la recombinación meiótica se encuentran ampliamente conservadas en muchos organismos y se van agregando de manera secuencial en los sitios donde son resueltas las interacciones recombinacionales (revisado en Gerton y Hawley 2005). Este orden secuencial de los eventos puede dar lugar a la idea de que el recuento de focos de MLH1 subestima el número de los eventos de recombinación debido al carácter transitorio de la proteína MLH1 durante las etapas tardías de la profase. Para evaluar si los focos de MLH1 representan todos los eventos de *crossing over*, el número de número de quiasmas del bivalente 1 en espermatocitos en diacinesis/metafase I se comparó con el número de focos observados sobre el CS correspondiente durante el paquitene (Figura 12). Se observó una fuerte correspondencia en el número promedio de quiasmas (5.4±0.2, N=39) y de focos de MLH1 (5.3±1.1, N=161), sin diferencias significativas entre los promedios (*Test* de t, P>0.05). Incluso el rango de quiasmas (4 a 7) y de focos de MLH1 son muy similares (4 a 8). Estos resultados indican que los criterios utilizados para la seleccionar las células para los recuentos de focos de MLH1 evitan que se subestime el número de eventos de recombinación, aún cuando los focos de MLH1 tienen una presencia transitoria durante la profase I.

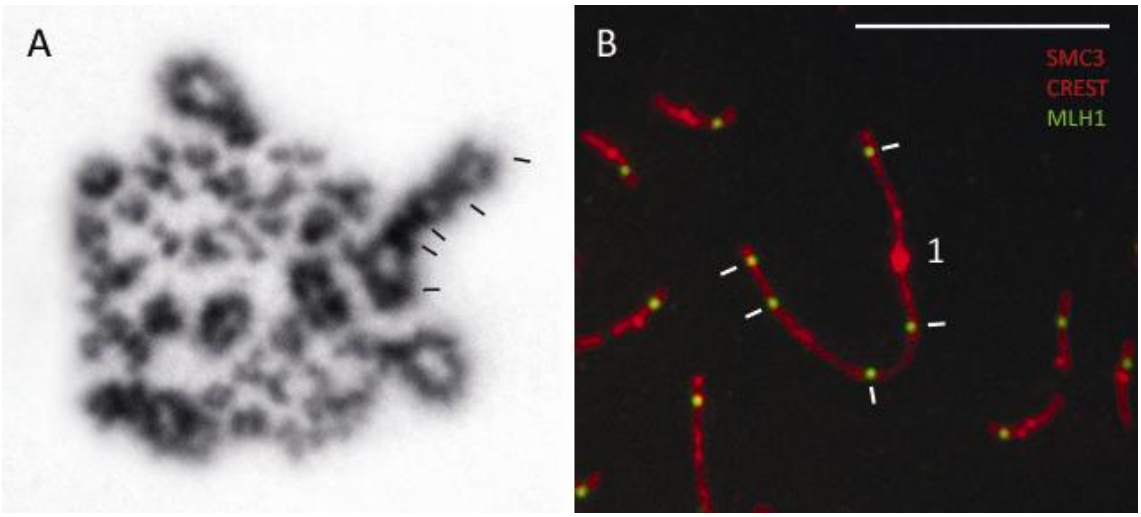


**Figura 12**: Comparación del número de quiasmas y el número de focos de MLH1 en espermatocitos de *C. japonica*. A) En el bivalente 1 se señalan con líneas cortas los cinco quiasmas que se observan en esta metafase. B) Detalle de un espermatocito en paquitene luego de la inmunodetección de la proteína SMC3, los centrómeros y de la proteína MLH1. En el CS1 hay cinco focos de MLH1 señalados con líneas cortas. Barra= 10µm.

### III.2.c.ii. Recuento de focos de MLH1 en machos y hembras de *C. japonica*

El recuento de focos se realizó en un total de 308 núcleos en paquitene: en 161 espermatocitos y 147 ovocitos (Figura 13, Tabla 6). En los machos, se contabilizaron en promedio 50.3 focos, con un rango de 45 a 57 focos (Figura 14A). En las hembras, se obtuvo en promedio 53.1 focos de MLH1, con un rango de 46 a 67 focos (Figura 14B). Para cada sexo se evaluó la posibilidad de diferencias interindividuales. No se encontraron diferencias significativas en el número promedio de focos entre los dos machos analizados (*Test* de t, $P>0.05$), ni entre las tres hembras analizadas (*Test* de Kruskal-Wallis, $P>0.05$). Cuando se evaluó la posibilidad de diferencias significativas entre sexos, se encontraron diferencias en el promedio de focos totales en espermatocitos y ovocitos (*Test* de Mann-Whitney, $P<0.0001$). El número promedio de focos de MLH1 para la especie es 51.6, de los cuales un 35.9% se encuentra en los primeros seis macrobivalentes. En los microcromosomas, que representan el 55.5% de la longitud total del set, se observó un foco de MLH1 en la mayoría de los casos y solamente 2.3% de los microcromosomas presentaron dos focos.

A partir del número promedio de focos totales se estimó una longitud del mapa genético de 2655 cM para las hembras y 2515 cM en los machos, con una longitud promedio de 2580 cM para la especie (Tabla 6).

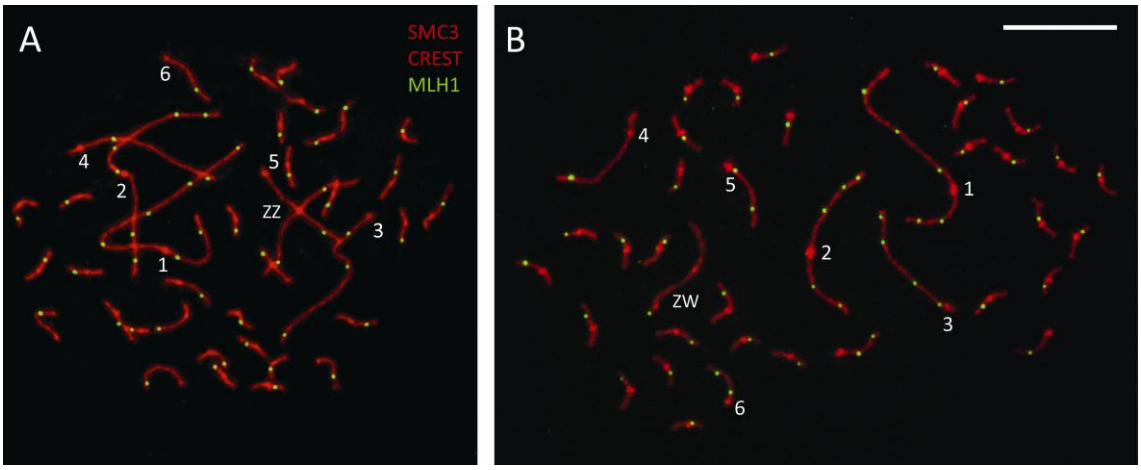


**Figura 13**: Inmunodetección de la proteína MLH1 en núcleos en paquitene de machos y hembras de *C. japonica*. Se puede observar a un espermatocito (A) y a un ovocito (B) de la codorniz común luego de la inmunomarcación de la proteína del eje de cohesinas SMC3, de los centrómeros y de MLH1. Se señalan los primeros seis macrobivalentes, el par sexual ZZ en el espermatocito y el par ZW en el ovocito. Barra=10 µm.

De manera similar a lo realizado en *G. domesticus* y como se explicó en Materiales y Métodos (Sección II.7.d) se estimó que el tamaño total del genoma autosómico de la codorniz común es de 1296.3Mb. Combinando los datos de la estimación de tamaño en Mb con la longitud genética en cM se calculó la TR global en 2.0 cM/Mb, así como también la TR de cada uno de los bivalentes autosómicos identificados y de cada uno de los grupos de microbivalentes (Tabla 6).

También se realizó el recuento de focos en los primeros seis macrobivalentes de machos y hembras (Tabla 6). Se observó que el número promedio de focos de MLH1 de los primeros cuatro bivalentes es similar al estimado a partir del recuento de quiasmas en los cromosomas plumulados (Rodionov y Chechik 2002; Schmid *et al.* 2005), con una diferencia de sólo un evento de recombinación.

Tanto en los machos como en las hembras, se observó una correlación lineal y positiva entre la longitud promedio de los CSs y el número promedio de focos de MLH1 de los macrobivalentes y de los microbivalentes (Figura 14 C y D. Machos: $r$=0.99, P<0.0001. Hembras: $r$=0.99, P<0.0001). Esta relación indica que la longitud de los CSs es un buen indicador de la cantidad de eventos de recombinación y por lo tanto de la longitud genética en esta especie.

**Tabla 6**: Promedio de focos de MLH1, longitud del mapa genético y tasas de recombinación en *C. japonica*

| | CS | N° de focos | | | Equivalente en cM | | | LR (%) | | | Longitud estimada (Mb) | | | TR (cM/Mb) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M | H | P | M | H | P | M | H | P | M | H | P | M | H | P |
| Macrocromosomas | **1** | 5.3 (1.0) | 5.5 (1.2) | 5.4 (1.1) | 265 | 275 | 270 | 14.3 (1.7) | 12.6 (2.5) | 13.5 (2.3) | 185.7 | 163.5 | 175.0 | 1.4 | 1.7 | 1.5 |
| | **2** | 4.2 (0.9) | 4.4 (1.0) | 4.3 (1.0) | 210 | 220 | 215 | 11.1 (1.5) | 9.6 (1.8) | 10.4 (1.8) | 144.0 | 124.3 | 134.8 | 1.5 | 1.8 | 1.6 |
| | **3** | 2.9 (0.7) | 3.0 (0.8) | 3.0 (0.8) | 145 | 150 | 150 | 7.8 (1.1) | 7.2 (1.4) | 7.5 (1.3) | 101.5 | 93.4 | 97.2 | 1.5 | 1.6 | 1.5 |
| | **4** | 2.4 (0.5) | 2.7 (0.7) | 2.5 (0.6) | 120 | 135 | 125 | 6.8 (0.9) | 6.7 (1.3) | 6.7 (1.1) | 87.6 | 86.6 | 87.4 | 1.5 | 1.6 | 1.4 |
| | **5** | 1.9 (0.4) | 1.9 (0.4) | 1.9 (0.4) | 95 | 95 | 95 | 4.5 (0.6) | 4.2 (0.8) | 4.4 (0.7) | 58.3 | 54.8 | 56.8 | 1.6 | 1.7 | 1.7 |
| | **6** | 1.1***** (0.4) | 1.6***** (0.5) | 1.4 (0.5) | 55 | 80 | 70 | 2.8 (0.4) | 2.8 (0.6) | 2.8 (0.5) | 36.5 | 36.7 | 36.7 | 2.2 | 2.2 | 1.9 |
| | **1-6** | 17.8 (1.5) | 19.2 (1.5) | 18.5 (1.5) | 890 | 960 | 925 | 47.3(0.1) | 43.1 (0.1) | 45.4 (0.1) | 613.5 | 558.7 | 588.0 | 1.5 | 1.7 | 1.6 |
| Micros | **7-13** | 1.0 (0.1) | 1.1 (0.4) | 1.1 (0.3) | 50 | 55 | 55 | 2.1 (0.2) | 2.3 (0.1) | 2.2 (0.2) | 27.2 | 29.8 | 28.5 | 1.8 | 1.8 | 1.9 |
| | **14-22** | 1.0 (0.1) | 1.0 (0.2) | 1.0 (0.1) | 50 | 50 | 50 | 1.7 (0.1) | 2.0 (0.1) | 1.8 (0.2) | 22.0 | 25.9 | 23.3 | 2.3 | 1.9 | 2.1 |
| | **23-38** | 1.0 (0.1) | 1.0 (0.1) | 1.0 (0.1) | 50 | 50 | 50 | 1.3 (0.1) | 1.6 (0.2) | 1.5 (0.2) | 16.9 | 25.7 | 19.4 | 3.0 | 2.4 | 2.6 |
| **Set autosómico** | | 50.3 (2.2) | 53.1 (3.8) | 51.6 (3.4) | 2565 | 2705 | 2630 | - | - | - | | 1296.3 | | 2.1 | 1.9 | 2.0 |

LR: longitud relativa. *****P<0.0001; t=8.582, las medias difieren estadísticamente. M: macho, H: hembra, P: promedio. TR: tasa de recombinación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

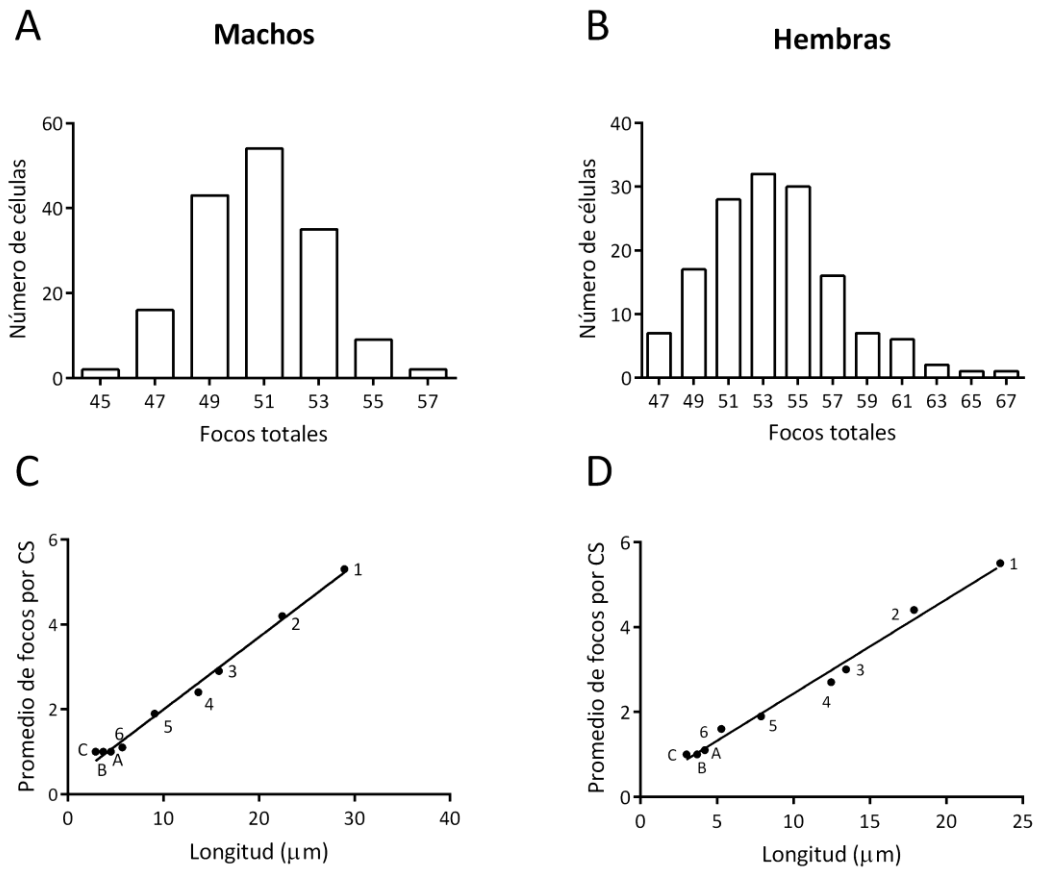


**Figura 14**: Distribución del número de focos totales y relación entre el número de focos y la longitud de los bivalentes de *C. japonica*. A y B: Diagramas de frecuencia que muestran el número de núcleos con n focos en ovocitos y espermatocitos. El número de focos totales más frecuente en los machos es 51 y en la hembra es 53. C y D: Se observa una correlación positiva entre la longitud del CS y el número promedio de focos en los macrobivalentes 1-6 y en los tres grupos de microbivalentes en machos (C) y en hembras (D) (machos: análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.1706$x$ + 0.2878; correlación de Pearson: $r$= 0.99, P<0.0001. Hembras: análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.2220$x$ + 0.2134; correlación de Pearson: $r$= 0.99, P<0.0001). A: microcromosomas 7-13. B: microcromosomas 14-22. C: microcromosomas 23-38.

A partir del recuento de focos en ovocitos y espermatocitos se construyeron las distribuciones de frecuencia para cada macrobivalente (1-6) en ambos sexos (Figura 15). Las posiciones de los focos en cada sexo se calcularon utilizando la longitud absoluta promedio obtenida para los ovocitos y los espermatocitos por separado.

La distribución de frecuencia de los focos de MLH1 permite observar dos características generales de la distribución del *crossing over* que no es posible observar por otros métodos. En primer lugar, se observa la existencia de patrones generales de la distribución del *crossing over* a lo largo de los brazos cromosómicos de cada macrobivalente analizado. En segundo lugar, es posible comparar la distribución de los eventos de *crossing over* entre sexos.

Este análisis muestra que en machos y en hembras se repite la distribución general observada en el pollo: los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos muestran picos más pronunciados de recombinación cerca de las regiones teloméricas y subteloméricas, una deficiencia de focos cerca del centrómero y una distribución bimodal o multimodal a lo largo de los brazos cromosómicos (Figura 15 A y B). En los brazos pequeños de los bivalentes acrocéntricos 3 a 6 no se observaron focos de MLH1 (Figura 15 C-F). El brazo corto de estos bivalentes es pequeño y principalmente formado por heterocromatina constitutiva (Stock y Bunch 1982; Schmid *et al.* 1989; de la Seña *et al.* 1991). En el brazo largo de los bivalentes acrocéntricos se observan picos de recombinación cercanos a los centrómeros similares a los observados en las regiones teloméricas. Esto contrasta con la baja frecuencia de focos en las regiones centroméricas de los bivalentes 1 y 2. Además, se observa en los histogramas de los bivalentes acrocéntricos del macho y de la hembra en la región intersticial en el brazo q una baja frecuencia de focos de MLH1.

En cuanto a la distribución acumulativa de los cM, se observa que en los bivalentes mayores hay una acumulación lineal a lo largo de los intervalos, indicando que, con excepción de pendientes más abruptas en las regiones con mayor frecuencia de COs en las regiones intersticiales la distribución de los focos es más homogénea (Figura 15 A y B). En los macrocromosomas más pequeños, sobre todo en la hembra (Figura 15 E y F), se observan "mesetas" en las regiones de los brazos largos donde la frecuencia de focos de MLH1 es menor.

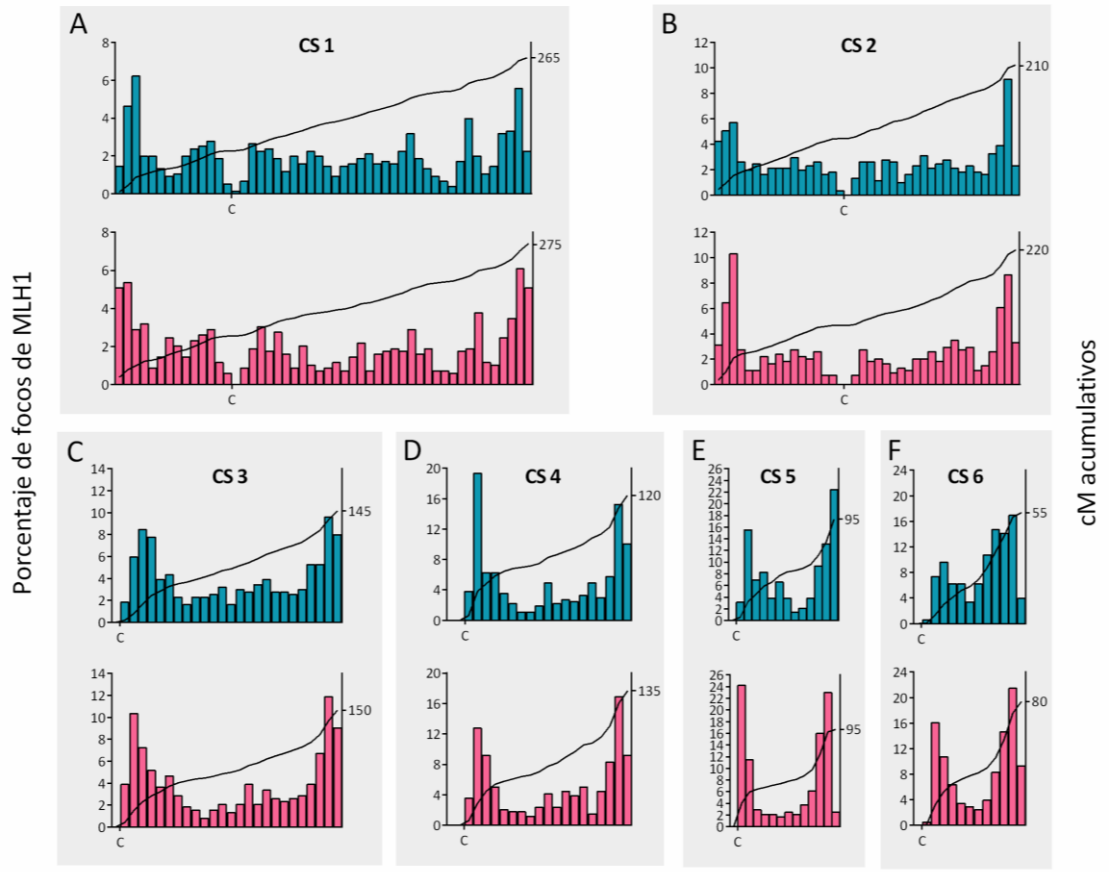


**Figura 15**: Distribución de la recombinación en *C. japonica*. Cada histograma representa la distribución de los focos de MLH1 a lo largo de los primeros 6 bivalentes en machos (arriba) y hembras (abajo). Para cada bivalente, el eje *x* indica las posiciones de los focos de MLH1 sobre los CSs, desde el brazo p (izquierda) al brazo q (derecha). El intervalo de cada histograma representa una fracción de la longitud total de cada CS, y es equivalente a 0.6 µm. La letra C señala la posición del centrómero. En el eje *y* izquierdo se representa el porcentaje de focos de MLH1 por intervalo y en el eje *y* derecho los cM acumulativos a lo largo de los intervalos. El valor al final de la curva representa la longitud total en cM de cada bivalente.

Las distribuciones acumulativas de los focos a lo largo de cada bivalente se compararon estadísticamente para determinar si existen diferencias entre sexos en cuanto a la distribución del *crossing over* (Figura 16). El análisis demuestra que sólo existen diferencias significativas a nivel de los bivalentes 5 y 6 (Figura 16). El número promedio de focos en el bivalente 5 no difiere significativamente entre machos y hembras, pero sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos en el número promedio de focos del bivalente 6 (*Test* de t, $P<0.0001$; Tabla 6). En las hembras, el bivalente 6 mostró dos focos en el 80% de los ovocitos analizados, mientras que en los machos sólo un 16% de los bivalentes tenían dos focos. Cuando este bivalente presenta un foco, éste se ubica hacia posiciones más distales en las hembras que en los machos, lo cual podría explicar la presencia de una pendiente más pronunciada en la curva acumulativa de focos en las hembras (Figura 16).

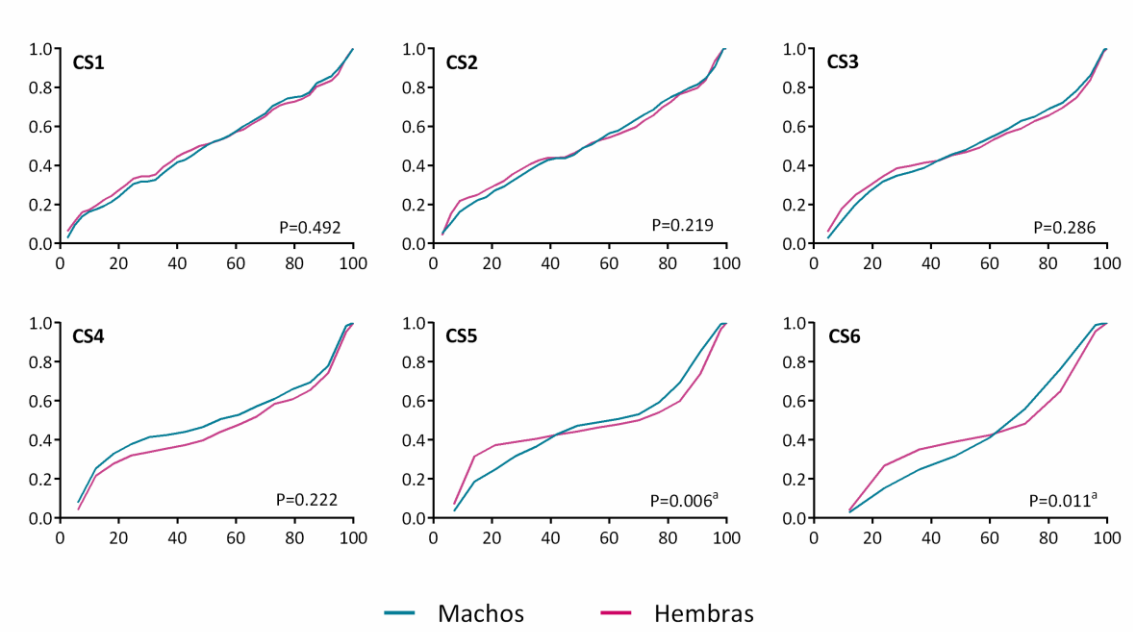


**Figura 16**: Frecuencia de focos acumulativa a lo largo de los primeros seis macrobivalentes. Se observan las frecuencias acumulativas de focos de MLH1 en función de la distancia al telómero del brazo corto del CS. La distancia se expresa como el porcentaje de CS en el que se localiza un foco. Para cada bivalente el valor P representa la probabilidad de que la posición de los focos de MLH1 en machos y hembras provenga de la misma distribución (*Test* de Kolmogorov-Smirnov).[a]: diferencias estadísticamente significativas.

