



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO RECOMBINOGÉNICO
DE LA AZIDA DE SODIO EN CÉLULAS GERMINALES DE
DROSOPHILA MELANOGASTER

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:
ESTEFANIA ARROYO JILOTE



DIRECTOR DE TESIS:
PATRICIA RAMOS MORALES

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.- Datos de alumnos

Arroyo

Jilote

Estefania

55818646

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

101001450

2.-Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3.-Datos del sinodal 1

Dr.

Jesús Javier

Espinosa

Aguirre

4.-Datos del sinodal 2

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

5.-Datos del sinodal 3

Dr.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

6.-Datos del sinodal 4

Dra.

Adriana

Muñoz

Hernández

7.-Datos del trabajo escrito.

Efecto recombinogénico de la azida de sodio en células germinales de *Drosophila melanogaster*

86p

2014

Este trabajo se realizó en:

El laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental



Con el apoyo del:

Banco de Moscas



Facultad de Ciencias

“La única razón para que el tiempo exista, es para que no ocurra todo a la vez”

Mi visión del mundo

Curiosa es nuestra situación de hijos de la Tierra. Estamos por una breve visita y no sabemos con qué fin, aunque a veces creemos presentirlo. Ante la vida cotidiana no es necesario reflexionar demasiado: estamos para los demás. Ante todo para aquellos de cuya sonrisa y bienestar depende nuestra felicidad; pero también para tantos desconocidos a cuyo destino nos vincula una simpatía. Pienso mil veces al día que mi vida externa e interna se basa en el trabajo de otros hombres, vivos o muertos. Siento que debo esforzarme por dar en la misma medida en que he recibido y sigo recibiendo. Me siento inclinado a la sobriedad, oprimido muchas veces por la impresión de necesitar del trabajo de los otros. Pues no me parece que las diferencias de clase puedan justificarse: en última instancia reposan en la fuerza. Y creo que una vida exterior modesta y sin pretensiones es buena para todos en cuerpo y alma.

No creo en absoluto en la libertad del hombre en un sentido filosófico. Actuamos bajo presiones externas y por necesidades internas. La frase de Schopenhauer: “Un hombre puede hacer lo que quiere, pero no puede querer lo que quiere”, me bastó desde mi juventud. Me ha servido de consuelo, tanto al ver como al sufrir las durezas de la vida, y ha sido para mí una fuente inagotable de tolerancia. Ha aliviado ese sentido de responsabilidad que tantas veces puede volverse una traba, y me ayudó a no tomarme demasiado en serio, ni a mí mismo ni a los demás. Así pues, veo la vida con humor.....

Albert Einstein

Si avanzo, seguidme;
Si me detengo, empujadme;
Si retrocedo, matadme

Ernesto Che Guevara

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y formarme académicamente, culturalmente, socialmente y políticamente.

A los sinodales: Dra. Patricia Ramos Morales, Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera y Dra. Adriana Muñoz Hernández, por su valioso tiempo, aportaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

A la Doctora Patricia Ramos Morales, por su apoyo, confianza, cariño y tiempo brindado en este gran esfuerzo, por adoptarme en su laboratorio y compartir largas horas de trabajo llenas de aprendizaje y crecimiento, por enseñarme a pensar diferente y ver más allá de lo establecido, por ser ejemplo académico y transmitirme su conocimiento y amor por las moscas, genética y estadística, pero sobre todo por su entereza y calidad humana que la hacen una persona excepcional.

A las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo:

Dra. Adriana Muñoz Hernández (laboratorio, presentación y trámites), Biól. Hugo Rivas Martínez (laboratorio, fotografías y consejos) Biól. Blanca Rosa Hernández Bernal (laboratorio y consejos) Adrián Meneses Cárdenas (ilustraciones) Sandra Arroyo Jilote y Gudmaro Arroyo García (base de datos).

.A todos los miembros eventuales y de planta del laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental y del Banco de Moscas por las salidas al campo, el estrés compartido, los diversos festejos, por hacer amena y divertida la estancia en el laboratorio: Yaneli, Mayra, Juan, Marlene, Olga, Karla, Maricruz, Aída, Abril, Fernanda, Estefania, Tania, Gaby, Angeles.

A Zarco, Gris y Tania por su constante presión para terminar la tesis.

Por último, y no menos importante a mi familia por su amor incondicional, su constante apoyo tanto emocional como económico.

DEDICATORIA

A la vida por darme la oportunidad de seguir consumiendo O₂, desechando CO₂ y un poco más.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma máter.

A Angélica, Gudmaro y Eva por darme raíces para crecer y alas para volar, por apoyarme incondicionalmente y enseñarme que los grandes frutos son producto del esfuerzo y el trabajo constante.

A Sandra y Sara por enseñarme los matices de la vida: los regañones, las peleas, los berrinches, las sonrisas, las tristezas y alegrías.

A mi familia Arroyo y Jilote, tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas por brindarme su apoyo incondicional, por quererme tanto e inspirarme a dar lo mejor de mí.

A mis amigos: Mari, Manuela, Lorena, David, Gris, Pau, Diana, Laura, Iván, Jazmín, Sandra, Tukán, Rorro, Kalid, Gaby, Tole, Karls, Yaneli, Mayra, Olga, Karla, Andrea, por los momentos vividos y por mostrarme la otra cara de la vida.

A Adrián por que los triunfos compartidos saben mejor.

A Cecilia Verduco Martínez por contagiarme su pasión por la Biología.

A los consejeros Elí, Zilta, Claudia, Vicky y Juan Pablo por las horas extras intentando mejorar la Facultad de Ciencias.

A mis maestros por despertarme la alegría por el conocimiento en especial: Socorro, Josefina, Andrea, Rosa María, Alejandro, Rosaura, Marché, Blanca, Hugo, Adriana, Paty.

A mis alumnos por mantenerme en constante aprendizaje.

A los biólogos divertidos, raros, estrafalarios, alivianados, comprometidos y decididos con los que me tope en la carrera, con los que compartí prácticas de campo, sesiones de laboratorio, comidas y discusiones formativas.