## III.3. *Excalfactoria chinensis*

La codorniz china, *E. chinensis*, es una especie del orden Galliformes perteneciente a la familia Phasianidae. Esta especie es evolutivamente cercana a la codorniz común, con un tiempo de divergencia estimado entre ambas de 18.4 millones de años (www.timetree.org/, Hedges *et al.* 2015). Su número diploide es de 78 cromosomas, y con las técnicas utilizadas es posible identificar a los primeros seis pares cromosómicos tanto en metafases mitóticas como en núcleos en paquitene (Figura 17 A-D). El NF del set completo esta especie es 82 y es 18 para los primeros 6 macrocromosomas.

### III.3.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *E. chinensis*

En la codorniz china se analizaron 13 núcleos en metafase teñidos con DAPI obtenidos a partir de cultivos cortos de médula ósea de dos machos (ver Materiales y Métodos, Sección II.3.a). En núcleos como el que se ejemplifica en el Figura 17A, se pudieron reconocer a los primeros 6 pares cromosómicos y par sexual ZZ.

Como en la codorniz común, en la codorniz china los cromosomas 1 y 2 son submetacéntricos (IC= 0.41; IC= 0.36, respectivamente). Mientras que, los cromosomas 3 a 6 son acrocéntricos (Figura 17C). Debido al pequeño tamaño del brazo corto de los cromosomas 5 y 6 no se pudo determinar su IC a partir de las metafases analizadas. Al igual que en la codorniz común, en esta especie se consideran microcromosomas a los pares 7 a 78. El cromosoma Z es submetacéntrico (IC=0.42) y de mayor tamaño que el cromosoma 4 por lo cual ambos pares son claramente distinguibles entre sí. En la Tabla 7 se resumen las longitudes absolutas y relativas e índices centroméricos de los primeros 6 pares cromosómicos y del par sexual ZZ.

A partir de 158 espermatocitos como el que se ilustra en la Figura 17B, se determinó la longitud del set autosómico de CSs y de los bivalentes 1 a 6, además de sus respectivos IC (Tabla 7). En los bivalentes 5 y 6 la señal centromérica se observa en el extremo del CS por lo cual no se observa un brazo pequeño. La longitud promedio del set autosómico en esta especie es de 180.8 µm, de los cuales el 53% corresponde a los macrobivalentes 1 a 6. Como se analizaron dos individuos se evaluó la posibilidad de diferencias interindividuales en la longitud promedio del set autosómico. Por lo cual se realizó un *Test* de t encontrándose diferencias significativas entre los dos individuos ($P<0.0001$).

Se observó que los CSs de los bivalentes mayores son aproximadamente tres veces más largos que los cromosomas en mitosis pero la posición del centrómero observada en los microextendidos de CS es congruente con la observada en las metafases mitóticas (Figura 17C, Tabla 7). Al realizar el análisis de correlación entre las longitudes relativas de los cromosomas mitóticos y de los CSs se observa que presentan una excelente proporcionalidad (Figura 17D). Esta relación entre ambos tipos cromosómicos permite la identificación de un par cromosómico o grupo de ligamiento en el cariotipo meiótico.

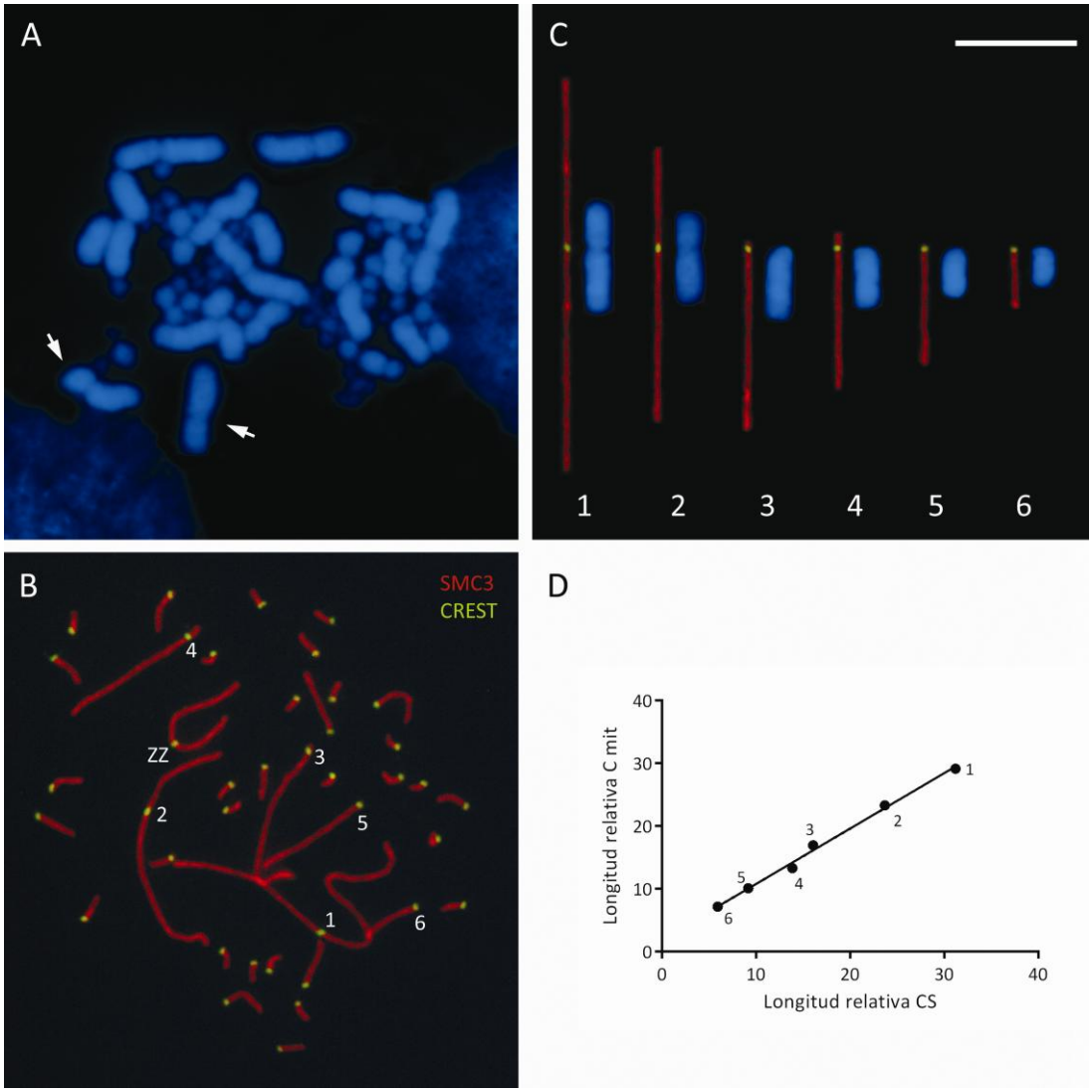


**Figura 17**: Comparación de los cariotipos mitótico y de CSs en *E. chinensis.* A) Metafase mitótica teñida con DAPI. Las flechas señalan a los cromosomas Z. B) Núcleo en paquitene en el cual se observan los 38 bivalentes autosómicos y el par ZZ. Se indican los bivalentes 1 a 6 y el par sexual. Los CSs están marcados con anti-SMC3 que reconoce los elementos laterales del CS, y los centrómeros con suero anticentromérico. C) Cariograma de los cromosomas mitóticos y de los CSs. Se numeran los pares 1 a 6 en orden de tamaño decreciente. D) En el gráfico se puede observar la proporcionalidad entre las longitudes relativas de macrocromosomas mitóticos y sus CSs. (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.8831$x$ + 1.950; correlación de Pearson: $r$=0.99, P<0.0001). Barra=10 µm.

**Tabla 7:** Longitud e índice centromérico promedio de los cromosomas mitóticos y de los CSs de *E. chinensis*

| | Par | LA (µm) | | LR (%) | | IC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C Mit | CS | C Mit | CS | C Mit | CS |
| Macrocromosomas | **1** | 8.5 (1.4) | 29.2 (3.7) | 29.1 (2.7) | 31.2 (2.6) | 0.41 (0.03) | 0.42 (0.04) |
| | **2** | 6.8 (0.8) | 22.2 (2.7) | 23.3 (1.7) | 23.7 (1.9) | 0.36 (0.02) | 0.35 (0.04) |
| | **3** | 5.0 (1.0) | 15.0 (1.8) | 17.0 (1.4) | 16.1 (1.7) | 0.01 (0.02) | 0.01 (0.01) |
| | **4** | 3.9 (0.6) | 13.0 (1.7) | 13.3 (0.7) | 13.9 (1.3) | 0.03 (0.04) | 0.10 (0.02) |
| | **5** | 3.0 (0.6) | 8.6 (1.0) | 10.1 (1.1) | 9.2 (0.8) | - | - |
| | **6** | 2.1 (0.7) | 5.6 (0.7) | 7.2 (2.0) | 5.9 (0.7) | - | - |
| Micros | **7-13** | - | 3.6 (0.8) | - | - | - | - |
| | **14-22** | - | 2.1 (0.4) | - | - | - | - |
| | **23-38** | - | 1.4 (0.2) | - | - | - | - |
| **Z** | | 4.4 (1.0) | 14.3 (1.8) | | - | 0.42 (0.04) | 0.39 (0.04) |
| **Set autosómico** | | - | 180.8 (10.8) | - | - | - | - |

LA: longitud absoluta. LR: longitud relativa. IC: índice centromérico. C Mit: cromosomas mitóticos. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. Metafases mitóticas N= 13. Espermatocitos en paquitene: N= 158.

### III.3.b. Análisis de la recombinación de *E. chinensis*

#### III.3.b.i. Estabilidad de los focos de MLH1 durante el paquitene

Dado el carácter transitorio de los focos de la proteína MLH1 durante las etapas tardías de la profase meiótica, se realizó, al igual que en la codorniz común, el recuento de quiasmas y de focos de MLH1 para descartar la posible subestimación de los eventos de recombinación. Se comparó el recuento de focos de MLH1 en el bivalente 1 (ver más adelante) con el número de quiasmas en el mismo bivalente durante el estadio diacinesis/metafase I (Figura 18). En esta especie también se observó una similitud entre el promedio de quiasmas (5.5±0.7, N=32) y de focos de MLH1 (5.8±1.2, N=158). No se encontraron diferencias significativas entre el número promedio de quiasmas y de focos (*Test* de t, P>0.05). Al igual que en la codorniz común, estos resultados le otorgan confiabilidad al recuento de focos de MLH1 como herramienta para la estimación del número de eventos de recombinación.

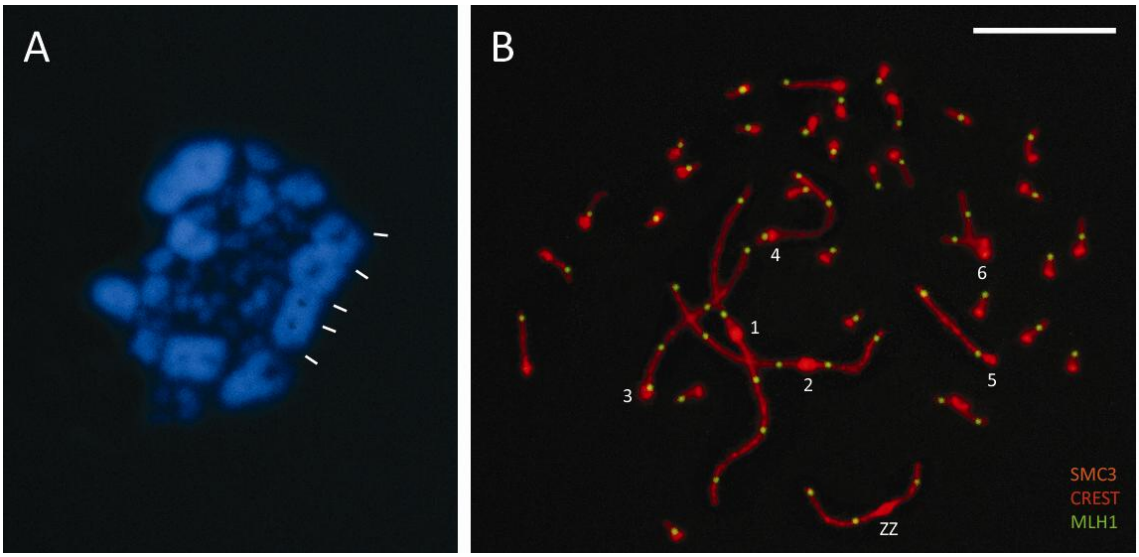


**Figura 18**: Espermatocito en metafase I y en paquitene de *E. chinensis*. A) En el bivalente de mayor tamaño se señalan con líneas cortas los cinco quiasmas que se observan. B) Se observan los CSs de los macro- y microbivalentes luego de la inmunolocalización de SMC3, los centrómeros y de la proteína MLH1. Se identifican los macrobivalentes 1 a 6 y el par sexual ZZ. Barra=10µm.

### III.3.b.ii. Recuento de focos de MLH1 en *E. chinensis*

En 158 núcleos en paquitene pertenecientes a los dos machos se realizó la inmunodetección de la proteína MLH1, de los complejos sinaptonémicos y de la proteínas centroméricas (Figura 18B) y el recuento de focos totales y por bivalente (Tabla 8). Se contabilizaron en promedio 52.5 focos, con un rango de 47 a 59 focos y siendo el número más frecuente de focos totales de 53 focos (Figura 19A). Se evaluó la posibilidad de diferencias entre ambos individuos, encontrándose diferencias significativas en el número promedio de focos totales (*Test* de t, $P<0.0001$). Un 37.8% del total de focos de MLH1 se observó en los macrobivalentes 1 a 6. En la mayoría de los microcromosomas se observó un único foco y solamente un 2.1% de los microbivalentes tenían dos focos de MLH1. La longitud genética total estimada para la codorniz china es de 2625 cM (Tabla 8).

**Tabla 8**: Promedio de focos de MLH1, longitud del mapa genético y tasas de recombinación en *E. chinensis*

| | CS | N° de focos | Equivalente en cM | LR (%) | Longitud estimada (Mb) | TR (cM/Mb) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Macrocromosomas | **1** | 5.8 (1.2) | 290 | 18.2 (1.9) | 235.4 | 1.2 |
| | **2** | 4.6 (1.0) | 230 | 13.8 (1.3) | 178.7 | 1.3 |
| | **3** | 3.1 (0.8) | 155 | 9.3 (1.0) | 121.0 | 1.3 |
| | **4** | 2.8 (0.8) | 140 | 8.1 (0.8) | 104.6 | 1.3 |
| | **5** | 2.1 (0.5) | 105 | 5.3 (0.5) | 69.2 | 1.5 |
| | **6** | 1.3 (0.5) | 65 | 3.5 (0.3) | 44.8 | 1.5 |
| | **1-6** | 19.7 (2.3) | 985 | 58.1 (0.1) | 753.7 | 1.3 |
| Micros | **7-13** | 1.1 (0.3) | 55 | 2.3 (0.5) | 29.4 | 1.9 |
| | **14-22** | 1.0 (0.1) | 50 | 1.3 (0.2) | 17.3 | 2.9 |
| | **23-38** | 1.0 (0.1) | 50 | 0.9 (0.1) | 11.4 | 4.4 |
| **Set autosómico** | | 52.5 (2.5) | 2625 | - | 1296.3 | 2.0 |

LR: longitud relativa. TR: tasa de recombinación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

A partir de esta longitud genética total y el tamaño del genoma se estimaron las tasas de recombinación global, de los 6 macrocromosomas y la de cada grupo de microcromosomas (Tabla 8). El tamaño genómico en Mb se calculó a partir del contenido de ADN de la codorniz común, porque el contenido de ADN no ha sido determinado aún para *E. chinensis*. La proximidad evolutiva de ambas especies, sus características cariotípicas conservadas y la conservación del tamaño genómico entre las Galliformes apoyan el uso de los datos de la codorniz común (Hedges *et al.* 2015; Gregory 2016). Por lo tanto, el tamaño del genoma estimado para la codorniz china es de 1379 Mb, y al restar el porcentaje correspondiente al cromosoma Z, el tamaño del genoma contenido en los autosomas es de 1296.3 Mb. La tasa de recombinación de la codorniz china es de 2.0 cM/Mb (Tabla 8).

El recuento de focos en los primeros seis macrocromosomas y en los microbivalentes se realizó sobre la misma muestra de 158 núcleos y se estimó la longitud genética de los macro- y microcromosomas a partir de este recuento (Tabla 8). Se observó una relación lineal y positiva entre el número promedio de focos y la longitud promedio de cada bivalente. Como en el pollo y la codorniz común, esta relación lineal entre la longitud del CS y el número de focos de MLH1 destaca la proporcionalidad entre la longitud de los CSs y el número de eventos de recombinación (Figura 19B).

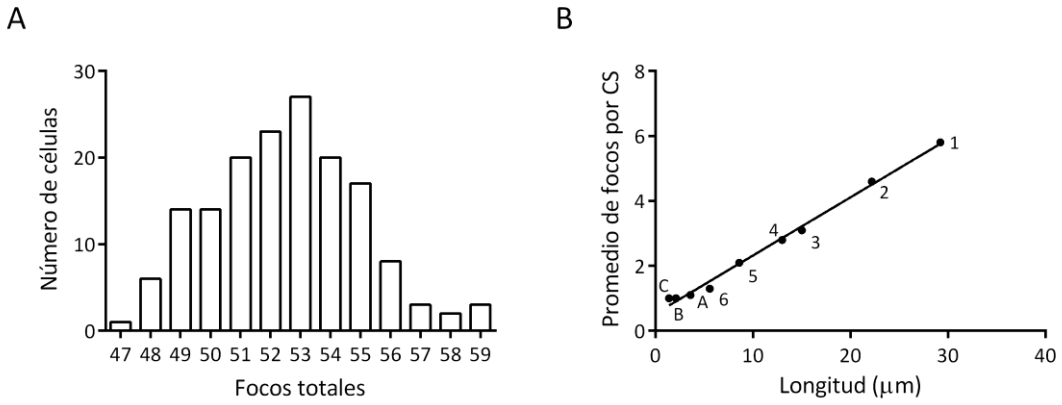


**Figura 19**: Distribución del número de focos totales y relación entre el número de focos y la longitud de los bivalentes de *E. chinensis*. A) En el gráfico se puede observar que el número de focos de MLH1 totales más frecuente es de 53 focos. B) Existe una correlación positiva entre la longitud del CS y el número promedio de focos en los macrobivalentes 1 a 6 y en los tres grupos de microbivalentes (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.1790$x$ + 0.4313; correlación de Spearman: $r$= 0.99, P<0.0001). A: microcromosomas 7-13. B: microcromosomas 14-22. C: microcromosomas 23-38.

Como en las otras especies analizadas, también se determinó la posición de los focos de la proteína MLH1 con respecto al centrómero en los bivalentes 1 a 6 para poder analizar la frecuencia y el patrón de distribución de los eventos de recombinación. Se analizó la frecuencia de distribución de los focos a lo largo de los CSs en intervalos de una longitud promedio de 0.6 µm (Figura 20).

En los bivalentes en paquitene de la codorniz china, se observaron los mismos dos patrones básicos que dependen de la morfología de los cromosomas. En los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos se observan picos máximos de recombinación en las regiones teloméricas y subteloméricas, una reducción en los focos de MLH1 en la zona cercana al centrómero y una distribución bimodal o multimodal a lo largo de los brazos cromosómicos (Figura 20 A y B). Por otro lado, en los bivalentes acrocéntricos se observan picos máximos de recombinación en la región pericentromérica del brazo q similares a los que se observan en las regiones teloméricas, lo cual difiere del patrón de recombinación observado en esta zona en los bivalentes bibraquiados (Figura 20 C, E y F). En el brazo p de los bivalentes acrocéntricos no se observaron eventos de recombinación. El brazo corto del cromosoma 3 es de pequeño tamaño y está formado principalmente por heterocromatina constitutiva (Stock y Bunch 1982; Shibusawa *et al.* 2004b). En el bivalente 4 se observan focos en el brazo corto y en el brazo largo el porcentaje de eventos de recombinación presenta un patrón similar al de los

cromosomas acrocéntricos pero la forma de la distribución es menos pronunciada (Figura 20D).

Al analizar la forma en que se van acumulando los cM a lo largo de los intervalos, se observa el mismo patrón que en la codorniz común. En los bivalentes 1 y 2 los cM se van acumulando de manera lineal a lo largo de los intervalos (Figura 20 A y B). Mientras que en los bivalentes de menor tamaño los cM se van acumulando de manera más escalonada (Figura 20 C-F). Esta tendencia se observa claramente en el bivalente 5, en la región del brazo largo donde la frecuencia de focos de MLH1 es menor la curva de los cM acumulativos presenta una "meseta" (Figura 20E).

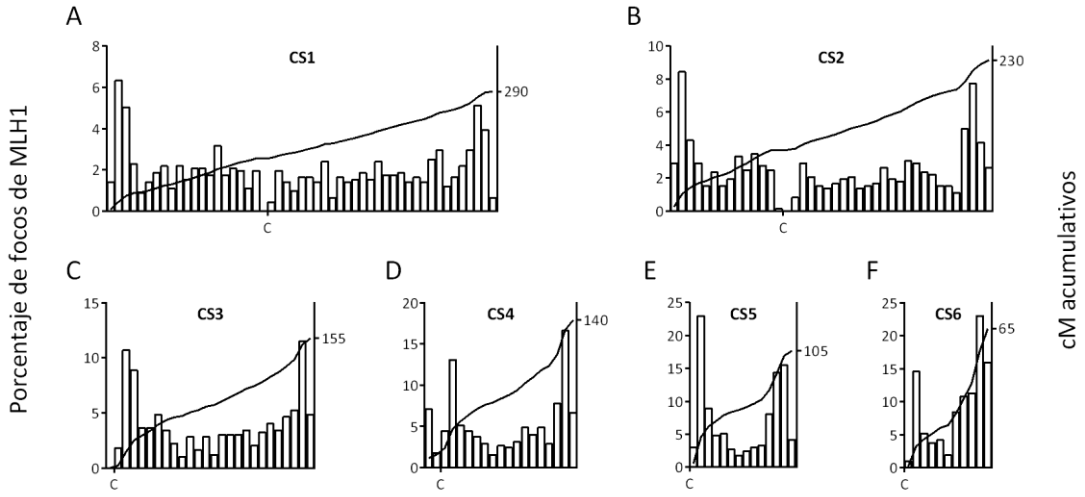


**Figura 20**: Distribución de los eventos de recombinación en *E. chinensis*. Cada histograma representa la distribución de los focos de MLH1 en los primeros 6 bivalentes autosómicos. En cada gráfico, el eje *x* representa la posición de los focos sobre el CS, con el brazo p hacia la izquierda y el q hacia la derecha. Cada intervalo representa una fracción de la longitud del CS y equivale a 0.6 µm en promedio. La letra C señala la posición del centrómero. En el eje *y* izquierdo se representa el porcentaje de focos de MLH1 por intervalo y en el eje *y* derecho los cM acumulativos a lo largo de los intervalos. El valor al final de la curva representa la longitud total en cM de cada bivalente.

## III.4. *Numida meleagris*

La gallina de Guinea, *N. meleagris*, es una especie perteneciente a la familia Numididae del orden Galliformes cuyo linaje se separó hace aproximadamente 46.5 millones de años del linaje del pollo (www.timetree.org/, Hedges *et al.* 2015). Su número diploide es de 76 cromosomas y es posible identificar por su longitud e índice centromérico a los primeros seis pares cromosómicos en las metafases mitóticas y en los núcleos en paquitene (Figura 21). El número de brazos o NF autosómico esta especie es de 84 para el set completo y 22 para los primeros seis pares de macrocromosomas.

### III.4.a. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *N. meleagris*

En la Figura 21A se observa un ejemplo de un núcleo en metafase mitótica teñido con DAPI de una hembra de la gallina de Guinea obtenido a partir de cultivos cortos de médula ósea (ver Materiales y Métodos, Sección II.3.a). En las 15 metafases analizadas de dos individuos, se confirmó el número diploide de 76 cromosomas ya descripto para la especie.

La gallina de Guinea presenta el mayor número de macrocromosomas bibraquiados entre las especies analizadas en la presente tesis (Tabla 9). Los cromosomas 1 y 2 presentan brazos largos y cortos bien distinguibles (IC=0.40 e IC=0.35 respectivamente). El cromosoma 3, como en el resto de las especies, es de morfología acrocéntrica, con un brazo p pequeño y a menudo indistinguible en las preparaciones de cromosomas mitóticos. Los cromosomas 4 y 6 presentan brazos p pequeños pero bien distinguibles (IC=0.25 e IC=0.18 respectivamente). En esta especie, el cromosoma 5 presenta una morfología metacéntrica y estudios de ZOO-FISH han demostrado que se originó a partir de la fusión de los cromosomas 6 y 7 ancestrales de los Galliformes (Shibusawa *et al.* 2002). Los cromosomas 7 a 76 fueron considerados conjuntamente como microcromosomas y son todos de morfología acrocéntrica. El cromosoma Z es submetacéntrico (IC=0.40) y es el quinto cromosoma según su longitud. El cromosoma W es acrocéntrico y de un tamaño similar a un microcromosoma por lo cual es difícil su identificación en las metafases mitóticas sin realizar técnicas adicionales.

En los microextendidos de CS se analizó el cariotipo meiótico de la especie. En ovocitos en paquitene de las dos hembras, como el que se ejemplifica en la Figura 21B, se observaron los 37 bivalentes autosómicos y el par ZW. A partir de 133 ovocitos seleccionados se obtuvo la longitud promedio del set autosómico y las longitudes promedio e índices centroméricos de los 6 bivalentes mayores (Tabla 9). La longitud del set autosómico obtenida

para la gallina de Guinea es 177.0 µm, de los cuales el 51.2% corresponde a los macrobivalentes 1 a 6, sin diferencias significativas entre las dos hembras analizadas (*Test* de Mann-Whitney, P>0.05).

La medición de los primeros seis pares cromosómicos en las metafases mitóticas y en los extendidos de CS mostró que los CSs de la gallina de Guinea son dos a tres veces más largos que sus cromosomas mitóticos correspondientes, pero la señal centromérica observada en los CSs es la esperada según el IC obtenido en las mediciones del cariotipo mitótico (Figura 21C, Tabla 9). A pesar de esta diferencia en la longitud absoluta, la longitud relativa de cada CS medido en los ovocitos en paquitene muestra una excelente correlación y proporcionalidad con la longitud relativa de los cromosomas mitóticos en metafase (Figura 21D; r=0.99, P<0.0001). Esta concordancia entre los cromosomas mitóticos y los CSs, hace posible la identificación de un par cromosómico en el cariotipo de CSs.

**Tabla 9**: Longitud e índice centromérico promedio de los cromosomas mitóticos y de los CSs de *N. meleagris*

| | Par | LA (µm) | | LR (%) | | IC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C Mit | CS | C Mit | CS | C Mit | CS |
| Macrocromosomas | **1** | 9.3 (1.6) | 24.6 (2.2) | 27.1 (2.0) | 27.1 (1.3) | 0.40 (0.02) | 0.39 (0.02) |
| | **2** | 7.6 (1.3) | 19.8 (1.7) | 21.9 (1.1) | 21.8 (1.0) | 0.35 (0.02) | 0.35 (0.02) |
| | **3** | 5.6 (0.9) | 14.0 (1.0) | 16.4 (1.6) | 15.4 (0.4) | - | 0.03 (0.02) |
| | **4** | 5.1 (0.9) | 13.4 (1.0) | 14.9 (1.2) | 14.8 (0.7) | 0.25 (0.05) | 0.28 (0.02) |
| | **5** | 3.7 (0.7) | 9.9 (0.8) | 10.8(1.1) | 10.9 (0.5) | 0.47 (0.03) | 0.48 (0.03) |
| | **6** | 3.1 (0.6) | 8.9 (0.7) | 8.9 (1.1) | 9.9 (0.5) | 0.18 (0.03) | 0.16 (0.03) |
| Micros | **7-13** | - | 4.1 (0.6) | - | - | - | - |
| | **14-22** | - | 3.0 (0.4) | - | - | - | - |
| | **23-37** | - | 1.1 (0.3) | - | - | - | - |
| **Z** | | 4.4 (0.9) | - | - | - | 0.40 (0.05) | - |
| **Set autosómico** | | - | 177.0 (10.7) | - | - | - | - |

LA: longitud absoluta. LR: longitud relativa. IC: índice centromérico. C Mit: cromosomas mitóticos. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. Metafases mitóticas N= 15. Ovocitos en paquitene: N= 133.

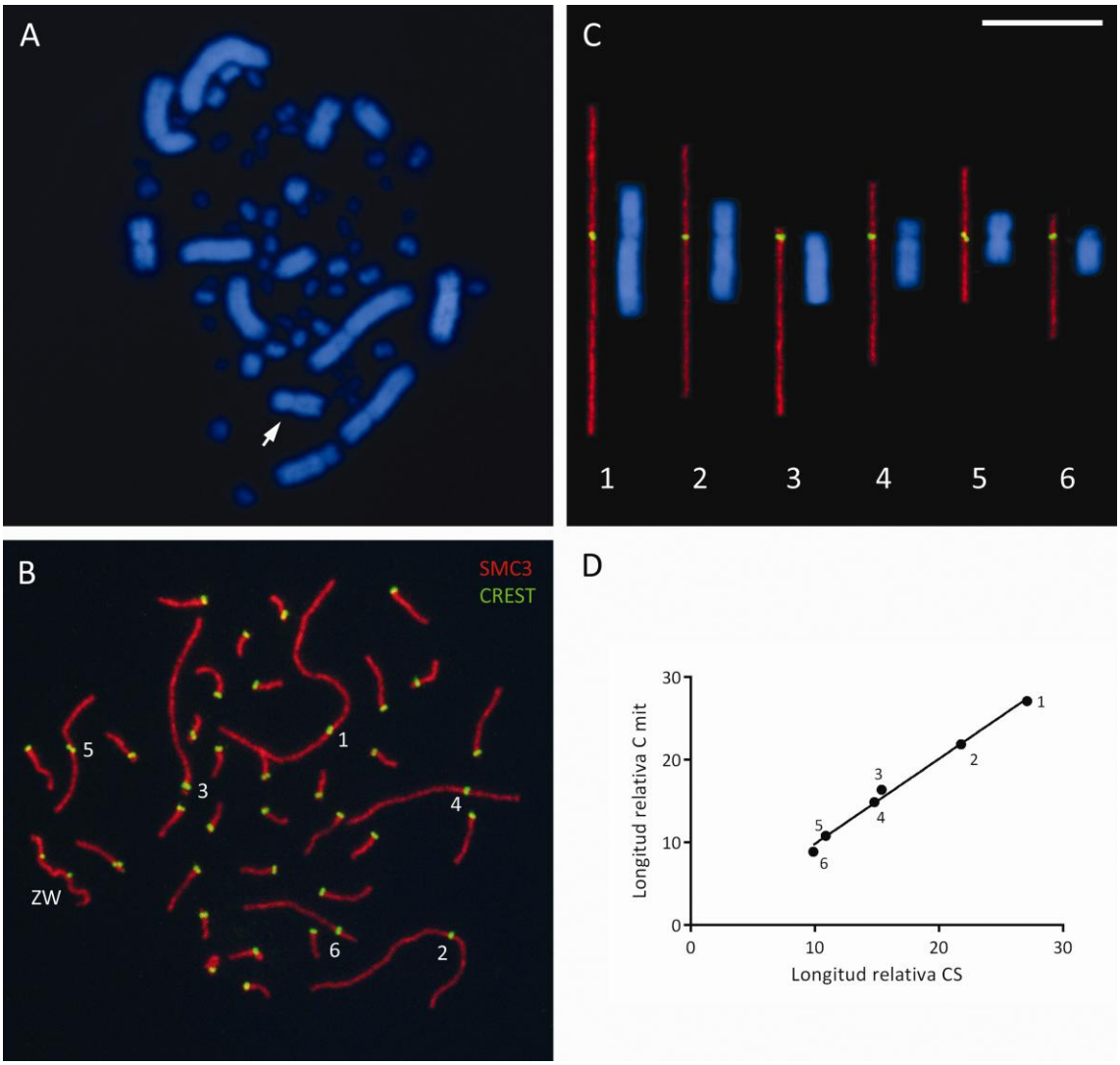


**Figura 21**: Comparación del cariotipo mitótico y meiótico de *N. meleagris.* A) Núcleo en metafase teñido con DAPI. Se señala con una flecha el cromosoma Z. B) Ovocito en paquitene. Se pueden observar los 37 bivalentes autosómicos y el par ZW. Se numeran los bivalentes 1 a 6 y se señala el par sexual ZW. Los CSs están marcados con anti-SMC3 que reconoce los elementos laterales del CS, y los centrómeros con suero anticentromérico. C) Cariograma comparativo de los CSs y de los cromosomas mitóticos. Los cromosomas 1 a 6 y sus CSs están ordenados por tamaño decreciente. D) En el gráfico se puede observar la proporcionalidad entre la longitud relativa de los CSs y de los cromosomas mitóticos en esta especie (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 1.029$x$ - 0.4695; correlación de Pearson: $r$=0.99, P<0.0001). Barra=10 µm.

### III.4.b. Análisis de la recombinación de *N. meleagris*

Se analizaron un total de 133 imágenes de núcleos en paquitene sobre los cuales se realizó la inmunodetección de los CSs, de proteínas centroméricas y de la proteína MLH1 (Figura 22). A partir de estas imágenes se realizó el recuento de focos totales en dos hembras, excluyendo al único evento de recombinación del par sexual ZW (Tabla 10). Se contabilizaron en promedio 44.4 focos en el set autosómico en un total de 4921 bivalentes, con un rango de 41 a 50 focos y siendo el número de focos más frecuente de 44 focos (Figura 23A). Un 27% del total de focos de MLH1 se produce en los primeros seis macrobivalentes. En la mayoría de los microbivalentes se observó un único foco de MLH1, mientras que en un 2.2% se observaron dos focos. A partir del número promedio de focos totales se estimó que la longitud del mapa genético de la gallina de Guinea es 2220 cM (Tabla 10). También se evaluó la posibilidad de diferencias interindividuales entre las dos hembras analizadas, pero no se encontraron diferencias significativas para el número promedio de focos de MLH1 (*Test* de t, P>0.05).

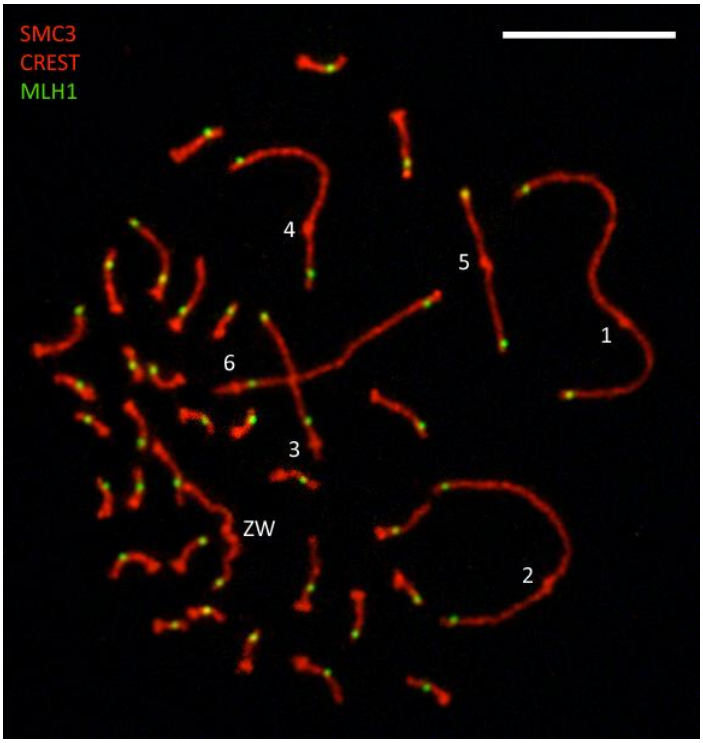


**Figura 22**: Ovocito en paquitene de *N. meleagris*. Se observan a los CSs de los macro- y microbivalentes luego de la inmunolocalización de SMC3, los centrómeros y la proteína MLH1. Se identifican los macrobivalentes 1 a 6 y el par sexual ZW. Barra=10µm.

A partir de la longitud genética obtenida y el tamaño del genoma se estimó la tasa de recombinación total, la de cada uno de los 6 macrocromosomas y la de los tres grupos de microcromosomas (Tabla 10). En la gallina de Guinea el tamaño del genoma haploide es de 1212.7 Mb, estimado a partir del contenido genómico de la especie (Gregory 2016). Restando el porcentaje que corresponde al cromosoma Z, el tamaño del genoma contenido en los autosomas de la especie es de 1140.0 Mb. La tasa de recombinación global estimada para la gallina de Guinea es de 1.9 cM/Mb (Tabla 10).

Una vez que se determinó el número promedio de focos totales, se realizó el recuento en los 6 primeros macrobivalentes y en los microcromosomas dividiéndolos en los tres grupos anteriormente mencionados (Tabla 10). A partir del recuento de focos por bivalente se estimó la longitud genética de los primeros seis macrocromosomas y de los microcromosomas (Tabla 10).

**Tabla 10**: Promedio de focos de MLH1, longitud del mapa genético y tasas de recombinación en *N. meleagris*

| CS | | N° focos | Equivalente en cM | LR (%) | Longitud estimada (Mb) | TR (cM/Mb) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Macrocromosomas | **1** | 2.3 (0.6) | 115 | 13.9 (0.8) | 158.2 | 0.7 |
| | **2** | 2.2 (0.5) | 110 | 11.2 (0.6) | 127.2 | 0.9 |
| | **3** | 2.0 (0.4) | 100 | 7.9 (0.3) | 90.1 | 1.1 |
| | **4** | 2.0 (0.3) | 100 | 7.6 (0.4) | 86.6 | 1.2 |
| | **5** | 1.9 (0.3) | 95 | 5.6 (0.3) | 63.8 | 1.5 |
| | **6** | 1.5 (0.3) | 75 | 5.1 (0.3) | 57.6 | 1.3 |
| | **1-6** | 11.9 (0.3) | 595 | 51.2 (0.1) | 583.5 | 1.0 |
| Micros | **7-13** | 1.1 (0.3) | 55 | 2.4 (0.3) | 27.2 | 2.0 |
| | **14-22** | 1.0 (0.1) | 50 | 1.7 (0.2) | 19.7 | 2.5 |
| | **23-37** | 1.0 (0.1) | 50 | 1.2 (0.1) | 13.1 | 3.8 |
| **Set autosómico** | | 44.4 (1.6) | 2220 | - | 1140.0 | 1.9 |

LR: longitud relativa. TR: tasa de recombinación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

En esta especie, como en las especies analizadas previamente, también se observó una relación lineal y positiva entre el número promedio de focos por bivalente y su longitud absoluta (Figura 23B), es decir que a mayor longitud de los bivalentes se observan un mayor número de eventos de recombinación recíproca.

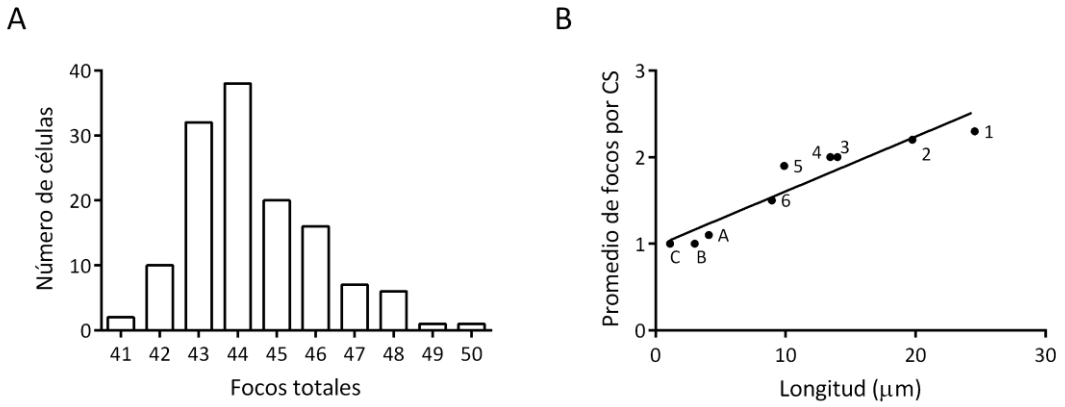


**Figura 23**: Distribución del número de focos totales y relación entre el número de focos y la longitud de los bivalentes de *N. meleagris*. A) En gráfico de frecuencias se puede observar que el número de focos de MLH1 totales más frecuente es de 44 focos. B) Existe una correlación positiva entre la longitud del CS y el número promedio de focos en los macrobivalentes 1 a 6 y en los tres grupos de microbivalentes (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.80; $y$ = 0.06319$x$ + 0.9729; correlación de Pearson: $r$= 0.94, P=0.0001). A: microcromosomas 7-13. B: microcromosomas 14-22. C: microcromosomas 23-37.

Al realizar el recuento de focos por bivalente también se registró la posición de los mismos con respecto al centrómero con el fin de construir los histogramas de que representan la distribución de los focos a lo largo de los CSs 1 a 6 (Figura 24).

En esta especie la distribución de los focos de MLH1 en los macrobivalentes se aparta de lo observado en las demás especies analizadas. En los bivalentes bibraquiados de la gallina de Guinea se observa una localización extrema de los eventos de recombinación recíproca hacia las regiones teloméricas y subteloméricas de los brazos p y q, mientras que la zona intersticial incluyendo los intervalos pericentroméricos muestra una disminución notoria del número de focos. Por ejemplo, en el bivalente 1 la mayoría de los focos (78%) se localizan en el 16% de la longitud del CS, correspondientes a las regiones teloméricas y subteloméricas (Figura 24A).

El número de focos en cada intervalo fue convertido a valores de distancia genética (cM) y luego se sumaron los valores de intervalos adyacentes para obtener los cM acumulativos para cada bivalente. Debido a la particular distribución de los focos de MLH1, la frecuencia acumulativa de cM a lo largo de los bivalentes metacéntricos muestra una pendiente abrupta en los intervalos del extremo del brazo p, luego un gran *plateau* y finalmente otra pendiente marcada hacia el telómero del brazo q (Figura 24 A, B, D-F). En el macrobivalente 3 que es el único macrobivalente acrocéntrico, sólo se observaron focos en el brazo q, también distribuidos de manera polarizada. Este patrón de distribución es semejante al patrón observado en el bivalente 3 de las demás especies, excepto por la marcada

disminución de los eventos de recombinación en la zona intersticial (Figura 24C). La distribución de los eventos de recombinación en este bivalentes también se ve reflejada en la forma en que se acumulan los cM a lo largo de los intervalos. En la región proximal del brazo q se observa un rápido incremento de los cM, luego un *plateau* en la región intersticial y como en los bivalentes metacéntricos, un pico en la región distal de este mismo brazo. En el brazo largo del sexto bivalente se puede observar que hay una distribución bimodal de los focos de MLH1, con un pico cerca del centrómero y en los intervalos cercanos al telómero (Figura 24F).

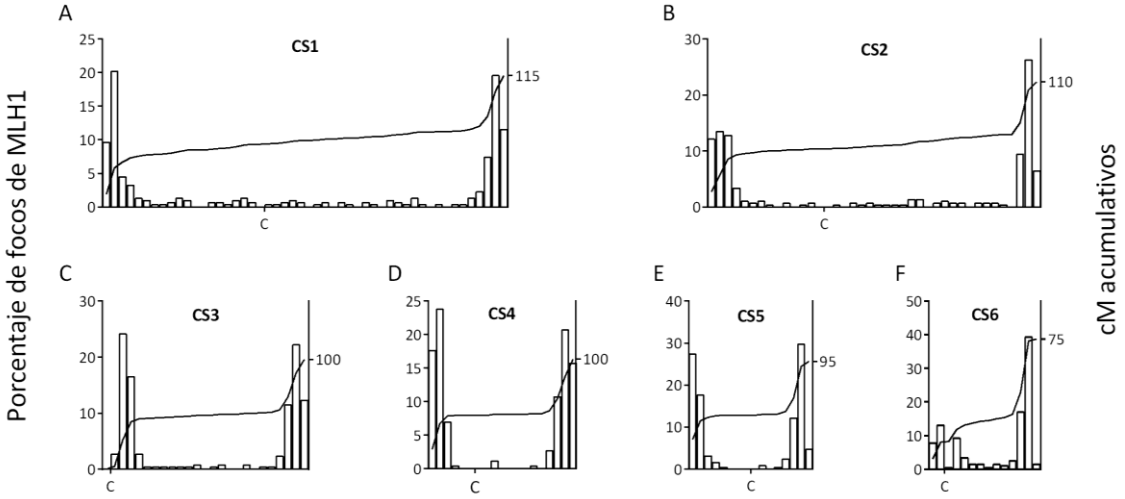


**Figura 24**: Distribución de los eventos de recombinación en *N. meleagris*. Cada histograma representa la distribución de los focos de MLH1 en los primeros 6 bivalentes autosómicos. En cada histograma, el eje *x* representa la posición de los focos sobre el CS, con el brazo p hacia la izquierda y el q hacia la derecha. Cada intervalo representa una fracción de la longitud del CS y equivale en promedio a 0.6 µm. La letra C señala la posición del centrómero. En el eje *y* izquierdo se representa el porcentaje de focos de MLH1 por intervalo y en el eje *y* derecho los cM acumulativos a lo largo de los intervalos. El valor al final de la curva representa la longitud total en cM de cada bivalente.

Finalmente, se analizó como se distribuyen los eventos de recombinación en un bivalente bibraquiado y en un bivalente acrocéntrico, el CS1 y 3 respectivamente, cuando se observaron de 1 a 4 focos de MLH1 (Figura 25). En el bivalente 1 se observaron de 1 a 4 focos, mientras que en bivalente 3 se observaron de 1 a 3 focos. Se pudo observar que los COs se localizan preferencialmente en las regiones subteloméricas de los brazos cromosómicos independientemente del número de focos que se observen cada bivalente. En los bivalentes bibraquiados con un único foco, éste se ubica generalmente en los intervalos cercanos al telómero de uno de los brazos. Cuando se observaron 2 focos, la distribución es bimodal entre

los 4 o 5 intervalos cercanos al telómero cada brazo (aproximadamente 2.4-3 µm del CS) (Figura 25 A y B). En los bivalentes acrocéntricos con 1 o 2 focos, éstos se ubican en los 4 intervalos próximos al telómero y/o al centrómero (2.4 µm) (Figura 25 C y D). En ambos tipos morfológicos, cuando se observan más de 2 focos, los COs adicionales se distribuyen en la región intersticial de los bivalentes. A partir de este análisis fue posible determinar las regiones preferenciales en las que se localizan los eventos de recombinación en relación al número de eventos totales de *crossing over*.

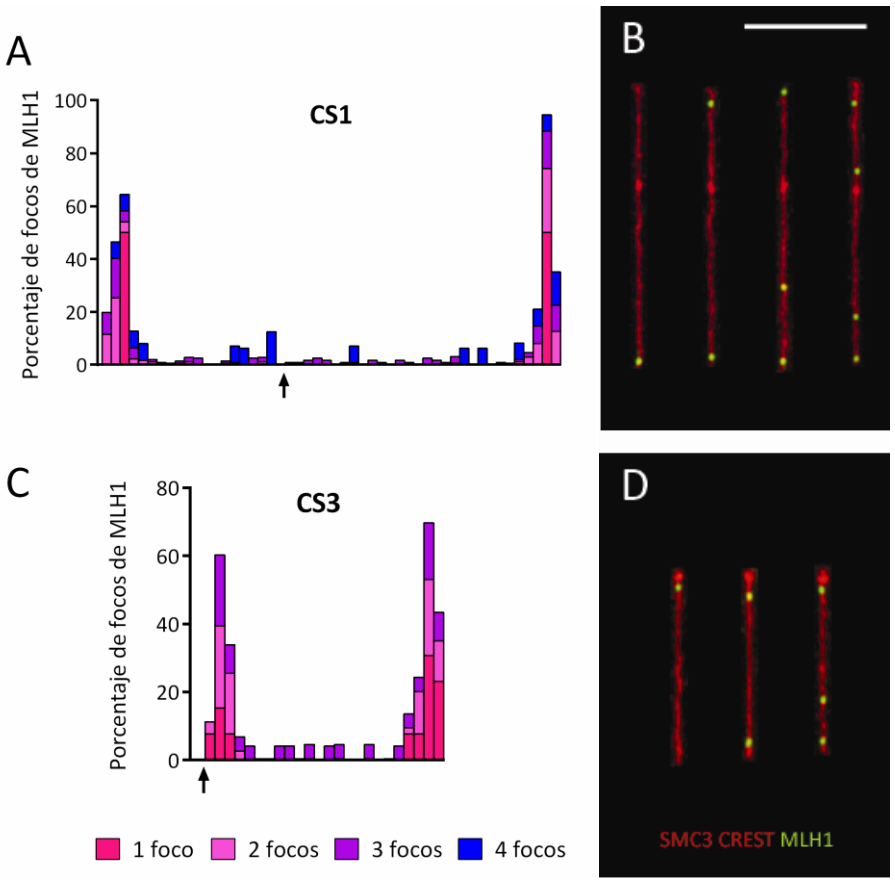


**Figura 25:** Distribución de los eventos de recombinación en un bivalente metacéntrico y uno acrocéntrico de *N. meleagris*. A y C: Los histogramas son semejantes a los presentados para cada uno de los macrocromosomas excepto que se destaca la distribución de los COs cuando en cada bivalente se observaron de 1 a 4 focos de MLH1 representados con un color diferente. El eje *x* representa la longitud del CS dividido en intervalos de aproximadamente 0.6 µm y el eje *y* el porcentaje de focos en cada intervalo. La altura de cada barra representa el porcentaje de focos acumulativo cuando en cada intervalo se observan de 1 a 4 focos. Los bivalentes se orientan con el brazo p a la izquierda y el brazo q hacia la derecha. Se señala con una flecha la posición del centrómero. B y D: Inmunodetección de MLH1, SMC3 y de proteínas centroméricas en los bivalentes 1 y 3. Se muestran ejemplos de CSs con 1 a 4 focos, que fueron linearizados digitalmente.