A los que se adelantaron pero dejaron su huella en mí: Rogelio, Manuela, Tayson y Juan.

A todos aquellos que sin saberlo contribuyeron con su granito de arena.

INDICE

Número de identificación	Contenido	Página
	RESUMEN	1
I	INTRODUCCIÓN	2
1.1	El material genético : el hilo de la vida	2
1.1.1	¿Qué es y dónde se encuentra?	2
1.1.2	Mecanismos de transmisión de los genes: segregación independiente, ligamiento y entrecruzamiento	3
1.2	Bases biológicas del entrecruzamiento	9
1.2.1	El entrecruzamiento: nuevas combinaciones genéticas	9
1.2.2	Evidencia citológica del entrecruzamiento	10
1.2.3	¿En qué momento ocurre el entrecruzamiento?	11
1.3	Mapeo genético	13
1.3.1	Mapeo de dos genes	16
1.3.2	Mapeo de tres genes	18
1.4	Drosophila melanogaster como modelo biológico	22
1.5	Características de la Azida sodio (NaN₃)	23
1.5.1	¿Qué es la NaN ₃ ?	23
1.5.2	Mecanismos de acción de la NaN ₃	24
	Justificación	26
	Objetivos	27
	Hipótesis	28
II.	METODOLOGÍA	29
2.1	Tratamiento con NaN₃	29
2.1.1	Obtención de larvas para tratamiento	29
2.1.2	Tratamiento	29
2.2.2	Mapeo genético	29
2.2.1	Cepas para el mapeo genético	29
2.2.2	Mapeo genético	31
2.3	Análisis de resultados: efecto de la NaN₃ en los organismos expuestos y en su progenie	38
2.3.1	Efecto tóxico: Índice de sobrevivencia y proporción sexual	38
2.3.2	Efecto reprotóxico: Fertilidad, Promedio de la progenie por macho y proporción sexual	38
2.3.3	Efecto trangeneracional: Fertilidad y Fecundidad de la progenie	39

Número de identificación	Contenido	Página
2.4	Determinación y análisis de las frecuencia de recombinación	40
2.4.1	Mapeo de dos genes	40
2.4.2	Mapeo de tres genes	41
2.5	Tipo y proporción de fenotipos obtenidos en la F₂	42
III.	RESULTADOS	43
3.1	Efecto de la NaN₃ en los organismos expuestos	43
3.1.3	Efecto tóxico de la NaN ₃	43
3.1.2	Efecto reprotóxico de la NaN ₃	45
3.2	Efecto transgeneracional	49
3.3	Efecto de la NaN₃ en las frecuencias de recombinación y en las categorías fenotípicas	53
3.3.1	Frecuencias de recombinación entre los genes: w-m	53
3.3.2	Frecuencias de recombinación entre los genes: y-w	55
3.3.3	Frecuencias de recombinación entre los genes : <i>m-f</i>	56
3.4	Impacto de la NaN₃ en los fenotipos de la F₂	57
3.5	Efecto de la NaN₃ en el número de categorías fenotípicas por familia	60
IV.	DISCUSIÓN	65
4.1	La NaN₃ afecta a los organismos expuestos y a sus descendientes	65
4.2	La NaN₃ modifica las frecuencias de recombinación	67
4.3	La exposición de los progenitores a NaN₃ impacta en los fenotipos de las nuevas generaciones	68
4.4	¿Por qué las frecuencias de recombinación pueden modificarse por los cambios en el ambiente, como la exposición a NaN₃?	69
V.	CONCLUSIONES	72
	LITERATURA CITADA	73
	ANEXOS	81

RESUMEN

Los factores ambientales modulan los patrones de evolución. La evolución es el proceso de cambio, adaptación y diversificación de las poblaciones a través del tiempo. Subyacentes a todos estos cambios se encuentran las modificaciones en el material hereditario. Los cambios en el ambiente pueden alterar la calidad, cantidad y expresión del material genético. No obstante se ha estudiado poco acerca del impacto del ambiente en procesos considerados altamente conservados como el entrecruzamiento cromosómico entre genes ligados en las células germinales y su posible impacto en las proporciones de nuevas combinaciones genéticas, las cuales en corto plazo, generan gran parte de la variación de las poblaciones (Futuyma, 1998; Griffiths, *et al.*, 2003) y que a largo plazo, contribuyen a la diversidad biológica. Por lo anterior este trabajo evaluó si las frecuencias de recombinación entre los genes *yellow* (y) *white* (w), *miniature* (m) y *forked* (f) localizados en el cromosoma X en células germinales de *Drosophila melanogaster* es alterada por cambios en el ambiente, como la exposición a NaN_3 . Larvas silvestres de *D. melanogaster* de 72±4h se alimentaron subcrónicamente con diluciones sucesivas de NaN_3 (0.125-1.13E-13 mM) o agua destilada (testigo negativo). Se comparó el índice de sobrevivencia (IS) y la proporción sexual (PS) de las moscas de las series experimentales respecto al testigo. De las moscas recobradas se seleccionaron aleatoriamente 10 machos por cada concentración de NaN_3 y se cruzaron individualmente con hembras no tratadas homocigotas recesivas (*ywm*, *wmf* y *wm*). Se contó el número de hijos y se calculó la fertilidad y la progenie promedio por macho. De los hijos se seleccionaron 5 familias aleatoriamente y se sembraron 5 parejas de hermanos (total 25 familias) para obtener la F₂. Se contó el número de hijos y se calculó la fertilidad y la fecundidad. La progenie se clasificó por fenotipo para calcular las frecuencias de recombinación entre los genes. Se encontró que existen diferencias significativas en el IS entre la concentración 0.125 mM de NaN_3 y el testigo, sin tener un impacto en la proporción sexual. La fertilidad, la progenie promedio de los machos tratados con NaN_3 y la fertilidad y fecundidad de sus hijas presentaron una respuesta diferencial a la NaN_3 dependiendo del sistema de cruce utilizado (*ywm*, *wmfo* *wm*) implicando que el daño causado en las células germinales de los machos silvestres por la exposición a NaN_3 es amortiguado por la constitución genética de las hembras. Se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de recombinación a nivel poblacional por la exposición a NaN_3 y el testigo, estos cambios no fueron homogéneos ya que intervinieron factores como la distancia entre los genes, la región cromosómica en donde se localizan y la constitución genética de las cepas. Además en el efecto presentado en la población no todas las familias contribuyeron en la misma intensidad ni magnitud; algunas familias presentaron progenie que expresa sólo un fenotipo, lo que finalmente afecta la constitución genética y fenotípica de la F₂. La alteración en las frecuencias de recombinación implica que el entrecruzamiento cromosómico en las células germinales responde a los cambios ambientales, como la exposición a NaN_3 , incrementando o disminuyendo su frecuencia, ocasionando el aumento o disminución de gametos con nuevos arreglos genéticos, lo que provoca un impacto directo en el tipo y la proporción de genotipos en las nuevas generaciones.