## III.5. *Anas platyrhynchos*

El pato doméstico, *A. platyrhynchos*, pertenece a la familia Anatidae del orden Anseriformes, que se separó de los Galliformes hace 70-80 millones de años (www.timetree.org/, Hedges *et al.* 2015). En esta especie el número diploide es de 80 cromosomas y es posible identificar los seis primeros pares de macrocromosomas de acuerdo a su longitud e IC tanto en los núcleos en el estadio de metafase mitótica como en extendidos de CS. El NF del pato doméstico es 82 para el set autosómico completo y 16 para los primeros seis pares de macrocromosomas.

### III.5.a. Determinación de la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene

De acuerdo a la morfología de los ejes meióticos durante la profase I meiótica se realizó el recuento de los estadios leptotene, cigotene, paquitene y diplotene directamente al microscopio de fluorescencia en preparaciones de embriones de 25 días de incubación (E25), de hembras de un día post eclosión (día +1) y siete días post eclosión (Día +7). Este análisis determinó que la máxima frecuencia de paquitenes se observa dos días antes de la eclosión (Figura 26).

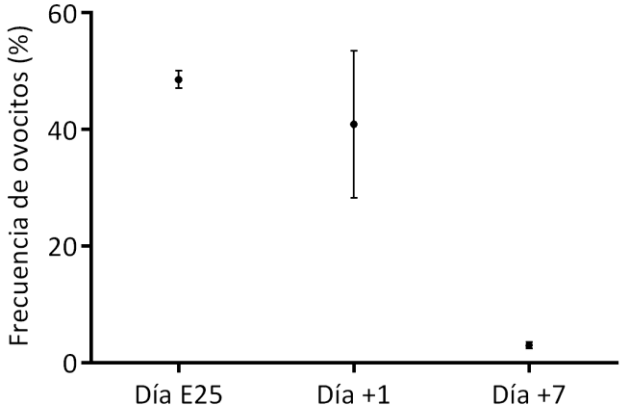


**Figura 26**: Frecuencia de ovocitos en paquitene en *A. platyrhynchos* según la edad. En el gráfico se observa que la máxima frecuencia de ovocitos en paquitene (47.2%) se produce 48 horas antes de la eclosión (E25).

### III.5.b. Comparación de los cariotipos mitótico y meiótico (CSs) en *A. platyrhynchos*

El cariotipo mitótico se analizó a partir de metafases obtenidas mediante cultivos cortos de médula ósea de los individuos utilizados para los microextendidos de CS. Fueron examinadas imágenes de núcleos en metafase teñidos con DAPI en las cuales se observó el número diploide de 80 cromosomas ya descripto para esta la especie (Figura 27A). Como en las secciones anteriores, se resumen en una tabla las mediciones realizadas en 13 núcleos en metafase (Tabla 11).

En el pato doméstico, los macrocromosomas 1 y 2 son submetacéntricos (IC 1= 0.38, IC 2=0.40 respectivamente), mientras que los cromosomas 3 a 6 son todos acrocéntricos (Tabla 11). En estos cromosomas es difícil de observar el pequeño brazo p por lo cual las mediciones se realizaron considerando a uno de los extremos como el centrómero. Los cromosomas autosómicos 7 a 80 se denominan conjuntamente como microcromosomas y son todos acrocéntricos. Además de medir la longitud de los 6 primeros autosomas, se midió la longitud del cromosoma Z y se calculó su IC. El cromosoma Z es el cuarto en longitud y su morfología es acrocéntrica. El cromosoma W es de tamaño semejante al de un microcromosoma por lo cual no es posible su identificación sin técnicas adicionales.

A partir de los microextendidos de CS de ovocitos en paquitene se analizó el cariotipo de CSs de la especie (Figura 27B). En ovocitos como el de la figura se determinó la longitud del set promedio y la longitud promedio e IC de los primeros 6 CSs (Tabla 11). Los CSs restantes son indistinguibles entre sí, acrocéntricos y sus longitudes promedio oscilan entre 2 y 5 µm (Tabla 11). La longitud promedio del set autosómico para *A. platyrhynchos* es 201.9µm, de los cuales aproximadamente el 48% corresponde a los macrocromosomas 1 a 6. Comparando la longitud del set se encontraron diferencias significativas entre individuos (*Test* de Kruskal-Wallis, $P<0.0001$), porque una de las hembras presentó una mayor variación en la longitud absoluta del set. Como las longitudes relativas promedio para los macrobivalentes en esta hembra no se apartan de las obtenidas para los demás individuos analizados, los núcleos fueron incluidos en la construcción del cariotipo de CSs y del mapa de focos de MLH1.

Al comparar la longitud absoluta de los cromosomas mitóticos y de los CSs se observa una diferencia de aproximadamente 5 veces, es decir que los complejos sinaptonémicos son casi cinco veces más largos que sus correspondientes cromosomas mitóticos pero la posición de la señal centromérica en los CSs es la esperable de acuerdo con el índice centromérico de los cromosomas mitóticos (Figura 27C, Tabla 11). Al realizar el análisis de la regresión lineal y correlación entre las longitudes relativas de ambos tipos cromosómicos, se destaca la proporcionalidad 1 a 1 entre ambos cariotipos (Figura 27D; $r=0.98$, $P=0.0003$). Es

decir que se observa una marcada concordancia entre los cromosomas mitóticos y los CSs, lo cual permite la identificación de un par cromosómico dentro del cariotipo meiótico.

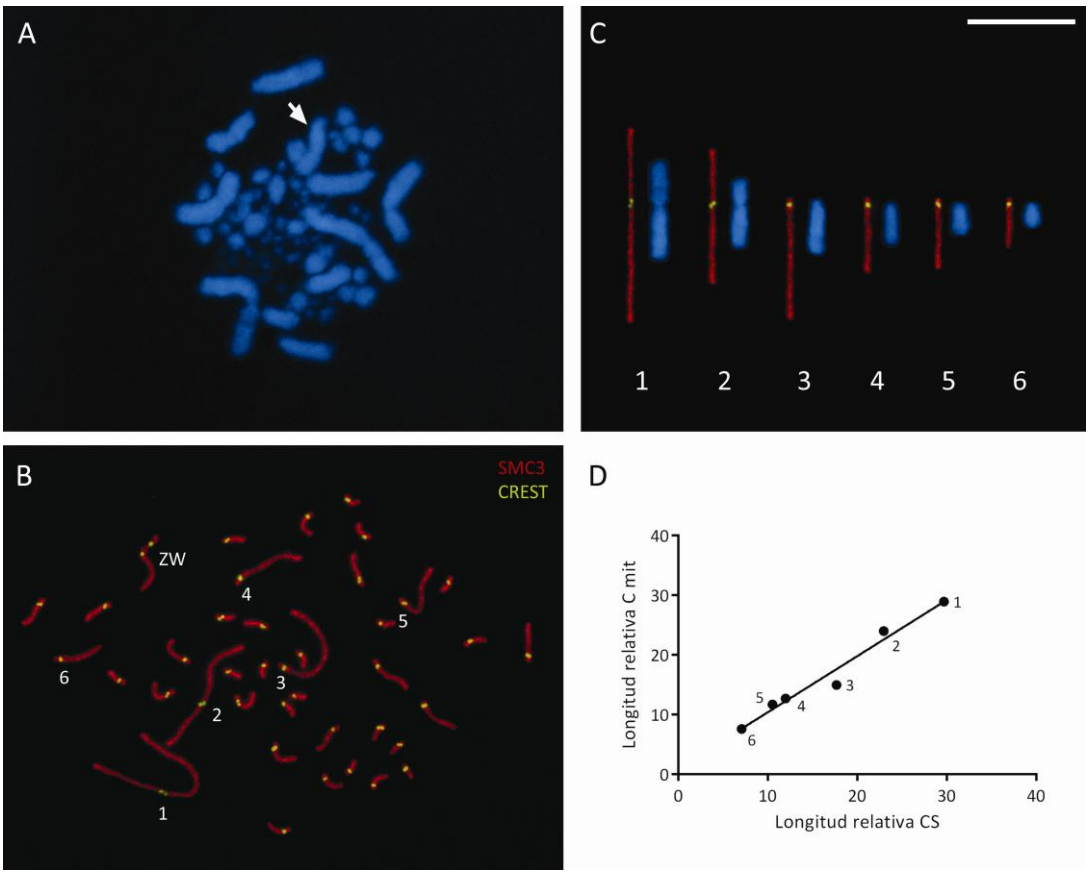


**Figura 27**: Comparación del cariotipo mitótico y meiótico de *A. platyrhynchos.* A) Metafase mitótica teñida con DAPI. Se señala con una flecha el cromosoma Z. B) Núcleo en paquitene donde se observan los 39 bivalentes autosómicos y el par ZW. Los CSs están marcados con anti-SMC3 que reconoce los elementos laterales del CS, y los centrómeros con suero anticentromérico. Se indican los bivalentes 1 a 6 y el par sexual. C) Cariograma comparativo de los CSs y de los cromosomas mitóticos. Se numeran los pares 1 a 6 ordenados por tamaño decreciente. D) En el gráfico se puede observar la proporcionalidad entre la longitud relativa de los CSs y de los cromosomas mitóticos en esta especie (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.9413$x$ + 0.9782; correlación de Pearson: $r$=0.98, P=0.0003). Barra=10 µm.

**Tabla 11:** Longitud e índice centromérico promedio de los cromosomas mitóticos y de los CSs de *A. platyrhynchos*.

| | Par | LA (µm) | | LR (%) | | IC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C Mit | CS | C Mit | CS | C Mit | CS |
| Macrocromosomas | **1** | 6.1 (0.8) | 29.0 (9.9) | 28.9 (1.2) | 29.7 (10.1) | 0.38 (0.01) | 0.36 (0.03) |
| | **2** | 5.1 (0.6) | 22.4 (8.5) | 24.0 (0.4) | 23.0 (9.1) | 0.40 (0.01) | 0.41 (0.03) |
| | **3** | 3.9 (0.5) | 17.3 (5.4) | 15.0 (0.8) | 17.7 (5.5) | - | 0.03 (0.02) |
| | **4** | 2.7 (0.2) | 11.7 (3.8) | 12.7 (0.6) | 12.0 (3.9) | - | 0.06 (0.03) |
| | **5** | 2.5 (0.2) | 10.3 (2.9) | 11.7 (0.9) | 10.5 (2.9) | - | 0.05 (0.04) |
| | **6** | 1.6 (0.1) | 6.9 (1.9) | 7.6 (0.5) | 7.1 (2.0) | - | 0.04 (0.04) |
| Micros | **7-13** | - | 5.4 (1.7) | - | - | - | - |
| | **14-22** | - | 3.5 (0.9) | - | - | - | - |
| | **23-39** | - | 2.1 (0.5) | - | - | - | - |
| **Z** | | 3.2 (0.3) | - | - | - | - | - |
| **Set autosómico** | | - | 201.9 (54.6) | - | - | - | - |

LA: longitud absoluta. LR: longitud relativa. IC: índice centromérico. C Mit: cromosomas mitóticos. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. Metafases mitóticas N= 11. Ovocitos en paquitene: N= 122.

### III.5.c. Análisis de la recombinación de *A. platyrhynchos*

El recuento de focos totales del set autosómico se realizó a partir de 122 ovocitos en paquitene de las tres hembras analizadas para el cariotipo de CSs. En la Figura 28 se muestra un núcleo que ejemplifica los ovocitos analizados en esta especie. Para el recuento de focos de MLH1 se seleccionaron aquellas imágenes de los núcleos que cumplieran con los criterios establecidos (ver Materiales y Métodos, Sección II.7.b). A partir de estas imágenes, se contabilizaron en promedio 55.9 focos por núcleo, con un rango de 46 a 68 focos, siendo el número de focos totales más frecuente de 54 focos (Tabla 12, Figura 29A). Se evaluó la posibilidad de diferencias entre los tres individuos analizados y no se encontraron diferencias significativas entre individuos (ANOVA, F=1.597, P=0.2068). El 35.1% del número total de focos por ovocito se produce en los primeros seis macrocromosomas. En los microbivalentes (CS 8-39), que representan el 52% de la longitud total del set, se observó que la mayoría tiene un sólo foco de MLH1 y aproximadamente un 10% tiene dos focos.

El número promedio de focos para esta especie equivale a 2795 cM en el mapa genético autosómico. Los mapas de ligamiento disponibles para el pato difieren significativamente de la longitud genética estimada a partir del recuento de focos de MLH1 probablemente debido al uso de diferentes marcadores moleculares y metodologías (1387.6 cM, Huang *et al.* 2006; 1766 cM, Huang *et al.* 2009). Algunos grupos de ligamiento son más

cortos y otros son más largos que lo esperado en base al recuento de focos de MLH1 reflejando el estado preliminar de la construcción estos mapas.

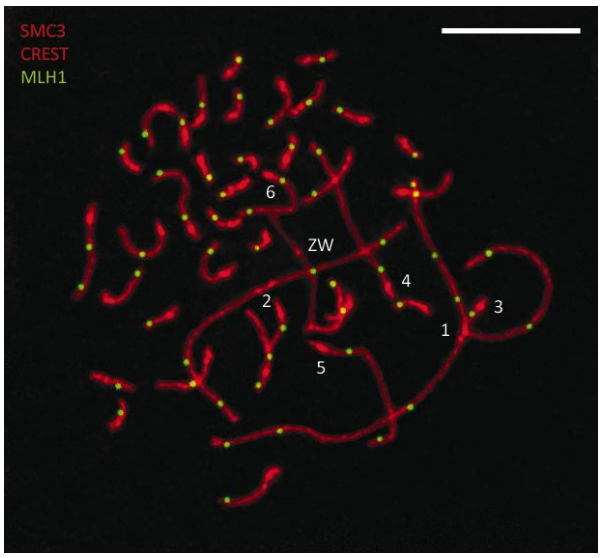


**Figura 28**: Ovocito en paquitene de *A. platyrhynchos*. Se observan los CSs de los macro- y microbivalentes luego de la inmunolocalización de SMC3, los centrómeros y de la proteína MLH1. Se identifican los macrobivalentes 1 a 6 y el par sexual ZW, sin completar la sinapsis heteróloga. Barra=10µm.

En el pato el tamaño del genoma haploide estimado a partir del contenido de ADN genómico (Gregory 2016) es de 1408.3 Mb. Al restar el porcentaje correspondiente al cromosoma Z el tamaño del genoma haploide contenido en los autosomas del pato es de 1323.5 Mb. A partir de la longitud genética total y del tamaño genómico estimado, la TR global de la especie es 2.1 cM/Mb (Tabla 12).

En los mismos 122 núcleos en paquitene sobre los que fue realizado el recuento de focos totales también se realizó el recuento de focos en los primeros seis macrocromosomas y en los microcromosomas agrupándolos en tres grupos (Tabla 12). Como en las otras cuatro especies analizadas se observó una relación lineal y positiva entre la longitud de los CSs y el número de focos, es decir que los bivalentes de mayor tamaño presentan un número promedio de focos mayor que los bivalentes más pequeños. Esta relación destaca proporcionalidad entre la longitud de los bivalentes en paquitene y la cantidad de eventos de recombinación (Figura 29B).

**Tabla 12**: Promedio de focos de MLH1, longitud del mapa genético y tasas de recombinación en *A. platyrhynchos.*

| | CS | N° de focos | Equivalente en cM | LR (%) | Longitud estimada (Mb) | TR (cM/Mb) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Macrocromosomas | **1** | 5.4 (1.1) | 270 | 14.4 (2.6) | 190.0 | 1.4 |
| | **2** | 4.4 (0.9) | 220 | 11.1 (1.2) | 147.0 | 1.5 |
| | **3** | 3.4 (0.8) | 170 | 8.6 (1.2) | 113.3 | 1.5 |
| | **4** | 2.4 (0.6) | 120 | 5.8 (0.5) | 76.9 | 1.6 |
| | **5** | 2.1 (0.5) | 105 | 5.1 (0.6) | 67.5 | 1.6 |
| | **6** | 1.8 (0.5) | 90 | 3.4 (0.3) | 45.5 | 2.0 |
| | **1-6** | 19.5 (1.4) | 975 | 48.4 (0.1) | 640.0 | 1.5 |
| Micros | **7-13** | 1.4 (0.5) | 70 | 2.7 (0.4) | 35.7 | 2.0 |
| | **14-22** | 1.1 (0.3) | 55 | 1.8 (0.3) | 23.8 | 2.3 |
| | **23-39** | 1.0 (0.1) | 50 | 1.1(0.2) | 14.6 | 3.4 |
| **Set autosómico** | | 55.9 (3.8) | 2795 | - | 1323.5 | 2.1 |

LR: Longitud relativa. TR: tasa de recombinación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

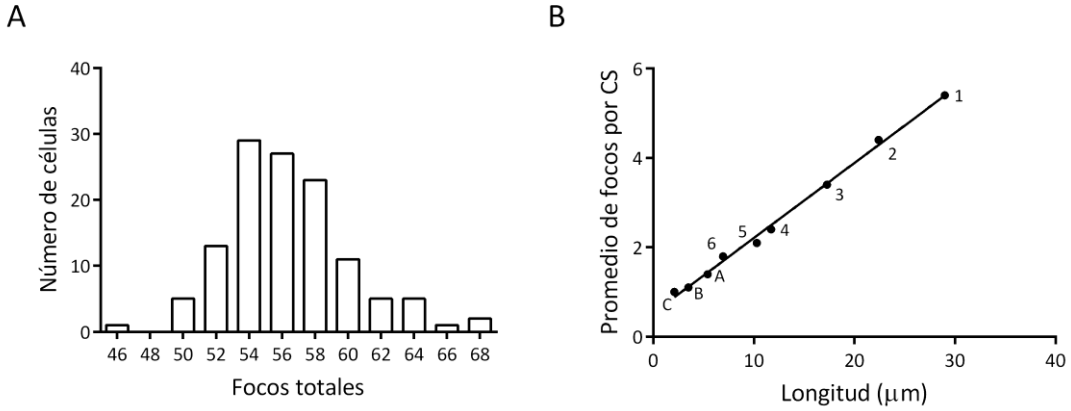


**Figura 29**: Distribución del número de focos totales y relación entre el número de focos y la longitud de los bivalentes de *A. platyrhynchos*. A) En el gráfico de frecuencias se puede observar que el número de focos de MLH1 totales más frecuente es de 54 focos. B) Existe una correlación positiva entre la longitud del CS y el número promedio de focos en los macrobivalentes 1 a 6 y en los tres grupos de microbivalentes (análisis de la regresión lineal: $r^2$=0.99; $y$ = 0.1679$x$ + 0.5291; correlación de Pearson: $r$= 0.99, P<0.0001). A: microcromosomas 7-13. B: microcromosomas 14-22. C: microcromosomas 23-39.

A partir del recuento de focos de MLH1 en cada uno de los primeros seis bivalentes, se construyeron los histogramas que representan la distribución de los focos de MLH1 a lo largo de los macrobivalentes identificados en el cariotipo de CSs (Figura 30).

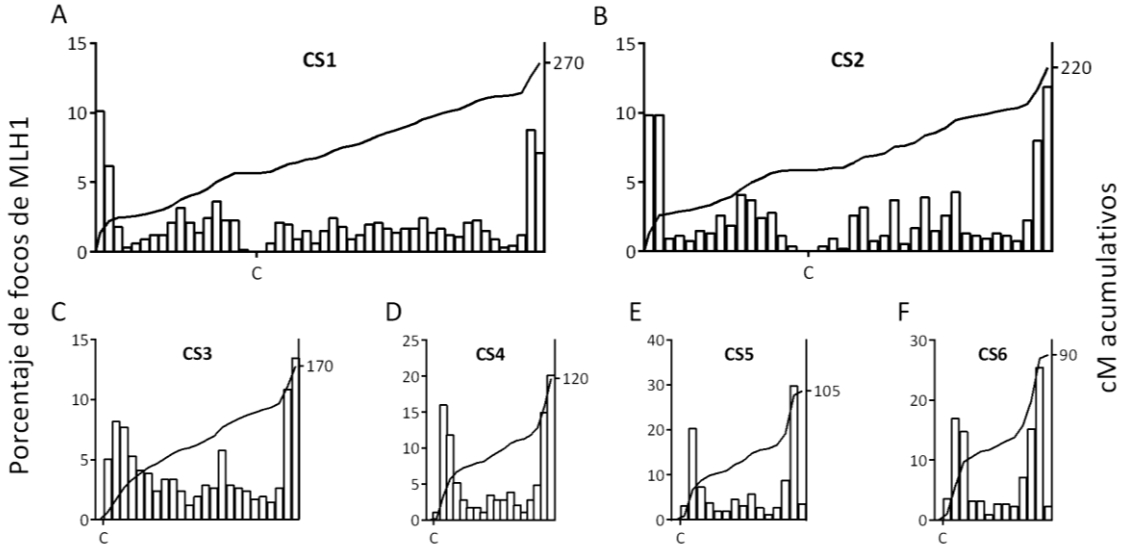


**Figura 30**: Distribución de los eventos de recombinación en *A. platyrhynchos*. Cada histograma representa la distribución de los focos de MLH1 en los primeros 6 bivalentes autosómicos. En cada histograma, el eje *x* representa la posición de los focos sobre el CS, con el brazo p hacia la izquierda y el q hacia la derecha. Cada intervalo representa una fracción de la longitud del CS y equivale en promedio a 0.6 µm. La letra C señala la posición del centrómero. En el eje *y* izquierdo se representa el porcentaje de focos de MLH1 por intervalo y en el eje *y* derecho los cM acumulativos a lo largo de los intervalos. El valor al final de la curva representa la longitud total en cM de cada bivalente.

En el análisis de la distribución de los focos de MLH1 a lo largo de los macrobivalentes se observó el mismo patrón general de distribución de los eventos de recombinación. En los bivalentes bibraquiados -en esta especie los bivalentes 1 y 2- los focos de MLH1 se concentran en las regiones más distales, mientras que la frecuencia disminuye en los intervalos próximos al centrómero (Figura 30 A y B). En los bivalentes 3 a 6 no se observaron focos de MLH1 en el brazo p (Figura 30 C-F). Estos son cromosomas acrocéntricos con brazos cortos pequeños formados por heterocromatina (Wojcik y Smalec 2007). En el brazo q poseen un pico máximo de focos de MLH1 en las regiones teloméricas y subteloméricas, semejante al observado en los bivalentes 1 y 2. A diferencia de estos bivalentes, los bivalentes acrocéntricos poseen un máximo de focos de MLH1 en los intervalos cercanos al centrómero.

En cuanto a la distribución acumulativa de los cM, como fue destacado anteriormente en las demás especies analizadas, los bivalentes mayores presentan una distribución más o menos lineal a lo largo de los intervalos (Figura 30 A-C). Mientras que a partir del cuarto bivalente los cM no se acumulan de manera tan lineal y se pueden observar

pequeños *plateau* en las regiones del cromosoma donde hay una menor frecuencia de de focos de MLH1.

# IV. Discusión

## IV.1. Correspondencia entre cromosomas mitóticos, CSs y contenido de ADN

En el ratón, en el ser humano y otros mamíferos, se ha observado que varios CSs son más cortos o más largos que lo esperado a partir de la longitud relativa de los cromosomas en mitosis (Froenicke *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Codina-Pascual *et al.* 2006; Borodin *et al.* 2008). Para explicar estas discrepancias entre el cariotipo mitótico y el de los CSs, se ha propuesto que las secuencias repetitivas presentes en las bandas G y R se organizan de manera diferente en las secuencias que forman parte de la heterocromatina durante la mitosis y la meiosis (Zickler y Kleckner 1999; Hernandez-Hernandez *et al.* 2008; de la Fuente *et al.* 2014). La heterogeneidad del contenido GC y de la densidad de genes entre los diferentes cromosomas en el ser humano es ampliamente conocida (Venter *et al.* 2001). Aún antes de la secuenciación del genoma humano, se había establecido que las bandas R están positivamente correlacionadas con el contenido GC, la densidad de secuencias génicas y con la distancias genéticas (Holmquist 1992; Gilbert *et al.* 2004). El mapeo de focos de MLH1 en espermatocitos humanos ha demostrado que los CSs con una longitud relativa mayor que la del par mitótico respectivo poseen regiones con alto contenido GC, mayor densidad de genes y mayores niveles de recombinación. Por el contrario, aquellos bivalentes que forman CSs de menor longitud relativa con base a lo esperado en el par mitótico, poseen abundantes regiones con bajo contenido GC y menor densidad génica, y corresponden a cromosomas con más bandas G (Codina-Pascual *et al.* 2006). En este sentido, el mapeo del *crossing over* a alta resolución en el ser humano también demuestra que existe una relación inversa entre la intensidad de las bandas G y la frecuencia de recombinación (Kong *et al.* 2002).