I. INTRODUCCIÓN

La evolución biológica es el proceso de cambio, adaptación y diversificación de los organismos de una población en el tiempo (Eguiarte, 2009), que afecta a todos los aspectos de su vida como su morfología, fisiología, comportamiento y ecología (Ayala, 1994).

Los factores ambientales, particularmente las fluctuaciones climáticas, se visualizan ampliamente como controles importantes en los patrones de evolución (Feibel, 2008). El ambiente de cualquier especie cambia continuamente y las especies asociadas se forman, desaparecen y cambian sus rangos de distribución geográfica (Stanley, 2008). Subyacentes a todos estos cambios se encuentran las modificaciones en el material genético. Los cambios en el ambiente pueden alterar la calidad, cantidad y la expresión de los genes.

Los principales estudios acerca del daño a la integridad del material genético de los organismos se han enfocado en el efecto que ejercen diversos agentes químicos, físicos y biológicos en el ácido desoxirribonucleico (ADN), principalmente en el rompimiento de ADN y la adición de compuestos químicos a su estructura, los cuales pueden llegar a inducir mutagénesis, teratogénesis o carcinógenesis (Winder, 1993). No obstante, se ha estudiado poco acerca del impacto del ambiente en procesos considerados altamente conservados como el entrecruzamiento cromosómico entre genes ligados en las células germinales *in vivo*, y su efecto en las proporciones de nuevas combinaciones genéticas, las cuales en corto plazo, contribuyen en gran parte de la variación de las poblaciones (Futuyma, 1998; Griffiths *et al.*, 2003).

1.1 El material genético: el hilo de la vida

1.1.1 ¿Qué es y dónde se encuentra?

El material genético es una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN), cada cadena consiste en un esqueleto de azúcar y fosfato, cada azúcar está unida a una base nitrogenada que puede ser timina, adenina, citosina o guanina (Watson y Crick, 1953 a, b). Está integrado en unidades funcionales hereditarias llamadas genes que son secuencias específicas de bases nitrogenadas (Griffiths *et al.*, 2002), cada gen se traduce en proteína

(Beadle y Tatum, 1941), las cuales determinan las características o rasgos de cada individuo, es decir sus caracteres (Mendel, 1865). Los genes se encuentran en los cromosomas (Sutton, 1903; Morgan, 1910 a) y éstos se transfieren de una célula a sus células hijas y de una generación de organismos a la siguiente (Alberts *et al.*, 2004).

En los organismos con reproducción sexual, los gametos son las células encargadas de transmitir la información genética de una generación a otra. Los gametos o células sexuales (óvulos y espermatozoides) son células haploides que contienen un juego de cromosomas con una sola copia de cada gen (Mendel, 1865; Sutton, 1903). La fertilización de un óvulo por un espermatozoide, es al azar (Mendel, 1865) y produce un cigoto diploide, que contiene dos juegos de cromosomas equivalentes (homólogos) con dos copias de cada gen, uno proveniente del padre y otro de la madre (Mendel 1865; Sutton, 1903; Morgan, 1910 b; Morgan *et al.*, 1915).

Los dos (alelos) genes responsables de cada carácter se segregan uno de otro durante la formación de los gametos (Mendel, 1865); de manera que cada gameto recibe un solo cromosoma homólogo con un gen con una probabilidad de $\frac{1}{2}$ (Mendel, 1865; Sutton, 1903).

Por lo tanto, la capacidad de transmitir la información genética de una generación a otra en los organismos con reproducción sexual depende de la manera en la que los genes son heredados de los progenitores a sus descendientes a través de los gametos.

1.1.2 Mecanismos de transmisión de los genes: segregación independiente, ligamiento y entrecruzamiento.

Los cromosomas son las estructuras celulares que portan los genes (Morgan, 1910a), por consiguiente la transmisión de los genes de una generación a otra depende de en qué cromosoma se encuentren. Los genes que se encuentran en cromosomas diferentes se segregan libremente, resultado del comportamiento independiente de cada cromosoma (Morgan, 1919) y los genes que se encuentran en el mismo cromosoma tenderían a heredarse juntos (Morgan, 1915; Morgan *et al.*, 1915; Morgan, 1919). Debido a que el cromosoma y no el gen, es la unidad de transmisión del material hereditario, los genes ligados no son libres para transmitirse independientemente, por el contrario, todos los genes

de un cromosoma se transmiten como una unidad durante la formación de los gametos (Pierce, 2006).

Aunque dos genes ligados tienden a transmitirse juntos, en algunas ocasiones pueden llegar a separarse debido a que durante la formación de los gametos ocurre un proceso denominado entrecruzamiento, que es el intercambio entre las cromátidas de los cromosomas homólogos (Morgan, 1915; Morgan *et al.*, 1915; Morgan, 1919).