En las aves, las bandas G/R no se han caracterizado con respecto a su contenido de pares GC, pero la secuenciación del genoma del pollo ha demostrado que esta especie posee menos secuencias repetitivas y heterocromatina que los mamíferos, especialmente en los cromosomas mayores (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004). Posiblemente estas características estén presentes en otras especies dada la conservación del cariotipo en las aves y la escasa cantidad de bandas C y de elementos repetitivos en los macrocromosomas, como se ha demostrado en trabajos de citogenética clásica y molecular (Stock y Bunch 1982; Ansari *et al.* 1988; Griffin *et al.* 2007; Wojcik y Smalec 2007; Andrews *et al.* 2009; Skinner *et al.* 2009). La homogeneidad de las longitudes relativas e índices centroméricos de los CSs de los macrobivalentes, ha permitido confeccionar un cariotipo de los CSs mayores para su comparación con los cromosomas mitóticos en todas las especies analizadas en el presente trabajo. Aunque existen diferencias entre la longitud absoluta de los cromosomas en paquitene (CSs) y la de los cromosomas mitóticos, se registró una excelente

correspondencia en los cariotipos de ambos tipos cromosómicos al comparar las longitudes relativas de los primeros 6 u 8 pares mitóticos y los CSs correspondientes, con coeficientes de regresión entre 0.98 y 0.99. La correspondencia morfológica entre los cromosomas mitóticos y los bivalentes en paquitene observada en las 5 especies analizadas en este trabajo es coincidente con observaciones previas en otras especies de aves pertenecientes a una amplia variedad de taxones, desde las ratites -que son las aves más primitivas- a los paseriformes, evolutivamente más recientes (Pigozzi y Solari 1997, 1998, 1999b, a). Además de esta correspondencia general de longitudes relativas e índices centroméricos, también se ha demostrado una correspondencia de las posiciones relativas de secuencias intersticiales a nivel de brazos cromosómicos al menos en una especie de ave. En el diamante mandarín, *Taeniopygia guttata* (Estrildidae, Passeriformes) el uso de FISH permitió demostrar que las posiciones relativas de 9 genes ligados al cromosoma Z se correlacionan de manera directa en el par mitótico y en el CS correspondiente (Pigozzi 2008).

Como se mencionó antes con respecto a los mamíferos, la composición de las secuencias de ADN puede causar variaciones regionales de organización de los lazos de cromatina a lo largo del CS, lo que explicaría la distorsión de la longitud relativa representada por cada par mitótico y su CS en paquitene en este grupo de vertebrados. Es posible que el contenido minoritario de heterocromatina y de elementos repetitivos en los macrocromosomas de las aves tenga como consecuencia que esta distorsión sea menos obvia. En consecuencia, las posiciones relativas de secuencias del ADN a lo largo de los bivalentes en paquitene y de los cromosomas mitóticos podrían presentar una relación más lineal en las aves que en organismos con mayor cantidad de heterocromatina. El tamaño en Mb de los primeros 8 macrocromosomas del pollo estimado en el presente trabajo a partir del contenido total de ADN y la longitud relativa de los CSs muestra una excelente correlación con el tamaño que se informa en el último ensamblado del genoma de esta especie (ver Figura 6). Ambas comparaciones indican que la longitud de los CSs tiene una relación directa con la cantidad de ADN de cada par cromosómico. Teniendo en cuenta la correspondencia de los cariotipos de CSs y mitótico en las demás especies analizadas, es posible que la longitud de los CSs también sea predictiva del tamaño en Mb de un par cromosómico en esas especies. Esta correlación da fundamento a la estimación de la cantidad de ADN por macrobivalente a partir de la longitud relativa del CS que se utilizó para calcular las tasas de recombinación (TRs) por bivalente (ver Resultados Sección III.1.b).

## IV.2. Relación entre la longitud del CS y el número de eventos de *crossing over*

El tamaño de los cromosomas puede ser medido de diversas maneras: longitud del mapa genético (cM), el contenido de ADN (Mb) o la longitud (µm) de los cromosomas mitóticos o de los CSs. La longitud de los CSs ha sido propuesta como un importante factor que determina la frecuencia y la distribución de los eventos de recombinación en algunas especies de animales y plantas (Sherman y Stack 1995; Froenicke *et al.* 2002; Anderson *et al.* 2003). En el maíz y en el tomate se observó que hay una correlación positiva entre el número de NRs totales y la longitud del set de CSs, como así también entre el número de NRs por bivalente y la longitud de los CSs (Sherman y Stack 1995; Anderson *et al.* 2003). En el ratón y el ser humano se ha demostrado que el número de COs se vincula de manera más directa con la longitud de los CSs que con la longitud de los cromosomas mitóticos o el tamaño de los cromosomas en Mb (Froenicke *et al.* 2002; Lynn *et al.* 2002). En el presente trabajo la relación entre la longitud del set de CSs y el número de focos totales por núcleo sólo se analizó en el pollo, porque en las demás especies el número de individuos es insuficiente. En el pollo sólo se encontró una débil correlación entre el número de focos totales y la longitud del set de CSs en dos de las hembras. Consideramos que deberían estudiarse más individuos para determinar si hay o no una co-variación entre la longitud del set y el número de focos por núcleo en esta especie.

En las 5 especies analizadas en el presente trabajo, se observó una excelente correlación entre el número de focos por bivalente y la longitud del CS. En 4 de estas especies casi el 100% de la variación en el número de focos entre los macrobivalentes se explica por la variación de longitud del CS (ver Resultados). En *G. domesticus*, además, esta interdependencia incluye al tamaño en Mb de ADN de cada macrobivalente, debido a la proporcionalidad entre la longitud relativa de los CSs mayores y el tamaño en Mb de cada uno de ellos como se demostró en este trabajo. En la gallina de Guinea esta relación no es tan directa, ya que aproximadamente el 80% de la variación en el número de focos se explica por la variación de la longitud del CS ($r^2$=0.80, Figura 23B). Esto se debe a que el número de focos en los macrobivalentes es notablemente menor que en el resto. Asimismo, en esta especie la longitud del set de CSs es la menor entre las cinco especies analizadas, lo que está en relación directa con la idea de la co-variación entre el número de COs y la longitud del set. La relación causa efecto entre la longitud del CS y la frecuencia de recombinación observada en los vertebrados superiores no ha sido dilucidada aún. Es decir, se desconoce si la longitud del CS es determinante de la TR, si la TR determina la longitud del CS o si cada variable influye sobre la otra simultáneamente.

Otra línea de evidencia que correlaciona la frecuencia del *crossing over* y la longitud de los bivalentes en paquitene proviene de la comparación de estos parámetros en ambos sexos. En varias especies de mamíferos, se observan diferencias más o menos marcadas en los niveles de recombinación entre sexos (Copeland *et al.* 1993; Barendse *et al.* 1994; Mikawa *et al.* 1999; Neff *et al.* 1999; Kong *et al.* 2004; Samollow *et al.* 2004; Tease y Hultén 2004). En el ser humano, estas diferencias han sido relacionadas con la mayor longitud del set de CSs y la formación de lazos de ADN más cortos en los ovocitos que en los espermatocitos (Tease y Hultén 2004). Si esta hipótesis es verdadera podría predecirse entonces que en especies sin dimorfismo sexual para las tasas de *crossing over*, la longitud del set de CSs sería similar. Este es el caso de la codorniz común, como se mostró en el presente estudio, ya que no se observaron diferencias marcadas en la frecuencia de los eventos de recombinación entre sexos y tampoco en las longitudes respectivas del set de CSs en machos y hembras.

En resumen, los resultados del presente trabajo apoyan la idea de que la longitud de los CSs y el número de COs tienen una fuerte interdependencia en las aves, incluso mayor que la observada en otros organismos como el tomate, el maíz, el ratón y el ser humano. Esta co-variación estrecha podría tener su origen en la composición del genoma de las aves, que contiene menor cantidad de heterocromatina lo que daría lugar a una organización del ADN más homogénea a lo largo de los bivalentes.

## IV.3. Comparación del análisis de la recombinación mediante el recuento de focos de MLH1 y otros métodos

El análisis de los quiasmas durante el estadio de diacinesis-metafase I es un método citogenético clásico que permite contar de manera directa todos los eventos de recombinación, aunque no es igualmente aplicable en todos los organismos. En organismos modelo, como la mosca de la fruta, *Arabidopsis* o las levaduras, el tamaño de los cromosomas y otras características del proceso meiótico dificultan la clara visualización de los quiasmas. En las aves, los quiasmas de los macrobivalentes pueden observarse en machos y hembras, pero su visualización en las hembras ocurre en el estadio de diplotene cuando las aves forman cromosomas plumulados, que son muy difíciles de conservar en preparaciones citológicas, lo que impide el análisis de un gran número de bivalentes para realizar análisis estadísticos. Por otra parte, los cromosomas de las aves son más pequeños que en otros organismos, lo que dificulta distinguir los quiasmas muy cercanos en los espermatocitos en diacinesis/metafase I.

El análisis de los focos de MLH1 representa un recurso valioso para el estudio directo de la recombinación meiótica, cuando el estudio de los quiasmas es dificultoso o poco informativo. Dado que los CSs durante el estadio de paquitene son más largos que los bivalentes en el estadio de diacinesis, esta técnica ofrece una mayor precisión que otros métodos directos de observación del *crossing over* (ver Introducción Sección I.3.b). En trabajos previos del laboratorio se estableció que el número de focos de MLH1 en los ovocitos de pollo es equivalente al número de quiasmas estimado a partir de preparaciones de cromosomas plumulados (Rodionov *et al.* 1992b; Pigozzi 2001). En el presente trabajo se observó una excelente correlación entre el número de quiasmas y el número de focos de MLH1 en el bivalente 1 en machos de la codorniz común y de la codorniz china. La comparación del número de focos de MLH1 y de quiasmas -una expresión morfológica estable del *crossing over*- en la misma especie y el mismo sexo, es importante para demostrar que la inmunodetección de MLH1 es un buen indicador del número de COs en un núcleo dado. Es decir, los resultados observados en ambas especies de codorniz demuestran que los criterios de selección de los núcleos utilizados en el presente trabajo permiten descartar que la cantidad de COs se subestime al utilizar MLH1 como marcador debido a la naturaleza transitoria de esta proteína durante el paquitene. Otra evidencia que favorece esta conclusión es que el número promedio de focos de MLH1 en los primeros cuatro bivalentes de la codorniz es similar al recuento de quiasmas en dichos cromosomas durante el estadio plumulado (Rodionov y Chechik 2002; Schmid *et al.* 2005). Conjuntamente, estas evidencias apoyan la idea de que la presencia de MLH1 en los sitios de recombinación durante el paquitene es lo suficientemente estable como para evitar la subestimación de los eventos de recombinación en las aves. Es decir, los focos de MLH1 probablemente representan todos los eventos de *crossing over*, de manera similar a los NRs durante el paquitene y los quiasmas en diacinesis.

En análisis previos se encontró un número promedio de focos de MLH1 mayor en la codorniz común y el pollo que el estimado en este trabajo, con una diferencia de 3 y 4 focos, respectivamente (Pigozzi 2001; Calderón y Pigozzi 2006). Las diferencias observadas no se pueden atribuir a un menor número de focos en uno o en algunos bivalentes, ya que el número de focos es ligeramente menor en cada macrobivalente en los individuos analizados en el presente estudio. Se sabe que ciertos rearreglos cromosómicos provocan una disminución del número de COs, sin embargo, la presencia de múltiples rearreglos cromosómicos en heterocigosis en la mayoría o en todos los individuos analizados en este trabajo es poco probable. Una posibilidad alternativa es que las diferencias encontradas sean variaciones reales de la TR entre los individuos provenientes de diferentes criaderos. Esta explicación se encuentra apoyada por estudios del *crossing over* a nivel genómico total que

han puesto en evidencia diferencias en la TR entre distintas líneas genéticas de pollo, con tasas significativamente mayores en animales domésticos de raza (Groenen *et al.* 2009). También se han observado variaciones intraespecíficas en la TR entre diferentes cepas de ratón en ausencia de polimorfismos cromosómicos (Koehler *et al.* 2002; Dumont *et al.* 2009), y otros animales (Andersson y Sandberg 1984). Sería necesario realizar estudios adicionales en líneas genéticas puras o en un número mayor de individuos para caracterizar con más precisión las variaciones de la frecuencia de recombinación en distintas líneas genéticas y entre poblaciones de aves.

Además de la observación directa de la recombinación por métodos citológicos, la frecuencia del *crossing over* también puede analizarse por metodologías indirectas, como ser mediante mapas de ligamiento, que se basan en el análisis de la herencia de productos meióticos haploides. Aunque los análisis de ligamiento permiten estimar distancias genéticas entre marcadores separados por pocas kb, esta aproximación tiene algunas desventajas ya que sólo la mitad de todos los intercambios puede ser detectada y como resultado se perderá cualquier gameta recombinante seleccionada negativamente. Otro problema de los mapas de ligamiento es que no pueden emplearse en cepas endocriadas, en las cuales todos los loci se encuentran en homocigosis, en consecuencia, en especies como el ratón de laboratorio, resulta difícil analizar la variación de las TRs. Finalmente, los análisis de ligamiento convencionales requieren una excelente caracterización de marcadores moleculares o de otro tipo durante tres generaciones o más, algo que no es posible cuando los organismos no pueden criarse en condiciones controladas o cuando no hay marcadores suficientes. Por lo tanto, los mapas de ligamientos permiten analizar distancias genéticas de manera confiable si se dispone de una suficiente densidad de marcadores a lo largo de cada grupo de ligamiento y si se analiza un *pedigree* o número de gametas grande (revisado en Barnes 2003).

Entre las especies analizadas en este trabajo, existen mapas de ligamiento para el pollo, la codorniz común y el pato, los cuales tienen distinto grado de cobertura para cada grupo de ligamiento. Cuando se compara el número focos de MLH1 y el mapa de ligamiento más reciente del pollo (Groenen *et al.* 2009), se observa una concordancia en cuanto a la longitud genética global obtenida por ambos métodos (Tabla 14). En cambio, esta coincidencia no es tan buena en la codorniz común, probablemente porque el mapa de ligamiento de esta especie se encuentra en una etapa temprana de su construcción (Tabla 14). La única excepción se observa en el bivalente más largo (CJA1), que es el que tiene mayor número de marcadores en los dos mapas de ligamiento construidos para esta especie. Las longitudes en cM para CJA1 estimadas en estos análisis de ligamiento (Kayang *et al.* 2006; Fresard *et al.* 2012) son muy similares a la obtenida por medio de la localización de los focos de MLH1 (Tabla 14).

Los mapas de ligamiento disponibles para el pato difieren significativamente entre sí en cuanto a la longitud genética estimada para los grupos de ligamiento mayores, probablemente debido a que fueron construidos utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares y diferentes metodologías (Huang *et al.* 2006; Huang *et al.* 2009). La longitud del mapa de AFLP (Huang *et al.* 2009) es menor que la del mapa obtenido a partir del mapeo de microsatélites (Huang *et al.* 2006), y ambas longitudes son menores que la estimada a partir del análisis de los focos de MLH1 en la presente tesis (Tabla 14). El mapa de microsatélites fue construido en paralelo con un mapa citogenético, lo cual permite que los grupos de ligamiento puedan vincularse con los cromosomas con seguridad. Como puede observarse en la comparación de la Tabla 14 algunos grupos de ligamiento resultan más largos mientras que otros son más cortos que lo esperado con base en el recuento de focos de MLH1, reflejando el estado preliminar de la información obtenida a partir del análisis de ligamiento en el pato (Tabla 14).

**Tabla 14:** Comparación de la longitud genética (cM) de las hembras del pollo, la codorniz y del pato utilizando los mapas de MLH1 y los mapas de ligamiento

| Especie | CS/GL | Mapa MLH1 | Mapa de ligamiento | |
|---|---|---|---|---|
| ***G. domesticus*** [a] | **1** | 360 | 483.7 | |
| | **2** | 295 | 326.2 | |
| | **3** | 205 | 281.6 | |
| | **4** | 185 | 202.6 | |
| | **5** | 145 | 167.0 | |
| | **6** | 85 | 119.4 | |
| | **7** | 90 | 111.1 | |
| | **8** | 90 | 101.3 | |
| | **Total** | 3105 | 3228 | |
| ***C. japonica*** [b] | **1** | 275 | 274.8/284.5[c] | |
| | **2** | 220 | 174.4 | |
| | **3** | 150 | 48.4 | |
| | **4** | 135 | 20.8 | |
| | **5** | 95 | 42.1 | |
| | **6** | 80 | 96.1 | |
| | **Total** | 2655 | 1904 | |
| ***A. platyrhynchos*** | **1** | 270 | 398.8[d] | 171.9[e] |
| | **2** | 220 | 257.6 | 81 |
| | **3** | 170 | 102.9 | 78.5 |
| | **4** | 120 | 78.1 | 75.5 |
| | **5** | 105 | 98.2 | 71.7 |
| | **6** | 90 | 136.9 | 71.3 |
| | **Total** | 2795 | 1387.6 | 1766 |

CS: Complejo Sinaptonémico. GL: Grupo de Ligamiento. [a]Mapa de ligamiento de *G. domesticus:* Groenen *et al.* (2009). [b]Mapa de ligamiento de *C. japonica*: Kayang *et al.* (2006); [c]longitud genética del grupo de ligamiento CJA1, Fresard *et al.* (2012). [d]Huang *et al.* (2006). [e]Huang *et al.* (2009).

En los análisis de ligamiento, se asume que el *crossing over* está distribuido de manera homogénea y se utilizan funciones de mapa que asumen que la interferencia entre eventos de recombinación es igual en todos los cromosomas o entre sexos. Estas suposiciones ocasionan en muchos casos una falta de proporcionalidad entre las frecuencias de recombinación y la longitud del mapa genético a lo largo de distancias físicas grandes, como ser un brazo cromosómico (Hultén y Tease 2006). En el presente trabajo, las distancias genéticas a lo largo de los bivalentes en paquitene (CSs) fueron calculadas mediante la conversión de la frecuencia de focos de MLH1 a cM y la sumatoria de los valores a lo largo de los brazos cromosómicos (ver Materiales y Métodos, Sección II.7.e). Por eso utilizamos la denominación “mapas de MLH1-cM” de manera similar a los mapas de NR-cM construidos para algunas plantas como el

maíz y el tomate (Sherman y Stack 1995; Anderson *et al.* 2003). Teniendo en cuenta la relación lineal entre la longitud de los cromosomas mitóticos y los cromosomas en paquitene (ver Sección IV.1), los mapas de MLH1-cM permitirían calcular la distancia genética entre dos posiciones físicas en un cromosoma dado. Por ejemplo, si se localiza mediante FISH una secuencia sobre los cromosomas mitóticos se podría estimar la distancia genética desde el extremo del cromosoma a partir de los datos del mapa de MLH1-cM de la especie. Esto sería posible ya que los mapas de MLH1-cM permiten convertir las posiciones físicas a lo largo de los CSs en distancias genéticas y, además, porque las posiciones relativas a lo largo de los cromosomas mitóticos y en paquitene mantienen una buena proporcionalidad en las aves como se discutió anteriormente.

Con frecuencia, los análisis de ligamiento se realizan en base a parámetros establecidos en especies modelo como el pollo, lo cual tiene algunos efectos no deseados dado que, como se observó en los resultados, existen diferencias sustanciales en los niveles de recombinación con respecto a otras aves, incluso cercanas filogenéticamente. Desde la publicación de la secuencia del genoma de *G. domesticus* (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004), el mapa de ligamiento del pollo ha ofrecido un marco de referencia para análisis genómicos comparativos interespecíficos (Ellegren 2005; Backström *et al.* 2008a). En estos estudios comparativos, ciertos marcadores de referencia derivados del genoma del pollo son utilizados para analizar la evolución en diversas especies de aves. El fundamento para tales comparaciones es la marcada conservación del tamaño genómico y la baja tasa de rearreglos intercromosómicos entre las aves (Derjusheva *et al.* 2004; Itoh *et al.* 2006; Griffin *et al.* 2007; Gregory 2016). Sin embargo, como se discutirá más adelante, los patrones de recombinación de algunas especies difieren del patrón observado en el pollo. Por lo tanto, el análisis de ligamiento en otras especies, basado únicamente en parámetros derivados del genoma del pollo sólo permitirá estimar las distancias genéticas de forma aproximada. Una evaluación preliminar de la recombinación por medio de un mapa de MLH1-cM puede facilitar la planificación de los mapas de ligamiento, proveyendo información acerca del número mínimo de meiosis necesarias para otorgar una posición de los marcadores confiable y ayudando a diseñar estrategias para el análisis de ligamiento que se ajusten a cada patrón de recombinación particular.

## IV.4. Variación en la frecuencia y el patrón de recombinación

### IV.4.a. Efecto del sexo en la recombinación

El dimorfismo sexual relacionado a la frecuencia y localización de los eventos de recombinación ha sido descripto tanto para los cromosomas sexuales como para los autosomas en organismos muy diversos, principalmente en animales y también en algunas plantas (Callan y Perry 1977; Trivers 1988; Burt *et al.* 1991; Singer *et al.* 2002; Lenormand 2003; Lorch 2005). Estas diferencias han sido puestas en evidencia tanto mediante análisis de ligamiento como a partir de análisis citológicos de la recombinación. Por ejemplo, en los primeros estudios de ligamiento en *Drosophila* y en el gusano de la seda *Bombyx mori* se demostró la ausencia de recombinación en uno de los dos sexos (sexo aquiasmático), que en las especies mencionadas es el sexo heterogamético (Morgan 1912, 1914; Tanaka 1914). En otros organismos, las diferencias no son tan extremas, sino que se observan TRs mayores en uno de los sexos, ya sea en todos los grupos de ligamiento o en algunos de ellos (Kappes *et al.* 1997; Mellersh *et al.* 1997; Neff *et al.* 1999; Maddox *et al.* 2001; Singer *et al.* 2002; Zenger *et al.* 2002; Samollow *et al.* 2004). Por ejemplo, en el ser humano las TRs en la mujer son aproximadamente 1.7 veces mayores que en el varón, y esta diferencia es consistente para todos los grupos de ligamiento, ya que no se han identificado cromosomas con un exceso de recombinación en el sexo masculino (Lynn *et al.* 2004).

Mientras que las diferencias de recombinación entre sexos parece ser la regla en los mamíferos, en las aves el análisis de la recombinación en especies de distintos órdenes indica que las diferencias podrían ser escasas o inexistentes. La existencia de niveles similares de recombinación en hembras y machos de aves parece ser una característica compartida por distintos órdenes. El análisis citológico del *crossing over* en el pollo y la paloma mostraron que las TRs son similares en machos y hembras. En el pollo una evidencia inicial se obtuvo al comparar el número de quiasmas en espermatocitos en diacinesis con el número de NRs en paquitene y el número de quiasmas en los cromosomas plumulados en los ovocitos (Pollock y Fechheimer 1978; Rahn y Solari 1986; Rodionov *et al.* 1992b). Estas observaciones a partir de estudios citológicos de la recombinación, han sido confirmadas por los datos del último mapa de ligamiento del pollo que también muestra que no hay diferencias significativas entre la longitud total del mapa entre machos y hembras de esta especie (Groenen *et al.* 2009). La ausencia de dimorfismo sexual para el *crossing over* también se ha demostrado en la paloma doméstica mediante el mapeo de los NRs y en el diamante mandarín mediante la localización de los focos de MLH1 en ambos sexos (Pigozzi y Solari 1999a, b; Calderón y Pigozzi 2006).