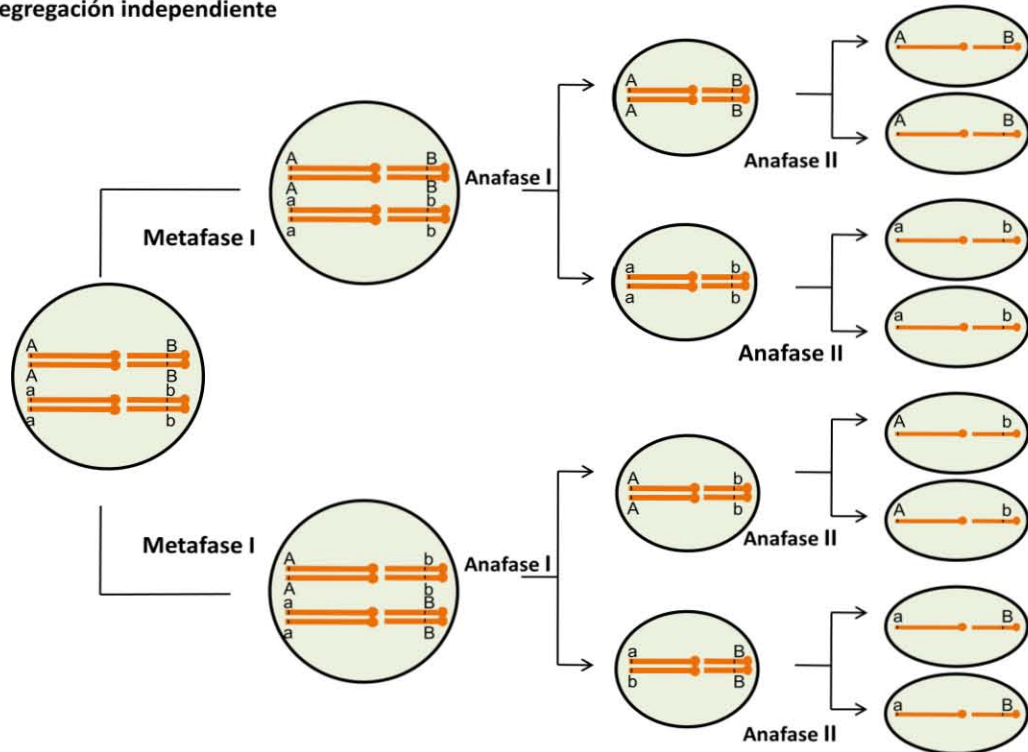
Estos mecanismos de transmisión de los genes son evidentes al realizar cruza entre individuos con marcadores fenotípicos para dos genes.

Las cruza entre heterocigotos son una de las herramientas que permiten resaltar cómo se heredan los genes de una generación a otra, ya que los individuos heterocigotos permiten analizar las distintas relaciones que se establecen entre dos alelos del mismo gen así como la interacción con otros genes, expresadas en las proporciones fenotípicas de su descendencia. No obstante, el método más directo para estudiar las relaciones entre dos genes, es mediante una cruza de prueba que se hace entre un individuo heterocigoto y uno recesivo, ya que en este tipo de cruza cada genotipo produce un fenotipo y las proporciones de la descendencia son la manifestación directa de las proporciones de los gametos del organismo heterocigoto (Sturtevant, 1913).

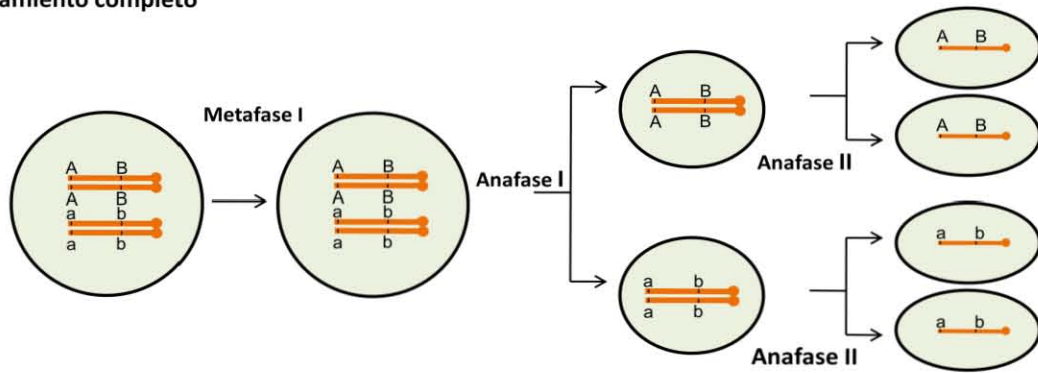
En consecuencia, al realizar una cruza de prueba para dos genes: A y B , donde A domina sobre a ($A > a$) y B domina sobre b ($B > b$), se plantean tres posibles hipótesis para la transmisión de los dos genes: a) segregación independiente (Fig.1.1a), b) ligamiento completo o sin entrecruzamiento (Fig.1.1b), c) ligamiento incompleto o con entrecruzamiento (Fig.1.1c).

a) Segregación independiente. En una cruza de prueba para dos genes que se segregan independiente, el individuo heterocigoto para los dos caracteres ($AaBb$) produce cuatro tipos de gametos genéticamente diferentes en proporciones iguales; esto debido a la segregación al azar de los alelos de cada gen A/a por un lado y B/b por el otro, así como de la combinación aleatoria de los genes; mientras que el individuo recesivo forma sólo un tipo de gametos (ab). Al unirse los gametos del heterocigoto con los gametos del recesivo, en su descendencia se obtienen organismos con cuatro fenotipos en una proporción 1:1:1:1,

Segregación independiente



Ligamiento completo



Ligamiento incompleto

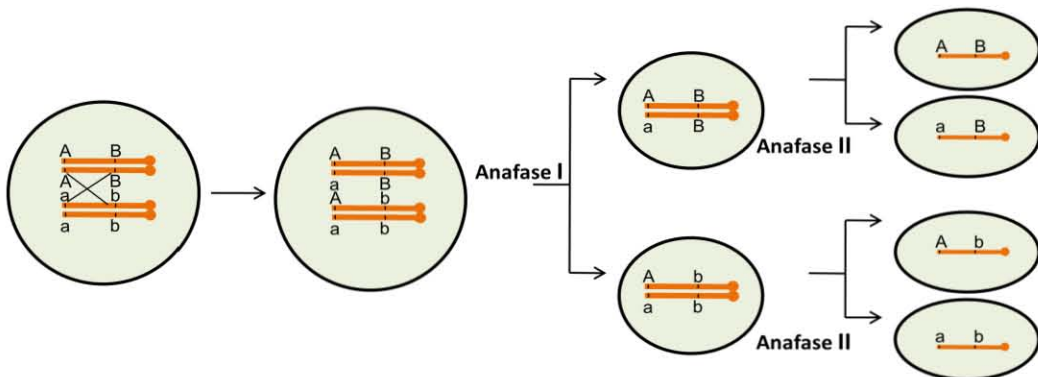


Figura 1.1 Mecanismos de transmisión de dos genes durante la meiosis de un organismo heterocigoto: a) Segregación independiente, se producen cuatro tipos de gametos por la combinación aleatoria entre los cromosomas durante la Metafase I; b) Ligamiento completo, se generan dos tipos de gametos dado que los genes ligados se transmiten juntos; c) Ligamiento incompleto, se producen cuatro tipo de gametos, producto del entrecruzamiento entre dos genes ligados.