En el presente trabajo la localización de los focos de MLH1 en ovocitos y espermatocitos de la codorniz común permitió evaluar la frecuencia de recombinación y también la distribución de los eventos de recombinación en ambos sexos. Como fue mencionado en los resultados (ver Resultados, Sección III.2.c.ii), se observaron diferencias en el número de focos a pesar de la similitud del patrón general de recombinación en ovocitos y espermatocitos. El número promedio de focos de MLH1 en los bivalentes autosómicos es mayor en las hembras (53.1) que en los machos (50.3). En cuanto a la distribución de los focos en los macrobivalentes, parece haber diferencias en el brazo corto del CS2 y en los segmentos proximales del CS5 y 6 (Figura 15). Sin embargo, cuando se comparan estadísticamente la distribución acumulativa de focos entre sexos, sólo hay diferencias estadísticamente significativas en el bivalente 6. Las diferencias en el número promedio de focos y en la distribución en el bivalente 6 podrían representar diferencias reales entre sexos. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de un rearreglo cromosómico en uno o en los dos machos analizados, lo que también podría producir una disminución del número de COs y un cambio en su distribución en este bivalente en particular. En los espermatocitos analizados no se observaron configuraciones irregulares de los CSs. A pesar de ello, una inversión paracéntrica o una pequeña deleción podrían no ser detectables a nivel citológico si se produce un ajuste sináptico o un proceso de sinapsis heteróloga, como se ha observado en el diamante mandarín (del Priore y Pigozzi 2015a).

Los análisis citológicos y moleculares de la recombinación en las especies mencionados anteriormente, junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo en la codorniz, sugieren que la existencia de tasas globales de recombinación similares en machos y hembras es una característica extendida entre las aves, aunque se han descripto algunas excepciones. En dos especies de Passeriformes, *Acrocephalus arundinaceus* y *Ficedula albicollis* se observó un dimorfismo sexual en la TR (Hansson *et al.* 2005; Backström *et al.* 2008b). Mientras que en la primera especie la recombinación en ciertas regiones genómicas es mayor en los machos, en la otra son las hembras quienes tienen un mapa de ligamiento mayor. Debe mencionarse, que en *F. albicolis*, las diferencias de las TRs entre machos y hembras observadas en el primer análisis se redujeron a la mitad al adicionarse más marcadores al mapa de ligamiento (Kawakami *et al.* 2014). Por lo tanto, sería importante obtener una mayor cobertura del genoma para establecer si las diferencias en la longitud genética entre sexos en esta especie son reales. En el pavo (*Meleagris gallopavo*), otra especie perteneciente al Orden Galliformes, se observó que la longitud genética global del mapa de ligamiento es mayor en el macho que en la hembra (2272 cM vs 2077 cM) (Aslam *et al.* 2010), aunque para algunos

grupos de ligamiento, se observó una relación contraria, con mapas genéticos mayores en la hembra.

En resumen, con excepción de diferencias marcadas en los mapas de ligamientos en dos Passeriformes, en las aves las TRs globales son similares o tienen diferencias menores limitadas a unos pocos grupos de ligamiento de manera que las especies sin dimorfismo sexual para el *crossing over* podrían servir como un grupo de estudio para determinar las causas de dicha diferencia entre machos y hembras en otras aves o en otros grupos taxonómicos.

### IV.5. Relación entre morfología cromosómica y *crossing over*

Es conocida la relación existente entre el número total de brazos cromosómicos (NF) y el número de COs, como se ha estudiado extensamente en los mamíferos (Pardo-Manuel De Villena y Sapienza 2001; Ruvinsky y Marshall Graves 2005; Segura *et al.* 2013; Muñoz-Fuentes *et al.* 2015). De acuerdo a estas observaciones existe una relación directa entre el número de bivalentes bibraquiados y el número de COs. Esta relación no resulta tan clara en las aves, las cuales presentan múltiples COs por brazo en los bivalentes mayores y en las que existe una asimetría del cariotipo marcada, con la presencia de macro- y microcromosomas. Entre las especies estudiadas en el presente trabajo las variaciones en el NF no explican en todos los casos las diferencias en el número de focos de MLH1. Solamente en el pollo que presenta el NF mayor (NF=88), el número de eventos de recombinación también es más alto (62 focos en promedio) (Figura 31). Sin embargo, el número mayor de COs en esta especie no se explica solamente por un exceso de brazos con respecto a las demás, si no que el promedio de focos totales es mayor debido a la presencia más frecuente de dos focos entre los microbivalentes de mayor tamaño (Tabla 4, Resultados). La gallina de Guinea (NF=84) y el pollo tienen los NFs cercanos, pero esta homogeneidad del cariotipo no se ve reflejada en el número de COs, ya que en esta especie se observó el menor número de focos totales (44), aun teniendo en cuenta que el número cromosómico sólo difiere en un par de microcromosomas (2n= 76 vs 2n= 78 en el pollo) (Figura 31). Estos datos indican que el NF tiene menor impacto sobre el número de eventos de *crossing over* entre las aves que en otros organismos, aunque la posición del centrómero influye en la distribución de los eventos de recombinación a lo largo de los bivalentes como se discute a continuación.

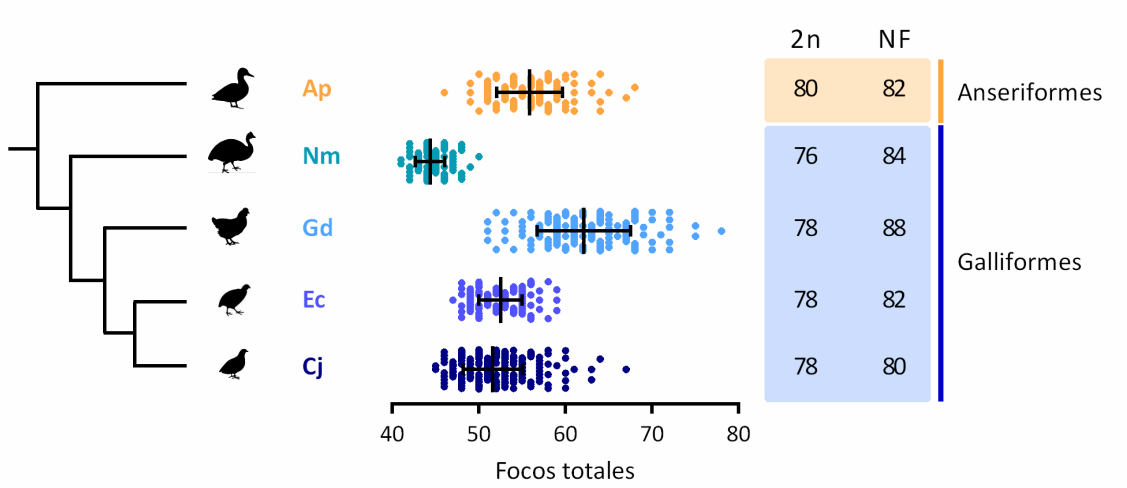


**Figura 31**: Número de focos totales en las 5 especies analizadas. Se muestra el número de focos de MLH1 totales promedio por núcleo con su desviación estándar, el número diploide (2n) y el número fundamental (NF). Ap: *A. platyrhynchos*. Nm: *N. meleagris*. Gd: *G. domesticus*. Ec: *E. chinensis*. Cj: *C. japonica*. Las ramas del árbol filogenético no son proporcionales a los tiempos de divergencia.

La TR puede variar substancialmente entre especies, entre individuos, entre sexos, y entre diferentes regiones del genoma. El análisis de los patrones de recombinación, tanto por métodos indirectos, como los mapas de ligamiento, como por métodos citológicos, idealmente acompañado por la secuenciación del genoma es una gran ventaja para el discernimiento de las bases genéticas de rasgos fenotípicos de diferentes organismos. Sin embargo, aunque las nuevas técnicas de NGS (secuenciación de nueva generación, en inglés *Next Generation Sequencing*) permiten secuenciar genomas completos de manera relativamente rápida, no es igualmente sencillo relacionar estas secuencias con la distribución del *crossing over* como puede hacerse mediante el análisis citológico de la recombinación. El mapeo citológico del *crossing over* permite analizar como ningún otro método la manera en que los eventos de recombinación se distribuyen a lo largo de los brazos cromosómicos, es decir los patrones de distribución de la recombinación. A nivel cromosómico, entre los factores que afectan y controlan los patrones de recombinación se encuentran el tamaño, la estructura primaria (presencia de heterocromatina y posición del centrómero), la organización de los lazos de cromatina durante la profase I cuando se inicia el *crossing over*, la dinámica de los movimientos cromosómicos durante la profase I, y ciertas modificaciones pos-traduccionales de la maquinaria recombinacional (revisado en Mezard *et al.* 2015). Las distribuciones de frecuencia de los eventos de recombinación en distintos organismos demuestran que el *crossing over* no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los brazos cromosómicos, sino

que existen regiones locales “calientes” y “frías”, es decir, regiones con frecuencias mayores o menores de recombinación, respectivamente.

El movimiento de los cromosomas durante la profase meiótica es una característica común entre los organismos eucariotas y parece ser un importante regulador de la recombinación meiótica (Parvinen y Soderstrom 1976; Scherthan *et al.* 1996; revisado en Woglar *et al.* 2013). Se han propuesto varias hipótesis respecto al movimiento de los cromosomas durante la profase I, como por ejemplo que favorece la búsqueda de homología, la eliminación del entrelazamiento entre los cromosomas, la eliminación de la recombinación ectópica, la remoción de la asociación entre los centrómeros no homólogos, y/o la remoción de asociaciones no deseadas entre la cromatina y la membrana nuclear (revisado en Koszul y Kleckner 2009; Pawlowski 2010; Woglar y Jantsch 2014). En el ser humano, los eventos de *crossing over* se localizan más frecuentemente en posiciones distales en los espermatocitos que en los ovocitos (Badge *et al.* 2000). Las razones de esta diferencia podrían relacionarse con patrones específicos de sexo en la sinapsis. En los espermatocitos, la sinapsis comienza cerca de los telómeros, y los NRs aparecen a continuación del comienzo de la sinapsis (Rasmussen y Holm 1978), mientras que en los ovocitos el inicio de la sinapsis es intersticial (Bojko 1983). Posiblemente algunos o todos los sitios de iniciación de la sinapsis se traducen a eventos de recombinación lo cual resulta en una localización de los COs más distal en los cromosomas de los varones con respecto a la localización de los COs en las mujeres (Lynn *et al.* 2004). Por lo tanto, la mayor proporción de eventos de recombinación en los extremos de los bivalentes aparentemente puede deberse a su participación temprana en el apareamiento de los cromosomas (Scherthan *et al.* 1996; Zickler y Kleckner 1999).

En la mayoría de las especies analizadas se observaron focos de MLH1 en casi todos los intervalos establecidos a lo largo de los brazos de los macrobivalentes, excepto en la gallina de Guinea como se discute en secciones posteriores. El tamaño de los intervalos utilizados para la construcción de los histogramas (0.6 µm) es una distancia que puede medirse al microscopio de fluorescencia con la metodología empleada y representaría en promedio unas 3.8 Mb suponiendo una distribución homogénea del ADN a lo largo de los CSs. Esto significa que el número de meiosis analizado es suficiente como para caracterizar la distribución del *crossing over* en los diferentes macrobivalentes con este nivel de resolución. La distribución de los focos de MLH1 en las cinco especies analizadas en el presente trabajo muestra que se reproduce un patrón que varía según la morfología cromosómica, una característica que también se ha observado en otros organismos (Froenicke *et al.* 2002; Sun *et al.* 2006; Borodin *et al.* 2009; Mary *et al.* 2014). En los macrobivalentes de las especies analizadas se observa una frecuencia mayor de COs en las regiones subteloméricas. En los bivalentes bibraquiados,

además, el *crossing over* se distribuye de manera bimodal o multimodal en las regiones intersticiales de cada brazo, mientras que en la región pericentromérica hay una disminución de la frecuencia de COs. En la mayoría de los bivalentes acrocéntricos no se observaron focos en los bazos cortos debido a que están formados mayoritariamente por heterocromatina (Stock y Bunch 1982; Wojcik y Smalec 2007). Asimismo, en estos bivalentes se observó una frecuencia mayor de recombinación en un rango de 2 a 4 intervalos cercanos al centrómero en el brazo largo, una característica que contrasta con la reducción de la recombinación en los intervalos proximales al centrómero en los bivalentes bibraquiados (Figura 32).

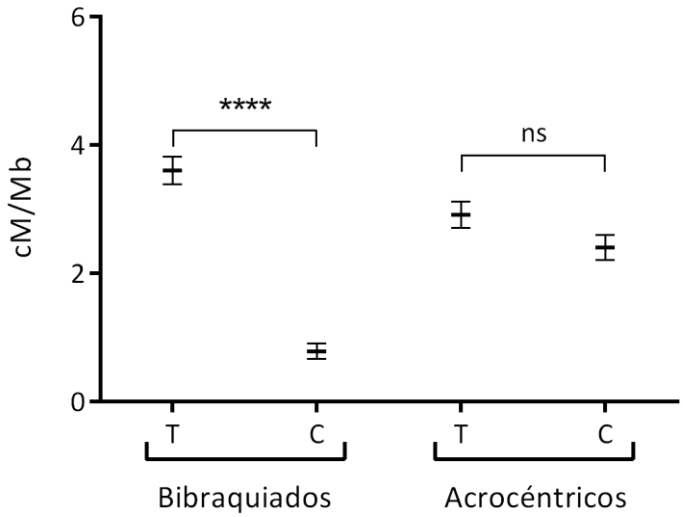


**Figura 32**: Variación del patrón de recombinación en bivalentes bibraquiados vs acrocéntricos. En el gráfico se representan las frecuencias de recombinación promedio (cM/Mb) en los cuatro intervalos más próximos a los telómeros (T) o al centrómero (C) de los bivalentes bibraquiados y acrocéntricos de las cinco especies. En los bivalentes bibraquiados existen diferencias significativas en las frecuencias de recombinación entre ambas regiones (*Test* de Mann Whitney, P<0.0001). En cambio, no se observaron diferencias significativas de recombinación entre las regiones centroméricas y teloméricas de los bivalentes acrocéntricos (*Test* de Mann Whitney, P=0.0882). ns: no significativo. ****: P<0.0001.

La similitud de los patrones de recombinación observados en cromosomas con morfologías similares refuerza la idea de que la arquitectura cromosómica influye en la localización de los eventos de recombinación. Esta influencia se produce conjuntamente con otros factores, como ser la distribución de "*hotspots"*, el contenido de bases del ADN y las modificaciones epigenéticas que actúan a menor escala modulando la distribución del *crossing over*.

En otros organismos, como el tomate y la cebada se ha postulado que la presencia de abundante heterocromatina pericentromérica, es la causa de la disminución drástica del

*crossing over* en regiones cercanas al centrómero y la localización marcada de los COs hacia las regiones eucromáticas (Devaux *et al.* 1995; Sherman y Stack 1995). Las diferencias en los niveles de recombinación en la región pericentromérica en bivalentes bibraquiados vs. acrocéntricos observadas en el presente trabajo indican que la morfología cromosómica influye también en la dinámica de formación del *crossing over*, y con ello en su distribución. Esta explicación es más probable que la influencia de la heterocromatina en la reducción de la recombinación alrededor del centrómero, ya que en las aves analizadas la cantidad de heterocromatina -estimada por bandeo C- en los macrobivalentes bibraquiados y en los acrocéntricos no difiere sustancialmente (Stock y Bunch 1982; Schmid *et al.* 1989; Wojcik y Smalec 2007). En otras especies de aves, como la paloma y el diamante mandarín, los macrocromosomas acrocéntricos también presentan niveles de recombinación elevados en la zona cercana al centrómero en comparación con los bivalentes bibraquiados, aunque la cantidad de heterocromatina pericentromérica es similar en todos los macrocromosomas (Pigozzi y Solari 1999b; Calderón y Pigozzi 2006).

En mamíferos como *Mus musculus* y *Sorex araneus*, entre los cuales son frecuentes las translocaciones Robertsonianas se observa una reducción en el número de eventos de recombinación proximales y una distribución hacia la región distal en los bivalentes homocigotas metacéntricos con respecto a los bivalentes acrocéntricos (Bidau *et al.* 2001; Dumas y Britton-Davidian 2002; Merico *et al.* 2003; Pigozzi *et al.* 2005; Borodin *et al.* 2008). A partir de estas observaciones se ha postulado que las diferencias de distribución del *crossing over* se deben a la modificación de la estructura de los cromosomas como consecuencia de la translocación (Dumas *et al.* 2015).

Dentro del núcleo en profase meiótica, la asociación espacial de los bivalentes acrocéntricos es diferente que la de los cromosomas bibraquiados (Berrios *et al.* 2014). Esta característica, en combinación con los movimientos cromosómicos durante la búsqueda de homología en la profase I, serían determinantes en las diferencias de distribución del *crossing over* en bivalentes con diferente morfología.

En resumen, aunque la presencia de grandes bloques de heterocromatina es la explicación más probable para la supresión de la recombinación en la zona pericentromérica en ciertos organismos, en las aves la variación en los patrones de recombinación es más consistente con un efecto de la morfología cromosómica en el proceso de formación de los COs, como se ha propuesto para ciertos mamíferos.

## IV.6. Presencia de dos patrones de recombinación

Los análisis citológicos de la recombinación, especialmente los que han utilizado la inmunodetección de MLH1, han demostrado que la morfología cromosómica puede influir en la distribución del *crossing over*, aunque los eventos de recombinación siguen una distribución que es específica para cada bivalente. Estas observaciones se repiten en diferentes vertebrados, como por ejemplo algunos peces (Moens 2006), la musaraña común (Borodin *et al.* 2008), el ratón (Anderson *et al.* 1999; Froenicke *et al.* 2002), el ser humano (Barlow y Hultén 1998a; Lynn *et al.* 2002; Tease *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Sun *et al.* 2006) y la mayoría de las aves estudiadas hasta el momento (Pigozzi y Solari 1999a, b; Rodionov y Chechik 2002).

Independientemente de la morfología cromosómica, en el pollo, las codornices y el pato, los eventos de recombinación se distribuyen a lo largo de todas las regiones intersticiales de los brazos cromosómicos, con diferencias interespecíficas en la frecuencia de focos por intervalo. A diferencia de las demás especies estudiadas, en *N. meleagris* se observó una marcada localización de la recombinación en los extremos de los macrobivalentes con la presencia de regiones intersticiales con escasos o ningún foco. El número de focos en los macrobivalentes de esta especie es marcadamente inferior en comparación con el pollo. Esta diferencia es más notable en los macrobivalentes más largos, como el CS1 que presenta 1 a 4 focos en la gallina de Guinea, y 3 a 11 focos en el pollo, mientras que las diferencias se atenúan en los macrobivalentes de menor tamaño como el CS6 (Figura 33).

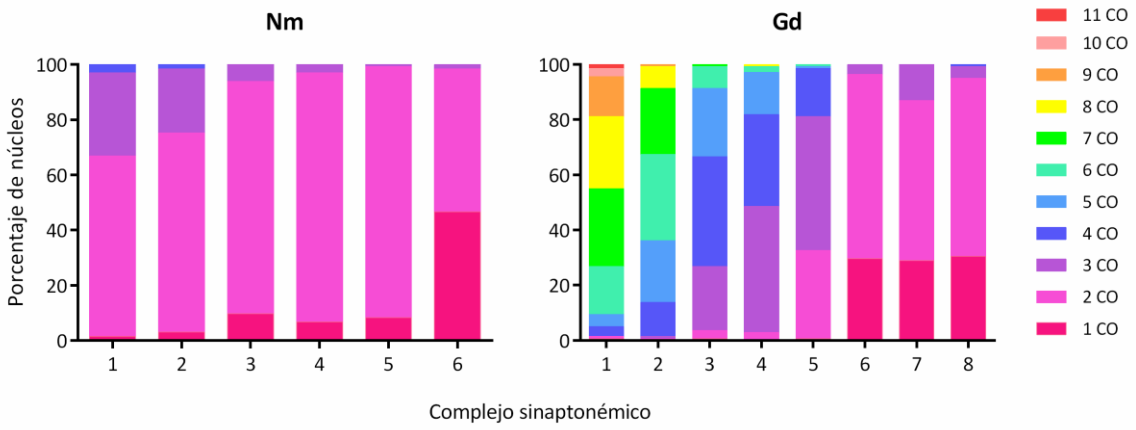


**Figura 33**: Distribución (como porcentaje de núcleos analizados) de los focos de MLH1 en los macrobivalentes de *N. meleagris* (Nm) y *G. domesticus* (Gd). Se puede observar una marcada diferencia en el número de focos observado por bivalente en cada una de las especies.

El número de núcleos examinados en la gallina de Guinea es similar al de las demás especies analizadas por lo cual el escaso número de COs en las regiones intersticiales no puede atribuirse a un tamaño insuficiente de la muestra. Esta distribución de los eventos de recombinación se aparta del patrón general observado en las otras especies analizadas, y no se correlaciona con características excepcionales de la arquitectura cromosómica de los bivalentes en la gallina de Guinea ya que el patrón de bandas G es similar al del pollo y la heterocromatina está confinada sobre todo a los centrómeros y a algunos macrobivalentes de manera similar a lo observado en otros Galliformes (Stock y Bunch 1982; Shibusawa *et al.* 2002). Más aún, el pintado cromosómico con sondas para cromosomas del pollo y la localización por FISH de secuencias únicas ha demostrado la conservación a nivel genómico entre ambas especies (Shibusawa *et al.* 2002). Es interesante destacar que este número comparativamente menor de focos en los bivalentes 1-6 de la gallina de Guinea no se corresponde con una disminución en el contenido de ADN, que en esta especie es muy similar a la de las otras cuatro especies analizadas, y que, además, el porcentaje que representan los seis CSs mayores con respecto al set total es muy similar al del pollo que tiene más del doble de focos en estos bivalentes (ver Resultados, Sección III.4.b).

Un patrón similar de localización extrema del *crossing over* fue descripto en el diamante mandarín, una especie del orden Passeriformes, separado del linaje ancestral de las Galliformes hace 90-100 millones de años (Hedges *et al.* 2015). En el diamante mandarín se observan TRs elevadas de aproximadamente 5-10 cM/Mb en los intervalos cercanos a los extremos de los cromosomas (5-20 Mb distales), mientras que existen “desiertos” de recombinación en la región central de los cromosomas (Calderón y Pigozzi 2006; Backström *et al.* 2010). Tanto en el diamante mandarín como en la gallina de Guinea, este patrón característico lleva a la forma sigmoidea particular de las distancias genéticas acumulativas a lo largo de los macrocromosomas (ver Figura 24 y Calderón y Pigozzi 2006; Pigozzi 2008; Backström *et al.* 2010). Cerca del 90% del total de los eventos de recombinación en el diamante mandarín se concentran en aproximadamente el 23% del genoma. En los tres cromosomas mayores, que poseen un tamaño entre 110-150 Mb, el desierto de recombinación tiene una extensión de aproximadamente 100 Mb con una tasa promedio de aproximadamente 0.1 cM/Mb. La extensión de los desiertos de recombinación decrece al disminuir el tamaño cromosómico, hasta prácticamente desaparecer en los cromosomas de un tamaño menor a 20 Mb (Backström *et al.* 2010). En los tres primeros bivalentes de *N. meleagris*, que tienen un tamaño entre 90-160 Mb (ver Tabla 10, Sección III.4.b de los Resultados), el desierto de recombinación se extiende aproximadamente por 95 Mb con una TR promedio de 0.1 cM/Mb. Los motivos de la existencia de patrones de recombinación tan

divergentes, aún en especies relativamente cercanas filogenéticamente no se conocen aún. En las aves, los sitios con mayor nivel de recombinación a nivel de kb (*hotspots*) están asociados a secuencias funcionales, como ser secuencias reguladoras o génicas, y no dependen de modificaciones epigenéticas de la cromatina como ocurre en los mamíferos (Singhal *et al.* 2015). La existencia de patrones de recombinación tan diferentes entre los paseriformes en comparación con el pollo y las codornices, entre otras aves, podrían deberse a diferentes historias evolutivas, que hayan conducido a la selección de rasgos beneficiosos en relación con diferentes TRs.

En conjunto, los análisis citológicos y moleculares de la recombinación indican que existen al menos dos patrones diferentes de la distribución del *crossing over* en las aves: uno con un mayor número de eventos de recombinación por unidad de CS/Mb y sin localización, y otro patrón con menor TR y una marcada localización de la recombinación. Estas diferencias no se relacionan con el status taxonómico de las especies. Como se ha demostrado en el presente trabajo, *N. meleagris* y *G. domesticus* presentan patrones de recombinación divergentes a pesar de su cercanía evolutiva dentro del orden Galliformes. Aunque la distribución de los eventos de recombinación varía entre especies, la localización extrema observada en la gallina de Guinea es inusual entre las Galliformes. Incluso podría ser inusual dentro de las Galloanserae, teniendo en cuenta que en *A. platyrhynchos* la distribución de la recombinación es más homogénea en los segmentos intersticiales de los macrobivalentes. Las causas de la distribución de los COs son complejas por lo que resulta difícil proponer una explicación a esta aparente excepcionalidad de la recombinación entre las Galloanserae, pero son indicativas de que la localización y la frecuencia del *crossing over* puede variar en tiempos evolutivamente cortos, y sin que medien cambios drásticos de la estructura del cariotipo.