esta proporción es la manifestación directa de la proporción de los gametos del heterocigoto (Fig.1.2).

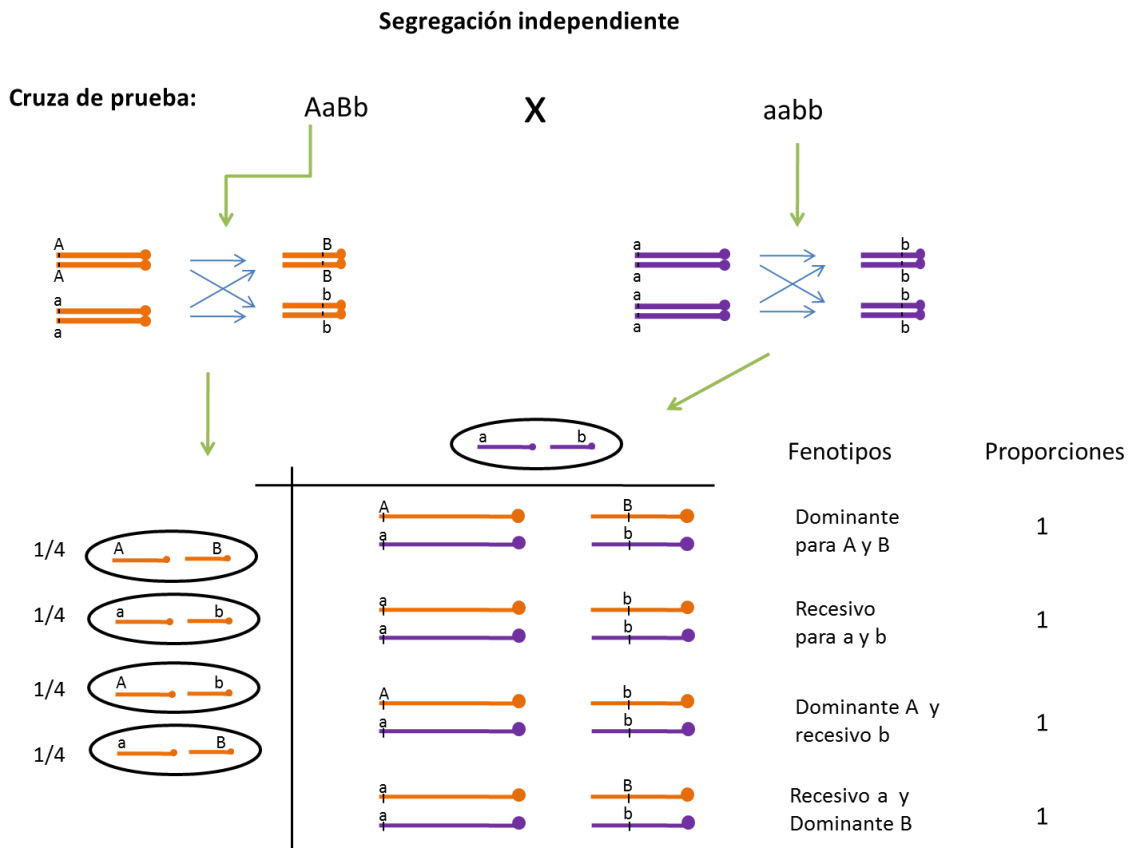


Figura 1.2. Representación de una cruce de prueba para dos genes con segregación independiente y la progenie resultante. Los gametos producidos por cada individuo se ilustran dentro de un óvalo.

b) Ligamiento completo. En una cruce de prueba para dos genes con ligamiento completo (AB/ab) el individuo heterocigoto para los dos caracteres sólo forma dos tipos de gametos genéticamente diferentes, ya que cada gameto recibe los alelos presentes en uno u otro cromosoma homólogo, es decir, sólo produce gametos de tipo parental en la misma proporción. Al unirse los gametos del heterocigoto con los gametos del organismo recesivo, en su descendencia se obtienen organismos con dos fenotipos en una proporción 1:1, estos fenotipos son iguales a los progenitores (Fig.1.3).