### IV.7. Relación entre filogenia y *crossing over*

Durante el proceso evolutivo, las TRs entre un par de loci pueden variar mediante dos mecanismos principales: la ocurrencia de rearreglos genómicos que modifican su localización física, o los cambios en la frecuencia de *crossing over* entre loci ligados (revisado en Ortiz-Barrientos *et al.* 2016). Las TRs varían como resultado de rearreglos cromosómicos, como ser inversiones, fusiones y translocaciones cromosómicas porque estos cambios introducen nuevas relaciones de ligamiento. Adicionalmente, la frecuencia de los eventos de *crossing over* puede ser regulada por modificaciones epigenéticas de la cromatina como ocurre en los mamíferos, donde la selección de los *hotspots* de la recombinación dependen de la proteína

específica de la meiosis PRDM9 (Baudat *et al.* 2010; Myers *et al.* 2010). Distintos alelos de Prdm9, u otros modificadores de la recombinación, pueden producir cambios en las TRs entre loci que estén bajo selección natural directa.

Entre los vertebrados, las TRs han sido analizadas de manera más exhaustiva en los mamíferos, encontrándose variaciones entre 0.2-1.0 cM/Mb a lo largo de la filogenia, con los marsupiales en el extremo inferior y el ser humano en el extremo superior (Jensen-Seaman *et al.* 2004; Dumont y Payseur 2008; Samollow 2008). En las aves, las TRs se han estudiado principalmente en especies domésticas de interés comercial y en algunas Passeriformes que son modelo de estudio de poblaciones en genética ecológica. Los análisis de la recombinación se han realizado utilizando diferentes aproximaciones metodológicas como ser mediante análisis de ligamiento en *pedigrees*, comparación de variabilidad interpoblacional de SNPs (polimorfismos de nucleótido simple, en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) o distintos estudios citológicos (revisado en Ellegren 2013; Pigozzi 2016). Se ha demostrado que en *G. domesticus*, a nivel genómico global, las TRs son relativamente constantes y en promedio mayores que en los mamíferos (Rodionov *et al.* 1992b; Groenen *et al.* 2009). En parte, estas TRs más elevadas entre las aves se deben a la presencia de numerosos microcromosomas y al requerimiento de un CO por bivalente que garantice una correcta disyunción. Los resultados de la presente tesis indican que las TRs dentro del clado Galloanserae también son mayores que en los mamíferos, incluso si se consideran sólo los eventos de recombinación en los macrocromosomas (Figura 34). En algunas especies de Passeriformes diferentes estudios, muestran que las TRs son menores que en el pollo, aunque estos análisis no se extienden a todo el genoma sino a ciertas regiones de interés que podrían no comprender los segmentos genómicos con recombinación más elevada. (Backström *et al.* 2010; van Oers *et al.* 2014). Aun así, las TRs más bajas observadas en la mayoría de aves son mayores que las observadas entre los mamíferos, o son iguales. Muy similar a la tasa de recombinación observada en el ser humano (1.0 cM/Mb) es la encontrada en los macrocromosomas de la gallina de Guinea. En esta especie, de manera similar a lo que ocurre en la mayoría de los mamíferos, el número de COs en los macrobivalentes corresponde aproximadamente al NF, es decir, que se observa un CO por brazo cromosómico. En conjunto, diferentes abordajes indican que las TRs globales en las aves son mayores que en los mamíferos, incluso si se consideran solamente los macrobivalentes.

Del presente estudio surge que las TRs en las aves oscilan entre 1.4-3.1 cM/Mb (Figura 34), un rango comparativamente más acotado que el observado en los mamíferos que es de 0.2-1.0 cM/Mb (Jensen-Seaman *et al.* 2004; Dumont y Payseur 2008; Samollow 2008). Esto podría deberse a los diferentes mecanismos moleculares involucrados en la designación de los

*hotspots* de recombinación en estos dos grupos taxonómicos. En el ser humano y el ratón, entre otros mamíferos, se ha demostrado que los *hotspots*, contienen sitios de unión a la proteína PRDM9, una proteína meiótica con un dominio de dedos de zinc muy variable, que reconoce secuencias específicas y cataliza la metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me) en la cercanía. Dado que la reparación de las DSBs durante la recombinación meiótica involucra el copiado de información del cromosoma homólogo, con el tiempo, los *hotspots* originales son reemplazados por regiones "frías" que reducen las DSBs en el mismo sitio. En consecuencia, en los primates y el ratón se ha observado un rápido reciclado de los *hotspots* a nivel de especies, poblaciones e incluso entre individuos (Lichten 2015). Las aves carecen de la proteína PRDM9, y los *hotspots* se encuentran asociados a regiones funcionales como ser, promotores génicos, que probablemente permiten un mayor acceso a la maquinaria de la recombinación (Singhal *et al.* 2015). Por este motivo, a diferencia de los mamíferos, los *hotspots* tienden a ser estables en el genoma de las aves debido a que contienen elementos genómicos que están bajo selección funcional (Singhal *et al.* 2015). Esta hipótesis coincide con resultados obtenidos en la levadura *S. cerevisiae*, donde la recombinación se concentra en regiones funcionales y los *hotspots* son estables en intensidad y localización por decenas de millones de años (Lam y Keeney 2015).

Como se mencionó anteriormente, las TRs globales en las aves muestran menor rango de variación que entre los mamíferos, incluso entre clados separados por más de 80 millones de años de divergencia evolutiva como son Galloanserae y Passeriformes (Figura 34). Más aún, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que *Rhea americana* (Ratites, Palaeognathae) - descendiente de la primera radiación evolutiva de las aves - tiene una TR promedio muy similar a la del pato (del Priore y Pigozzi, datos no publicados). Con estas evidencias se propone que las TRs genómicas en las aves son menos variables que en los mamíferos debido a las restricciones impuestas por la estabilidad evolutiva de los *hotspots* dentro de este grupo de vertebrados.

La evolución de las TRs es un tema escasamente explorado y entre los vertebrados se ha analizado solamente en algunos grupos de mamíferos (Dumont y Payseur 2008; Segura *et al.* 2013). El análisis de 22 especies de mamíferos, pertenecientes a 8 órdenes, muestra que hay una correlación negativa entre las TRs y el tiempo de divergencia de los principales grupos taxonómicos de los mamíferos, es decir, que aquellos grupos más basales tienen menores TRs que aquellos grupos más derivados (Segura *et al.* 2013). Es decir que entre los mamíferos hay fuerte efecto filogenético en la TR, de manera que especies evolutivamente más cercanas tienen TRs promedio similares.

Cuando se relacionan las TRs con los tiempos de divergencia evolutiva en las aves, resulta notorio que especies de órdenes diferentes, con divergencias evolutivas mayores, tienen TRs más similares que especies dentro de un mismo orden y con tiempos de divergencia menores (Figura 34). Como se demostró en este trabajo y se discutió anteriormente, hay una notoria diferencia en el número focos de MLH1 en dos especies de Galliformes con amplia similitud cariotípica y genómica como son el pollo y la gallina de Guinea. De manera similar, también se registran diferencias en las TRs entre dos especies de Anseriformes como son el pato y el ganso, *Anser anser* (Torgasheva 2016). Mientras tanto, las TRs son similares en el pato y ciertas Galliformes como las dos especies de codorniz analizadas. El tiempo de divergencia evolutiva de Numididae (gallina de Guinea) y Phasianidae (pollo) es de aproximadamente 47 millones de años, mientras que entre los Galliformes y Anseriformes es de alrededor de 80 millones de años (http://www.timetree.org/, Hedges *et al.* 2015). El recuento de los focos de MLH1 ha permitido demostrar que dos especies del mismo orden (Galliformes) –pollo y la gallina de Guinea- presentan mayores diferencias en sus TRs que especies pertenecientes a dos órdenes diferentes (Galliformes y Anseriformes) como son el pato y la codorniz. Debe tenerse en cuenta que los tiempos de generación son similares en casi todas las especies analizadas (Eyre-Walker y Keightley 1999) por lo cual este factor no afectaría las TRs efectivas a lo largo del tiempo evolutivo. Una situación similar se observa cuando se incluyen las TRs de las Passeriformes, especies que pertenecen a la radiación evolutiva más reciente: el diamante mandarín (*T. guttata*), por ejemplo, tienen niveles de recombinación similares al de la gallina de Guinea, e incluso un patrón de distribución del CO similar como se discutió anteriormente. Sin embargo, la TR del diamante mandarín difiere notablemente de la de otros Passeriformes como *Parus major* (Figura 34).

Este trabajo es el primero que examina de manera sistemática la relación entre las TRs dentro de la filogenia de las Aves. Los resultados obtenidos, junto con los datos precedentes mencionados en otras especies de aves, constituyen la primera evidencia que apoya la idea de que en las aves, a diferencia de los mamíferos, no hay una señal filogenética en las TRs.

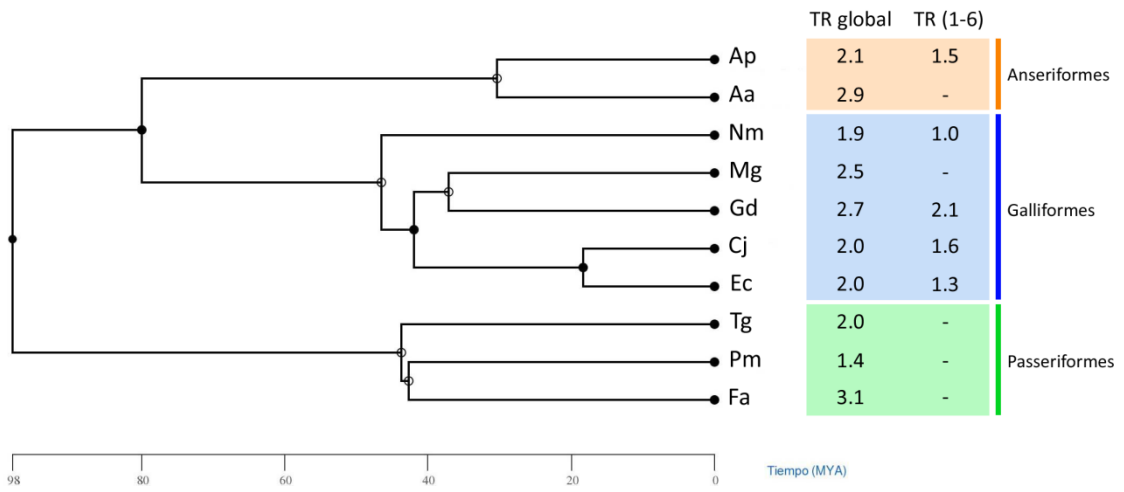


**Figura 34**: Tasa de recombinación y relaciones filogenéticas dentro y entre tres órdenes de la clase Aves. Hay una mayor variación en la tasa de recombinación (TR) global dentro de órdenes que entre órdenes diferentes. Particularmente en las especies analizadas en este trabajo, las diferencias son más notorias cuando se considera la TR de los macrobivalentes 1 a 6. Se tomaron los datos de las TRs disponibles en la bibliografía del pavo común (*Meleagris gallopavo*, Galliformes), del ganso común (*Anser anser*, Anseriformes) y de tres especies pertenecientes al orden Passeriformes (*Taeniopygia guttata*, *Parus major* y *Ficedula albicollis*) (Aslam *et al.* 2010; Backström *et al.* 2010; Kawakami *et al.* 2014; van Oers *et al.* 2014; Torgasheva 2016). El árbol filogenético fue construido utilizando una herramienta online para la construcción de árboles que tiene en cuenta los diferentes análisis de las relaciones filogenéticas disponibles en la literatura (www.timetree.org, Hedges *et al.* 2015). Ap: *Anas platyrhynchos*. Aa: *Anser anser*. Nm: *Numida meleagris*. Mg: *Meleagris gallopavo*. Gd: *Gallus domesticus*. Cj: *Coturnix japonica*. Ec: *Excalfactoria chinensis*. Tg: *Taeniopygia guttata*. Pm: *Parus major*. Fa: *Ficedula albicollis*.

# V. Conclusiones

La correspondencia entre el cariotipo mitótico y el de los CSs indica que las posiciones relativas de las secuencias de ADN a lo largo de los cromosomas mitóticos y en paquitene son aproximadamente co-lineales. Esta relación co-lineal permitiría extrapolar posiciones entre los cromosomas mitóticos y los CSs. Teniendo en cuenta esta proporcionalidad, podría predecirse la posición física de un marcador mapeado genéticamente, utilizando el mapa de MLH1-cM, ya que estos mapas de la recombinación se construyen a partir del recuento de los eventos de *crossing over* mapeados sobre los CSs.

Las aves tienen mayores tasas de recombinación que otros vertebrados. Esta mayor tasa de recombinación mayor se debe en parte al *crossing over* obligatorio de los microcromosomas, pero también a que el número de eventos de *crossing over* en los macrobivalentes excede el número de brazos cromosómicos en la mayoría de las especies.

El análisis de la recombinación mediante el recuento de focos de MLH1 ofrece un medio confiable para estimar la recombinación en las aves así como en otras especies, dado que los focos de MLH1 representan todos o la mayoría de los eventos de *crossing over*, de manera similar a los quiasmas en diacinesis y los NR durante el paquitene. Una prueba adicional de la fiabilidad de los focos de MLH1 como marcadores del *crossing over* en las aves es la concordancia entre la distancia genética obtenida en el último mapa ligamiento de hembras del pollo y la distancia genética obtenida mediante el recuento de focos de MLH1 en los ovocitos en el presente trabajo.

Las diferencias en las longitudes de mapa obtenidas para la codorniz y el pato mediante el recuento de focos de MLH1 y los análisis de ligamiento respectivos se deben a que los mapas de ligamiento no tienen aún una densidad de marcadores suficientes. El recuento citológico de los eventos de recombinación representa un método eficaz para determinar la longitud de mapa esperable para una especie determinada y debería tenerse en cuenta al momento de construir un mapa de ligamiento.

La distribución diferencial de la recombinación entre bivalentes bibraquiados y bivalentes acrocéntricos indica que la morfología cromosómica influye en la distribución de los COs, más allá de los factores a micro-escala como ser la distribución de *hotspots* o el contenido de bases del ADN.

La existencia de niveles similares de recombinación entre machos y hembras de las aves parece ser una característica compartida entre especies de diferentes órdenes.

En la gallina de Guinea, el número de eventos de recombinación y su patrón de distribución difieren con respecto a las otras tres especies de Galliformes analizadas. Puesto que las demás especies pertenecen a la familia Phasianidae, se infiere que las diferencias surgieron en la familia Numididae luego de la divergencia de ambos linajes.

En las aves, las tasas de recombinación no muestran una asociación marcada con la filogenia, ya que se observan variaciones similares de los niveles de *crossing over* entre especies de un mismo orden, independientemente de que los órdenes pertenezcan a las primeras radiaciones de la filogenia aviaria, o a radiaciones más recientes.

Las tasas globales de recombinación en las aves varían dentro un rango más acotado que en los mamíferos. Esto podría deberse a que ambos grupos difieren en cuanto los mecanismos de control de selección de los *hotspots* de recombinación. En las aves, esta selección no depende de modificaciones epigenéticas de la cromatina, si no que los eventos de recombinación se asocian de manera preferencial a secuencias funcionales. En consecuencia, las variaciones genómicas que afecten a estos *hotspots* podrían ser seleccionadas negativamente, restringiendo la variación de las tasas de recombinación.

# VI. Bibliografía

Agarwal S.y Roeder G.S. (2000) Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* **102**, 245-55.

Al-Jaru A., Goodwin W., Skidmore J.y Khazanehdari K. (2014) Distribution of MLH1 foci in horse male synaptonemal complex. *Cytogenet Genome Res* **142**, 87-94.

Albini S.M.y Jones G.H. (1987) Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. *Chromosoma* **95**, 324-38.

Anderson L.K., Doyle G.G., Brigham B.*, et al.* (2003) High-resolution crossover maps for each bivalent of *Zea mays* using recombination nodules. *Genetics* **165**, 849-65.

Anderson L.K., Lohmiller L.D., Tang X.*, et al.* (2014) Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13415-20.

Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M.y Ashley T. (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* **151**, 1569-79.

Anderson L.K., Salameh N., Bass H.W., Harper L.C., Cande W.Z., Weber G.y Stack S.M. (2004) Integrating genetic linkage maps with pachytene chromosome structure in maize. *Genetics* **166**, 1923-33.

Anderson L.K.y Stack S.M. (1988) Nodules associated with axial cores and synaptonemal complexes during zygotene in *Psilotum nudum*. *Chromosoma* **97**, 96-100.

Anderson L.K.y Stack S.M. (2005) Recombination nodules in plants. *Cytogenet Genome Res* **109**, 198-204.

Andersson L.y Sandberg K. (1984) Genetic linkage in the horse. II. Distribution of male recombination estimates and the influence of age, breed and sex on recombination frequency. *Genetics* **106**, 109-22.

Andrews C., Mackenzie S.y Gregory T.R. (2009) Genome size and wing parameters in passerine birds. *Proc. R. Soc. B* **276**, 55–61.

Ansari H.A., Takagi N.y Sasaki M. (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet.Cell Genet* **47**.

Aslam M.L., Bastiaansen J.W., Crooijmans R.P., Vereijken A., Megens H.-J.y Groenen M.A. (2010) A SNP based linkage map of the turkey genome reveals multiple intrachromosomal rearrangements between the turkey and chicken genomes. *BMC Genomics* **11**, 1-11.

Backström N., Fagerberg S.y Ellegren H. (2008a) Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Mol.Ecol.* **17**, 964-80.

Backström N., Forstmeier W., Schielzeth H.*, et al.* (2010) The recombination landscape of the zebra finch *Taeniopygia guttata* genome. *Genome Res* **20**, 485-95.

Backström N., Karaiskou N., Leder E.H., Gustafsson L., Primmer C.R., Qvarnström A.y Ellegren H. (2008b) A Gene-Based Genetic Linkage Map of the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*) Reveals Extensive Synteny and Gene-Order Conservation During 100 Million Years of Avian Evolution. *Genetics* **179**, 1479-95.

Badge R.M., Yardley J., Jeffreys A.J.y Armour J.A.L. (2000) Crossover breakpoint mapping identifies a subtelomeric hotspot for male meiotic recombination. *Hum Mol Genet* **9**, 1239-44.

Bailey-Wilson J.E.y Wilson A.F. (2011) Linkage analysis in the next-generation sequencing era. *Hum Hered* **72**, 228-36.

Baker S.M., Plug A.W., Prolla T.A.*, et al.* (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat.Genet.* **13**, 336-42.

Bardhan A., Chuong H.y Dawson D.S. (2010) Meiotic cohesin promotes pairing of nonhomologous centromeres in early meiotic prophase. *Mol Biol Cell* **21**, 1799-809.

Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M.*, et al.* (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* **6**, 227-35.

Barlow A.L.y Hultén M.A. (1998a) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* **6**, 27-38.

Barlow A.L.y Hultén M.A. (1998b) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur.J.Hum.Genet.* **6**, 350-8.

Barnes M.R. (2003) Genetic and physical map resources – an integrated view. In: *Bioinformatics for Geneticists* (pp. 143-61. John Wiley & Sons, Ltd.

Basheva E.A., Bidau C.J.y Borodin P.M. (2008) General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization. *Chromosome Res* **16**, 709-19.

Baudat F., Buard J., Grey C*., et al.* (2010) PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327**, 836-40.

Berchowitz L.E.y Copenhaver G.P. (2010) Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr Genomics* **11**, 91-102.

Berchowitz L.E., Francis K.E., Bey A.L.y Copenhaver G.P. (2007) The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet* **3**, e132.

Bergerat A., de Massy B., Gadelle D., Varoutas P.C., Nicolas A.y Forterre P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414-7.

Berrios S., Manieu C., Lopez-Fenner J*., et al.* (2014) Robertsonian chromosomes and the nuclear architecture of mouse meiotic prophase spermatocytes. *Biol Res* **47**, 16.

Bidau C.J., Gimenez M.D., Palmer C.L.y Searle J.B. (2001) The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* **87**, 305-13.

Bishop D.K. (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* **79**, 1081-92.

Bishop D.K., Park D., Xu L.y Kleckner N. (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-56.

Bojko M. (1983) Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Research Communications* **48**, 457-83.

Bojko M. (1985) Human meiosis IX: Crossing over and chiasma formation in oocytes. *Carlsberg Res Commun* **50**, 43-72.

Borodin P., Karamysheva T.y Rubtsov N. (2007) Immunofluorescent analysis of meiotic recombination in the domestic cat. *Cell and Tissue Biology* **1**, 503-7.

Borodin P.M., Basheva E.A.y Zhelezova A.I. (2009) Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*). *Anim Genet* **40**, 235-8.

Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M., Torgasheva A.A., Rubtsov N.B.y Searle J.B. (2008) Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). *Genetics* **178**, 621-32.

Burt A., Bell G.y Harvey P.H. (1991) Sex-differences in recombination. *JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY* **4**, 259-77.

Calderón P.L.y Pigozzi M.I. (2006) MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. *Chromosome.Res.* **14**, 605-12.

Callan H.G. (1982) The Croonian Lecture, 1981. Lampbrush chromosomes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **214**, 417-48.

Callan H.G.y Perry P.E. (1977) Recombination in male and female meiocytes contrasted. *Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol.Sci.* **277**, 227-33.

Capanna E., Civitelli M.y Martinico E. (1987) I cromosomi degli uccelli, citotassonomia ed evoluzione cariotipica. *Avocetta* **11**, 101-43.

Carpenter A.T. (1975a) Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. I. Structure, arrangement, and temporal change of the synaptonemal complex in wild-type. *Chromosoma* **51**, 157-82.

Carpenter A.T.C. (1975b) Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II: The recombination nodule—a recombination-associated structure at pachytene? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**, 3186-9.

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

Codina-Pascual M., Campillo M., Kraus J., Speicher M.R., Egozcue J., Navarro J.y Benet J. (2006) Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol.Hum.Reprod.* **12**, 123-33.

Copeland N.G., Jenkins N.A., Gilbert D.J.*, et al.* (1993) A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science* **262**, 57-66.

Costa Y., Speed R., Ollinger R.*, et al.* (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J.Cell Sci.* **118**, 2755-62.

Chang S.B., Anderson L.K., Sherman J.D., Royer S.M.y Stack S.M. (2007) Predicting and testing physical locations of genetically mapped loci on tomato pachytene chromosome 1. *Genetics* **176**, 2131-8.

Chelysheva L., Grandont L., Vrielynck N., le Guin S., Mercier R.y Grelon M. (2010) An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenet Genome Res* **129**, 143-53.

Chelysheva L., Vezon D., Chambon A.*, et al.* (2012) The *Arabidopsis* HEI10 is a new ZMM protein related to Zip3. *PLoS Genet* **8**, e1002799.

Chua P.R.y Roeder G.S. (1998) Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* **93**, 349-59.

de Boer E.y Heyting C. (2006) The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma* **115**, 220-34.

de la Fuente R., Manterola M., Viera A., Parra M.T., Alsheimer M., Rufas J.S.y Page J. (2014) Chromatin organization and remodeling of interstitial telomeric sites during meiosis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Genetics* **197**, 1137-51.

de la Seña C.A., Fechheimer N.S.y Nestor K.E. (1991) Variability of C-banding patterns in Japanese quail chromosomes. *Genome* **34**, 993-7.

de los Santos T., Hunter N., Lee C., Larkin B., Loidl J.y Hollingsworth N.M. (2003) The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* **164**, 81-94.

del Priore L.y Pigozzi M.I. (2015a) Heterologous synapsis and crossover suppression in heterozygotes for a pericentric inversion in the zebra finch. *Cytogenet Genome Res*.

del Priore L.y Pigozzi M.I. (2015b) Sex-specific recombination maps for individual macrochromosomes in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Chromosome Res* **23**, 199-210.

Derjusheva S., Kurganova A., Habermann F.y Gaginskaya E. (2004) High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome.Res.* **12**, 715-23.

Devaux P., Kilian A.y Kleinhofs A. (1995) Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived, doubled haploid populations. *Molecular and General Genetics MGG* **249**, 600-8.

Dobson M.J., Pearlman R.E., Karaiskakis A., Spyropoulos B.y Moens P.B. (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *Journal of cell science* **107**, 2749-60.

Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H.y Greilhuber J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* **51**, 127-8.

Dumas D.y Britton-Davidian J. (2002) Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. *Genetics* **162**, 1355-66.

Dumas D., Catalan J.y Britton-davidian J. (2015) Reduced recombination patterns in Robertsonian hybrids between chromosomal races of the house mouse: chiasma analyses. *Heredity* **114**, 56-64.

Dumont B.L., Broman K.W.y Payseur B.A. (2009) Variation in genomic recombination rates among heterogeneous stock mice. *Genetics* **182**, 1345-9.

Dumont B.L.y Payseur B.A. (2008) Evolution of the genomic rate of recombination in mammals. *Evolution* **62**, 276-94.

Edelmann W., Cohen P.E., Kane M.*, et al.* (1996) Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* **85**, 1125-34.

Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E.y Heyting C. (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J.Cell Biol.* **160**, 657-70.

Ellegren H. (2005) The avian genome uncovered. *Trends Ecol.Evol.* **20**, 180-6.

Ellegren H. (2013) The Evolutionary Genomics of Birds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **44**, 28.1–.1.

Evans E.P., Breckon G.y Ford C.E. (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* **3**, 289-94.