Ligamiento completo

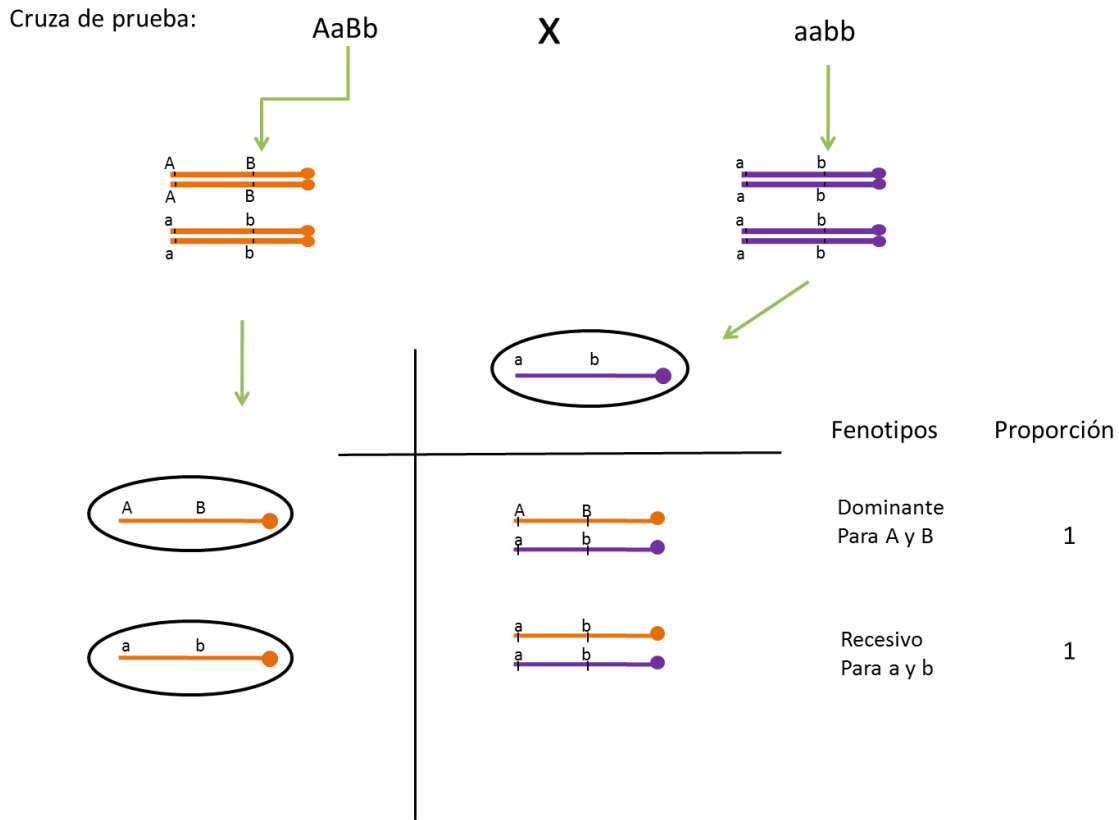


Figura 1.3 Representación de una cruce de prueba para dos genes con ligamiento completo y su progenie resultante. Los gametos producidos por cada individuo se ilustran dentro de un óvalo.

c).- Ligamiento incompleto. En una cruce de prueba para dos genes con ligamiento incompleto ($A B/ a b$) el individuo heterocigoto para los dos caracteres produce cuatro tipos de gametos genéticamente diferentes. Dos tipos de gametos son producto del entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas de los cromosomas homólogos, estos gametos presentan nuevas combinaciones genéticas por lo que se denominan gametos recombinantes. Los otros dos tipos de gametos que genera el heterocigoto son resultado de las dos cromátidas no implicadas en el intercambio cromosómico generando gametos no recombinantes. Cuando se fusionan los gametos del heterocigoto y los gametos del individuo recesivo, en su descendencia no se obtienen dos categorías fenotípicas en las proporciones esperadas 1:1 para genes completamente ligados sino que se obtienen cuatro categorías fenotípicas, como en la segregación independiente pero en proporciones

diferentes a la 1:1:1:1. Se recobra un exceso numérico de organismos mostrando las categorías fenotípicas de tipo parental y un déficit numérico de organismos que muestran nuevas combinaciones en dos categorías fenotípicas de tipo no parental (Fig.1.4) (Tamarin, 1982; Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2003). Las categorías fenotípicas de tipo parental obtenidas en la descendencia son producto de los gametos del heterocigoto en donde no hubo entrecruzamiento, por lo tanto los genes ligados se segregan juntos durante la formación de los gametos y se transmiten juntos en las generaciones sucesivas (Morgan *et al.*, 1915), mientras que las categorías fenotípicas de tipo no parental son el resultado del intercambio físico (entrecruzamiento) entre segmentos de los cromosomas homólogos del progenitor heterocigoto durante la formación de los gametos (Fig. 1.1) (Morgan *et al.*, 1915; Griffiths *et al.*, 2003).

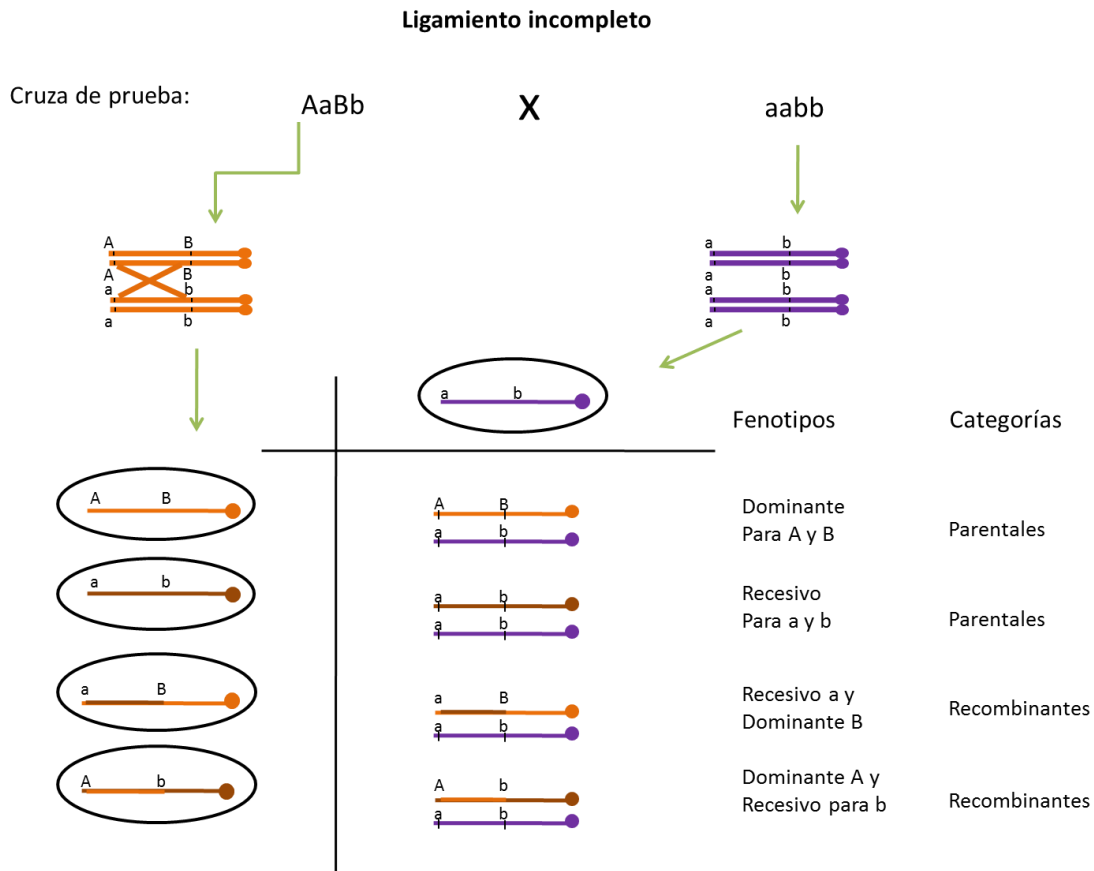


Figura 1.4 Representación de una cruce de prueba para dos genes con ligamiento incompleto y su progenie resultante. Los gametos producidos por cada individuo se ilustran dentro de un óvalo.

1.2 Bases biológicas del entrecruzamiento cromosómico

1.2.1. El entrecruzamiento: nuevas combinaciones genéticas

Los organismos que presentan nuevos fenotipos en la descendencia de una cruce para dos genes ligados se llaman recombinantes, esto implica que los genes que están en el mismo cromosoma se separaron de alguna manera durante la formación de los gametos, generando nuevas combinaciones (Morgan, 1915).

El número de organismos recombinantes del total de la progenie de una cruce de prueba, permite calcular la frecuencia de recombinación entre dos genes (Anexo I.1). La frecuencia de recombinación entre dos genes ligados cualesquiera es consistente (Morgan, 1915), este hecho apoyó la existencia de algún mecanismo general por el cual los alelos se separaban y recombinaban en la misma frecuencia para dos genes (Avers, 1984).

Morgan propuso que el mecanismo por el cual los genes que se encontraban en el mismo cromosoma parecían separarse y originar una recombinación de alelos era resultado del intercambio físico entre pares de cromosomas durante la meiosis. A este proceso lo denominó entrecruzamiento (Morgan, 1915; Morgan *et al.*, 1915; Morgan, 1919).

En el entrecruzamiento se intercambia un segmento de un cromosoma homólogo con otro segmento equivalente del otro cromosoma homólogo, para obtener dos cromosomas intercambiados, los genes que se encuentran en estos segmentos son combinados generando un nuevo arreglo genético en los gametos formados (Fig.1.5) (Morgan, 1915; Morgan *et al.*, 1915; Morgan, 1919).

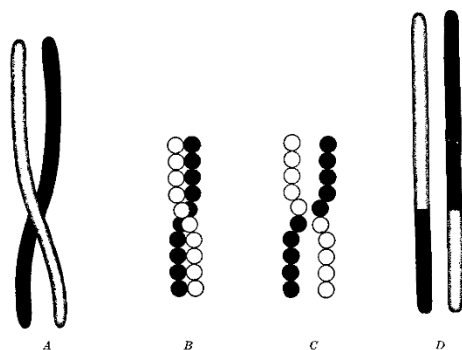


Figura 1.5 Diagrama para representar el entrecruzamiento. En la A se representa dos cromosomas uno proviene de la madre (blanco) y otro del padre (negro). Las letras B y C el corte y la reunión de los cromosomas y finalmente en la D se presentan los cromosomas resultantes del entrecruzamiento. Modificado de Morgan 1915.

Este nuevo arreglo genético resulta evidente en los gametos de organismos heterocigotos que al ser fertilizados originan la progenie recombinante.

El mecanismo de entrecruzamiento durante la formación de las células germinales propuesto por Morgan era una hipótesis que relacionaba el comportamiento de los cromosomas en la meiosis con el patrón de transmisión de genes derivado del análisis genético (Avers, 1984).

1.2.2. Evidencia citológica del entrecruzamiento.

La dificultad para obtener evidencia física del entrecruzamiento cromosómico era que los cromosomas homólogos no podían distinguirse uno de otro. Con el fin de establecer la ocurrencia de los entrecruzamientos, los cromosomas homólogos tuvieron que ser alterados físicamente para identificar un homólogo de otro (Avers, 1984).

Dos trabajos realizados en 1931 aportaron evidencias citológicas del entrecruzamiento cromosómico, uno fue realizado por Curt Stern en *Drosophila melanogaster* y el otro por Creighton Harriet y Bárbara Mc Clintock, empleando maíz.

Para obtener una correlación entre el entrecruzamiento genético y el entrecruzamiento citológico Creighton y Mc Clintock utilizaron el cromosoma nueve especial del maíz, que en el brazo corto presentaba una acumulación visible llamada knob, mientras que el brazo largo era de mayor tamaño que el regular, este cromosoma era producto de un intercambio entre el cromosoma nueve y el cromosoma ocho (Anexo I.2) (Mc Clintock, 1930). Al mismo tiempo emplearon dos marcadores genéticos del cromosoma nueve: uno que afecta el color de la semilla (C, coloreado; c, no coloreado) y el otro que determina la composición del endospermo (Wx, almidonado; wx, ceroso) (Creighton y Mc Clintock, 1931).