Eyre-Walker A.y Keightley P.D. (1999) High genomic deleterious mutation rates in hominids. *Nature* **397**, 344-7.

Fawcett D.W. (1956) The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 403-6.

Fresard L., Leroux S., Dehais P.*, et al.* (2012) Fine mapping of complex traits in non-model species: using next generation sequencing and advanced intercross lines in Japanese quail. *BMC Genomics* **13**, 551.

Froenicke L., Anderson L.K., Wienberg J.y Ashley T. (2002) Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am.J.Hum.Genet.* **71**, 1353-68.

Garcia-Cruz R., Pacheco S., Brieno M.A., Steinberg E.R., Mudry M.D., Ruiz-Herrera A.y Garcia-Caldes M. (2011) A comparative study of the recombination pattern in three species of Platyrrhini monkeys (primates). *Chromosoma* **120**, 521-30.

Gerton J.L.y Hawley R.S. (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat.Rev.Genet.* **6**, 477-87.

Gilbert N., Boyle S., Fiegler H., Woodfine K., Carter N.P.y Bickmore W.A. (2004) Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* **118**, 555-66.

Gill F.y Donsker D. (2016) IOC World Bird List (v 6.2). URL www.worldbirdnames.org

Gillies C. (1983) Spreading plant synaptonemal complexes for electron microscopy. In: *Kew Chromosome Conference II* (eds. by Brandham P & Bennett MD), pp. 115-22, George Allen & Unwin, London.

Goldstein P.y Triantaphyllou A.C. (1981) Pachytene karyotype analysis of tetraploid *Meloidogyne hapla* females by electron microscopy. *Chromosoma* **84**, 405-12.

Gregory T.R. (2016) Animal Genome Size Database. URL http://www.genomesize.com/.

Griffin D.K., Robertson L.B., Tempest H.G.y Skinner B.M. (2007) The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* **117**, 64-77.

Groenen M.A., Wahlberg P., Foglio M.*, et al.* (2009) A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. *Genome Res* **19**, 510-9.

Hackett S.J., Kimball R.T., Reddy S.*, et al.* (2008) A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* **320**, 1763-8.

Hamer G., Gell K., Kouznetsova A., Novak I., Benavente R.y Hoog C. (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* **119**, 4025-32.

Hansson B., Akesson M., Slate J.y Pemberton J.M. (2005) Linkage mapping reveals sex-dimorphic map distances in a passerine bird. *Proc.Biol.Sci.* **272**, 2289-98.

Hassold T., Hall H.y Hunt P. (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**, R203-8.

Hassold T., Judis L., Chan E.R., Schwartz S., Seftel A.y Lynn A. (2004) Cytological studies of meiotic recombination in human males. *Cytogenet.Genome Res.* **107**, 249-55.

Hedges S.B., Marin J., Suleski M., Paymer M.y Kumar S. (2015) Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Mol Biol Evol* **32**, 835-45.

Hernandez-Hernandez A., Rincon-Arano H., Recillas-Targa F*., et al.* (2008) Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* **117**, 77-87.

Heyting C., Dietrich A., Redeker E.y Vink A. (1985) Structure and composition of synaptonemal complexes, isolated from rat spermatocytes. *European journal of cell biology* **36**, 307-14.

Heyting C., Dietrich A.J., Moens P.B., Dettmers R.J., Offenberg H.H., Redeker E.J.y Vink A.C. (1989) Synaptonemal complex proteins. *Genome* **31**, 81-7.

Higgins J.D., Armstrong S.J., Franklin F.C.y Jones G.H. (2004) The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **18**, 2557-70.

Hoh J.y Ott J. (2005) Genetic Linkage Mapping. *eLS*.

Holmquist G.P. (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* **51**, 17-37.

Hollingsworth N.M., Ponte L.y Halsey C. (1995) MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev* **9**, 1728-39.

Huang C.W., Cheng Y.S., Rouvier R., Yang K.T., Wu C.P., Huang H.L.y Huang M.C. (2009) Duck (*Anas platyrhynchos*) linkage mapping by AFLP fingerprinting. *Genet Sel Evol* **41**, 28.

Huang Y., Zhao Y., Haley C.S., Hu S., Hao J., Wu C.y Li N. (2006) A genetic and cytogenetic map for the duck (*Anas platyrhynchos*). *Genetics* **173**, 287-96.

Hughes A.L.y Piontkivska H. (2005) DNA repeat arrays in chicken and human genomes and the adaptive evolution of avian genome size. *BMC Evol Biol* **5**, 12.

Hultén M.y Tease C. (2006) Genetic mapping: Comparison of direct and indirect approaches. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*.

Hutchison N. (1987) Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. *J Cell Biol.* **105**, 1493-500.

Ikeya T., Shinohara A., Sato S., Tabata S.y Ogawa T. (1996) Localization of mouse Rad51 and Lim15 proteins on meiotic chromosomes at late stages of prophase 1. *Genes Cells* **1**, 379-89.

International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**, 695-716.

Itoh Y., Kampf K.y Arnold A.P. (2006) Comparison of the chicken and zebra finch Z chromosomes shows evolutionary rearrangements. *Chromosome.Res.* **14**, 805-15.

Jensen-Seaman M.I., Furey T.S., Payseur B.A*., et al.* (2004) Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res.* **14**, 528-38.

Jetz W., Thomas G.H., Joy J.B., Hartmann K.y Mooers A.O. (2012) The global diversity of birds in space and time. *Nature* **491**, 444-8.

Jones G.H.y Franklin F.C. (2006) Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* **126**, 246-8.

Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T.*, et al.* (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* **7**, 235-49.

Kauppi L., Jeffreys A.J.y Keeney S. (2004) Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat.Rev.Genet.* **5**, 413-24.

Kawakami T., Smeds L., Backström N.*, et al.* (2014) A high-density linkage map enables a second-generation collared flycatcher genome assembly and reveals the patterns of avian recombination rate variation and chromosomal evolution. *Mol Ecol* **23**, 4035-58.

Kayang B.B., Fillon V., Inoue-Murayama M.*, et al.* (2006) Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence. *BMC Genomics* **7**, 101.

Keeney S., Giroux C.N.y Kleckner N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375-84.

Kehlhoffner J.-L.y Dietrich J. (1983) Synaptonemal complex and a new type of nuclear polycomplex in three higher plants: *Paeonia tenuifolia*, *Paeonia delavayi*, and *Tradescantia paludosa*. *Chromosoma* **88**, 164-70.

Klein F., Mahr P., Galova M., Buonomo S.B., Michaelis C., Nairz K.y Nasmyth K. (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91-103.

Kocsis E., Trus B.L., Steer C.J., Bisher M.E.y Steven A.C. (1991) Image averaging of flexible fibrous macromolecules: the clathrin triskelion has an elastic proximal segment. *J Struct Biol* **107**, 6-14.

Koehler K.E., Cherry J.P., Lynn A., Hunt P.A.y Hassold T.J. (2002) Genetic control of Mammalian meiotic recombination. I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. *Genetics* **162**, 297-306.

Kong A., Gudbjartsson D.F., Sainz J.*, et al.* (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* **31**, 241-7.

Kong X., Murphy K., Raj T., He C., White P.S.y Matise T.C. (2004) A combined linkage-physical map of the human genome. *Am J Hum Genet* **75**, 1143-8.

Koszul R.y Kleckner N. (2009) Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? *Trends in Cell Biology* **19**, 716-24.

Kouznetsova A., Benavente R., Pastink A.y Hoog C. (2011) Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS One* **6**, e28255.

Kumar R.y De Massy B. (2010) Initiation of meiotic recombination in mammals. *Genes (Basel)* **1**, 521-49.

Lake C.M.y Hawley R.S. (2016) Becoming a crossover-competent DSB. *Semin Cell Dev Biol*.

Lam I.y Keeney S. (2015) Nonparadoxical evolutionary stability of the recombination initiation landscape in yeast. *Science* **350**, 932-7.

Lammers J.H., Offenberg H.H., van Aalderen M., Vink A.C., Dietrich A.J.y Heyting C. (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* **14**, 1137-46.

Laurie D.A.y Hultén M.A. (1985) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* **49**, 189-201.

Lenormand T. (2003) The evolution of sex dimorphism in recombination. *Genetics* **163**, 811-22.

Lhuissier F.G., Offenberg H.H., Wittich P.E., Vischer N.O.y Heyting C. (2007) The mismatch repair protein MLH1 marks a subset of strongly interfering crossovers in tomato. *Plant Cell* **19**, 862-76.

Lichten M. (2015) Molecular biology. Putting the breaks on meiosis. *Science* **350**, 913.

Lorch P.D. (2005) Sex differences in recombination and mapping adaptations. *Genetica* **123**, 39-47.

Lynn A., Ashley T.y Hassold T. (2004) Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 317-49.

Lynn A., Koehler K.E., Judis L*., et al.* (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* **296**, 2222-5.

Lynn A., Soucek R.y Borner G.V. (2007) ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work. *Chromosome Res* **15**, 591-605.

Maddox J.F., Davies K.P., Crawford A.M*., et al.* (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res* **11**, 1275-89.

Marcon E.y Moens P. (2003) MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics* **165**, 2283-7.

Mary N., Barasc H., Ferchaud S*., et al.* (2014) Meiotic recombination analyses of individual chromosomes in male domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS One* **9**, e99123.

Mellersh C.S., Langston A.A., Acland G.M*., et al.* (1997) A linkage map of the canine genome. *Genomics* **46**, 326-36.

Mercier R., Mézard C., Jenczewski E., Macaisne N.y Grelon M. (2015) The molecular biology of meiosis in plants. *Annual review of plant biology* **66**, 297-327.

Merico V., Pigozzi M.I., Esposito A., Merani M.S.y Garagna S. (2003) Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet.Genome Res.* **103**, 321-9.

Meuwissen R.L., Offenberg 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**, 5091-100.

Mezard C., Jahns M.T.y Grelon M. (2015) Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends Genet* **31**, 393-401.

Mikawa S., Akita T., Hisamatsu N*., et al.* (1999) A linkage map of 243 DNA markers in an intercross of Gottingen miniature and Meishan pigs. *Anim Genet* **30**, 407-17.

Moens P.B. (2006) Zebrafish: chiasmata and interference. *Genome* **49**, 205-8.

Moens P.B., Chen D.J., Shen Z., Kolas N., Tarsounas M., Heng H.H.y Spyropoulos B. (1997) Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* **106**, 207-15.

Moens P.B., Kolas N.K., Tarsounas M., Marcon E., Cohen P.E.y Spyropoulos B. (2002) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J.Cell Sci.* **115**, 1611-22.

Morgan T.H. (1912) Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila*. *Science* **36**, 719-20.

Morgan T.H. (1914) No crossing over in the male of *Drosophila* of genes in the second and third pairs of chromosomes. *Biol Bull Woods Hole* **26**, 195-204.

Moses M.J. (1956) Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J.Biophys.Biochem.Cytol* **2**, 251-18.

Muñoz-Fuentes V., Marcet-Ortega M., Alkorta-Aranburu G*., et al.* (2015) Strong artificial selection in domestic mammals did not result in an increased recombination rate. *Mol Biol Evol* **32**, 510-23.

Myers S., Bowden R., Tumian A*., et al.* (2010) Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* **327**, 876-9.

Nakagawa T.y Ogawa H. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. *EMBO J* **18**, 5714-23.

Nanda I., Schlegelmilch K., Haaf T., Schartl M.y Schmid M. (2008) Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenet.Genome Res.* **122**, 150-6.

National Research Council (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The National Academies Press, Washington, DC.

Neff M.W., Broman K.W., Mellersh C.S*., et al.* (1999) A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* **151**, 803-20.

Novak J.E., Ross-Macdonald P.B.y Roeder G.S. (2001) The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution. *Genetics* **158**, 1013-25.

Offenberg H.H., Schalk J.A., Meuwissen R.L., van Aalderen M., Kester H.A., Dietrich A.J.y Heyting C. (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2572-9.

Organización Mundial de la Salud (2005) *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*, Ginebra.

Ortiz-Barrientos D., Engelstadter J.y Rieseberg L.H. (2016) Recombination Rate Evolution and the Origin of Species. *Trends Ecol Evol* **31**, 226-36.

Osman K., Higgins J.D., Sanchez-Moran E., Armstrong S.J.y Franklin F.C. (2011) Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **190**, 523-44.

Ostrom J.H. (1976) Archaeopteryx and the origin of birds. *Biological Journal of the Linnean Society* **8**, 91-182.

Ott J. (1999) *Analysis of human genetic linkage*. JHU Press.

Page S.L.y Hawley R.S. (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **20**, 525-58.

Pardo-Manuel De Villena F.y Sapienza C. (2001) Recombination is proportional to the number of chromosome arms in mammals. *Mamm.Genome* **12**, 318-22.

Parvinen M.y Soderstrom K.-O. (1976) Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature* **260**, 534-5.

Pawlowski W.P. (2010) Chromosome organization and dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 640-5.

Pelttari J., Hoja M.R., Yuan L*., et al.* (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells *Mol.Cell Biol.* **21**, 5667-77.

Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J.y de Boer P. (1997) A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome.Res.* **5**, 66-8.

Pezzi N., Prieto I., Kremer L*., et al.* (2000) STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* **14**, 581-92.

Pigozzi M.I. (2001) Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes. *Cytogenet.Cell Genet.* **95**, 129-33.

Pigozzi M.I. (2007) Localization of single-copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet.Genome Res.* **119**, 105-12.

Pigozzi M.I. (2008) Relationship between physical and genetic distances along the zebra finch Z chromosome. *Chromosome.Res.* **16**, 839-49.

Pigozzi M.I. (2011) Diverse stages of sex-chromosome differentiation in tinamid birds: evidence from crossover analysis in *Eudromia elegans* and *Crypturellus tataupa*. *Genetica* **139**, 771-7.

Pigozzi M.I. (2016) The Chromosomes of Birds during Meiosis. *Cytogenet Genome Res*.

Pigozzi M.I., Sciurano R.B.y Solari A.J. (2005) Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *Biocell* **29**, 195-203.

Pigozzi M.I.y Solari A.J. (1997) Extreme axial equalization and wide distribution of recombination nodules in the primitive ZW pair of *Rhea americana* (Aves, Ratitae). *Chromosome.Res.* **5**, 421-8.

Pigozzi M.I.y Solari A.J. (1998) Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromosome.Res.* **6**, 105-13.

Pigozzi M.I.y Solari A.J. (1999a) Equal frequencies of recombination nodules in both sexes of the pigeon suggest a basic difference with eutherian mammals. *Genome* **42**, 315-21.

Pigozzi M.I.y Solari A.J. (1999b) Recombination nodule mapping and chiasma distribution in spermatocytes of the pigeon, *Columba livia*. *Genome* **42**, 308-14.

Pigozzi M.I.y Solari A.J. (2005) The germ-line-restricted chromosome in the zebra finch: recombination in females and elimination in males. *Chromosoma* **114**, 403-9.

Plug A.W., Peters A.H., Keegan K.S., Hoekstra M.F., de Boer P.y Ashley T. (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J.Cell Sci.* **111 ( Pt 4)**, 413-23.

Pollock D.L.y Fechheimer N.S. (1978) The chromosomes of cockerels (*Gallus domesticus*) during meiosis. *Cytogenet.Cell Genet* **21**, 267-81.

Prieto I., Suja J.A., Pezzi N., Kremer L., Martinez A., Rufas J.S.y Barbero J.L. (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat.Cell Biol.* **3**, 761-6.

Prum R.O., Berv J.S., Dornburg A., Field D.J., Townsend J.P., Lemmon E.M.y Lemmon A.R. (2015) A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* **526**, 569-73.

Rahn M.I.y Solari A.J. (1986) Recombination nodules in the oocytes of the chicken, *Gallus domesticus*. *Cytogenet.Cell Genet.* **43**, 187-93.

Rasmussen S.W.y Holm P.B. (1978) Human meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg Research Communications* **43**, 275-327.

Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Gross B.y Jessberger R. (2001) Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol.Cell Biol.* **21**, 6984-98.

Revenkova E.y Jessberger R. (2006) Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* **115**, 235-40.

Rodionov A.V.y Chechik M.S. (2002) Lampbrush chromosomes in the japanese quail *Coturnix coturnix japonica*: cytological maps of macro chromosomes and meiotic crossover frequency in females. *Genetika* **38**, 1246-51.

Rodionov A.V., Chel'sheva L.A., Solovei I.V.y Miakoshina I. (1992a) Chiasma distribution in the lampbrush chromosomes of the chicken *Gallus gallus domesticus*: hot spots of recombination and their possible role in proper dysjunction of homologous chromosomes at the first meiotic division. *Genetika* **28**, 151-60.

Rodionov A.V., Myakoshina Y.A., Chelysheva L.A., Solovei I.y Gaginskaya E.R. (1992b) Chiasmata on lampbrush chromosomes of *Gallus domesticus*: A cytogenetic study of recombination frequency and linkage group lengths. *Genetika* **28**.

Ross-Macdonald P.y Roeder G.S. (1994) Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79**, 1069-80.

Ruvinsky A.y Marshall Graves J.A. (2005) *Mammalian genomics*. CABI.

Samollow P.B. (2008) The opossum genome: insights and opportunities from an alternative mammal. *Genome Res* **18**, 1199-215.

Samollow P.B., Kammerer C.M., Mahaney S.M., Schneider J.L., Westenberger S.J., VandeBerg J.L.y Robinson E.S. (2004) First-generation linkage map of the gray, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*, reveals genome-wide reduction in female recombination rates. *Genetics* **166**, 307-29.

Sato S., Tabata S.y (TGC) T.T.G.C. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-41.

Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Harle M.y Cremer T. (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109-25.

Schmekel K.y Daneholt B. (1995) The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* **5**, 239-42.

Schmid M., Enderle E., Schindler D.y Schempp W. (1989) Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes. *Cytogenet.Cell Genet* **52**, 139-46.

Schmid M., Nanda I., Guttenbach M.*, et al.* (2000) First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet.Cell Genet* **90**, 169-218.

Schmid M., Nanda I., Hoehn H.*, et al.* (2005) Second report on chicken genes and chromosomes 2005. *Cytogenet.Genome Res.* **109**, 415-79.

Schramm S., Fraune J., Naumann R.*, et al.* (2011) A Novel Mouse Synaptonemal Complex Protein Is Essential for Loading of Central Element Proteins, Recombination, and Fertility. *PLoS Genet* **7**, e1002088.

Segura J., Ferretti L., Ramos-Onsins S.*, et al.* (2013) Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc Biol Sci* **280**, 20131945.

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

Shetty S., Griffin D.K.y Graves J.A. (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome.Res.* **7**, 289-95.

Shibusawa M., Minai S., Nishida-Umehara C.*, et al.* (2001) A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail. *Cytogenet.Cell Genet.* **95**, 103-9.

Shibusawa M., Nishibori M., Nishida-Umehara C., Tsudzuki M., Masabanda J., Griffin D.K.y Matsuda Y. (2004a) Karyotypic evolution in the Galliformes: an examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny. *Cytogenet.Genome Res.* **106**, 111-9.

Shibusawa M., Nishida-Umehara C., Masabanda J., Griffin D.K., Isobe T.y Matsuda Y. (2002) Chromosome rearrangements between chicken and guinea fowl defined by comparative chromosome painting and FISH mapping of DNA clones. *Cytogenet Genome Res* **98**, 225-30.

Shibusawa M., Nishida-Umehara C., Tsudzuki M., Masabanda J., Griffin D.K.y Matsuda Y. (2004b) A comparative karyological study of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*, Phasianidae) and California quail (*Callipepla californica*, Odontophoridae). *Cytogenet.Genome Res.* **106**, 82-90.

Shinohara A., Ogawa H.y Ogawa T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**, 457-70.

Shoffner R.N. (1974) Chromosome of birds. In: *The cell nucleus* (ed. by Busch H), pp. 223-61. Academic Press, New York.

Singer A., Perlman H., Yan Y., Walker C., Corley-Smith G., Brandhorst B.y Postlethwait J. (2002) Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* **160**, 649-57.

Singhal S., Leffler E.M., Sannareddy K.*, et al.* (2015) Stable recombination hotspots in birds. *Science* **350**, 928-32.

Skinner B.M., Robertson L.B., Tempest H.G.*, et al.* (2009) Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. *BMC Genomics* **10**, 357.

Solari A.J. (1977) Ultrastructure of the synaptic autosomes and the ZW bivalent in chicken oocytes. *Chromosoma* **64**, 155-65.

Solari A.J. (1980) Synaptosomal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* **81**, 315-37.

Solari A.J. (1992) Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes. *Cytogenet.Cell Genet.* **59**, 52-6.

Solari A.J. (1993) *Sex chromosomes and sex determination in vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

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**, 268-72.

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 bird. *Chromosome.Res.* **1**, 153-66.

Stack S., Anderson L.y Sherman J.D. (1989) Chiasmata and recombination nodules in *Lilium longiflorum*. *Genome* **32**, 486-98.

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**, 136-48.

Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T.*, et al.* (2004) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am.J.Hum.Genet.* **74**, 521-31.

Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T.*, et al.* (2006) Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* **15**, 2376-91.

Sun F., Trpkov K., Rademaker A., Ko E.y Martin R.H. (2005) Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* **116**, 172-8.

Syrjanen J.L., Pellegrini L.y Davies O.R. (2014) A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *Elife* **3**.

Tanaka Y. (1914) A study of Mendelian factors in the silkworm, *Bombyx mori. Mol. Gen. Genet.* **12**, 161.

Tarsounas M., Morita T., Pearlman R.E.y Moens P.B. (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J.Cell Biol.* **147**, 207-20.

Tease C., Hartshorne G.M.y Hultén M.A. (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am.J.Hum.Genet.* **70**, 1469-79.

Tease C.y Hultén M.A. (2004) Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells. *Cytogenet.Genome Res.* **107**, 208-15.

Terasawa M., Shinohara A., Hotta Y., Ogawa H.y Ogawa T. (1995) Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes Dev.* **9**, 925-34.

Torgasheva A.A. (2016) Synapsis and recombination in grey goose (*Anser anser*). In: *21st International Chromosome Conference* (ed. by Schmid M), pp. 83-115. Karger, Foz do Iguaçu, Brazil.

Trivers R.L. (1988) Sex differences in rates of recombination and sexual selection. In: *The evolution of sex: an examination of current ideas.* (eds. by Michod R & Levin D), pp. 260-76, Sunderlan, Massachusetts.

van Oers K., Santure A.W., De Cauwer I.*, et al.* (2014) Replicated high-density genetic maps of two great tit populations reveal fine-scale genomic departures from sex-equal recombination rates. *Heredity (Edinb)* **112**, 307-16.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W.*, et al.* (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-51.

Volker M., Backström N., Skinner B.M., Langley E.J., Bunzey S.K., Ellegren H.y Griffin D.K. (2010) Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. *Genome Res* **20**, 503-11.

Vozdova M., Sebestova H., Kubícková S., Cernohorska H., Vahala J.y Rubes J. (2013) A comparative study of meiotic recombination in cattle (*Bos taurus*) and three wildebeest species (*Connochaetes gnou*, *C. taurinus taurinus* and *C. t. albojubatus*). *Cytogenet Genome Res* **140**, 36-45.

Wahlberg P., Stromstedt L., Tordoir X.*, et al.* (2007) A high-resolution linkage map for the Z chromosome in chicken reveals hot spots for recombination. *Cytogenet.Genome Res.* **117**, 22-9.

Wang T.F., Kleckner N.y Hunter N. (1999) Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13914-9.

Warren W.C., Clayton D.F., Ellegren H.*, et al.* (2010) The genome of a songbird. *Nature* **464**, 757-62.

Warren W.C., Hillier L.W., Tomlinson C*., et al.* (2016) A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. *G3 (Bethesda)*.

Woglar A., Daryabeigi A., Adamo A., Habacher C., Machacek T., La Volpe A.y Jantsch V. (2013) Matefin/SUN-1 phosphorylation is part of a surveillance mechanism to coordinate chromosome synapsis and recombination with meiotic progression and chromosome movement. *PLoS Genet* **9**, e1003335.

Woglar A.y Jantsch V. (2014) Chromosome movement in meiosis I prophase of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* **123**, 15-24.

Wojcik E.y Smalec E. (2007) Description of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) karyotype. *Folia Biol (Krakow)* **55**, 115-20.

Woods L.M., Hodges C.A., Baart E., Baker S.M., Liskay M.y Hunt P.A. (1999) Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J.Cell Biol.* **145**, 1395-406.

Xu X., You H., Du K.y Han F. (2011) An Archaeopteryx-like theropod from China and the origin of Avialae. *Nature* **475**, 465-70.

Zenger K.R., McKenzie L.M.y Cooper D.W. (2002) The first comprehensive genetic linkage map of a marsupial: the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Genetics* **162**, 321-30.

Zickler D.y Kleckner N. (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu.Rev.Genet.* **33**, 603-754.

Zlotina A., Galkina S., Krasikova A., Crooijmans R.P., Groenen M.A., Gaginskaya E.y Deryusheva S. (2012) Centromere positions in chicken and Japanese quail chromosomes: de novo centromere formation versus pericentric inversions. *Chromosome.Res.*