A plantas que tenían un cromosoma nueve y los genes Cwx y un cromosoma nueve regular con los genes c Wx, las cruzaron con plantas que tenían ambos cromosomas nueve regulares, un cromosoma portaban los genes c Wx y el otro portaba c wx. (Fig. 1.6) (Creighton y Mc Clintock, 1931). De esta cruce obtuvieron cuatro categorías fenotípicas:

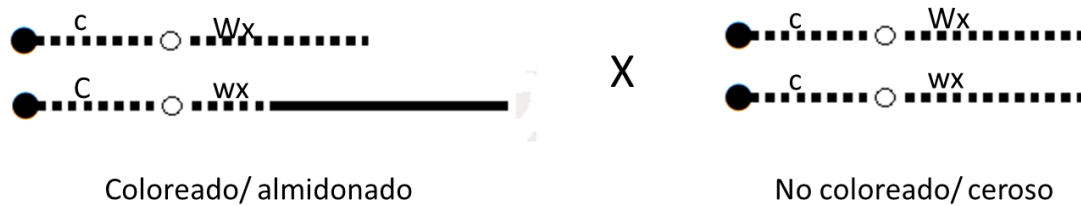


Figura 1.6 Cruza para la correlación del entrecruzamiento cromosómico y el entrecruzamiento genético. Modificado de Creighton y Mc Clintock, 1931. La letra *a* representa el cromosoma nueve especial.

coloreado - almidonado; coloreado -ceroso; no coloreado - almidonado y no coloreado - ceroso. La categoría fenotípica no coloreado - ceroso podría ocurrir sólo si ocurría un evento de entrecruzamiento en el progenitor *c Wx/ C wx*.

Cuando compararon en el microscopio los cromosomas de la progenie encontraron que toda la progenie de tipo parental mantenía la organización de los cromosomas parentales, mientras que en la progenie donde hubo entrecruzamiento cromosómico, los cromosomas eran morfológicamente diferentes a los parentales. Uno presenta el cromosoma nueve con knob y el otro era un cromosoma nueve sin knob pero con el cromosoma ocho (Creighton y Mc Clintock, 1931).

Estos resultados mostraron una correlación entre la recombinación genética de los alelos y la presencia de un marcador citológico, un intercambio genético de los cromosomas en los padres (Brooker, 2005). Lo que implica corte y reunión de un segmento de los cromosomas.

1.2.3. ¿En qué momento ocurre el entrecruzamiento?

El intercambio genético entre los cromosomas puede ocurrir antes, durante o después de la duplicación de los cromosomas (Avers, 1983). Para determinar en qué momento ocurría el entrecruzamiento cromosómico, se utilizó el análisis de tétradas, desarrollado en la década de 1940, gracias al empleo de hongos, como *Neurospora crassa*.

El análisis de las tétradas permite el estudio de meiosis individuales, observando el comportamiento de los genes y los patrones de segregación en células individuales (Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2002).

En *N. crassa* los productos de la meiosis se desarrollan directamente en una tétrada con cuatro esporas (Griffiths *et al.*, 2002), las cuales se encuentran de manera ordenada debido a que la meiosis del cigoto ocurre dentro del asca, que es una estructura que se alarga conforme se forman los productos meióticos, situada en el interior del cuerpo fructífero (Tamarin, 1982). El asca es estrecha, por lo que el huso está obligado a orientarse a lo largo del eje longitudinal del asca, tanto en la primera como en la segunda división de la meiosis (Tamarin, 1982). Posteriormente, una vez concluida la meiosis tiene lugar una división mitótica que da lugar a ocho esporas (Fig. 1.7a) (Griffiths *et al.*, 2002).

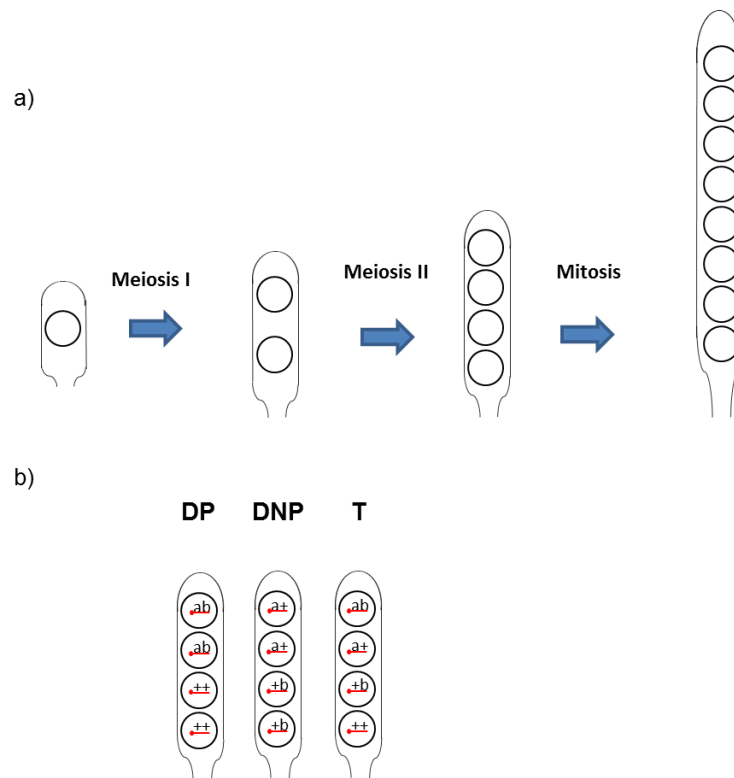


Figura 1.7 a) Esquema de la meiosis y mitosis en las ascas de *Neurospora*; b) Tipos de ascas que se forman después de la meiosis para dos genes ligados. Modificado de Tamarin 1982.

En el análisis de tétradas para dos genes ligados (a y b) las ascas resultantes de la meiosis de un cigoto diploide producto de la fusión de una espora haploide *ab* con una espora haploide *++*, presentan tres patrones: ditipo parental (DP), ditipo no parental (DNP) y tetraploide (T) (Fig.1.7b).

Las ascas con el patrón DP tienen dos tipos de esporas, que son idénticas a las esporas haploides que les dieron origen (parentales). Las ascas tipo DNP presentan sólo dos tipos

de esporas que son diferentes a las esporas parentales. Y las ascas con patrón T presentan cuatro tipos de esporas, dos como las esporas parentales y dos no parentales (Fig. 1.7 b).

Las ascas DP se originan cuando no hay entrecruzamiento entre los genes (Fig. 1.8 a). Si ocurre un entrecruzamiento cromosómico antes de la replicación, las ascas resultantes de la meiosis sólo serán ascas de tipo DNP, por lo que no se recobrarían las ascas tipo T (Figura 1.8 b).

La única manera de obtener ascas de tipo T, es si ocurre un entrecruzamiento cromosómico después de la replicación, entre dos de las cuatro cromátidas hermanas (Fig.1.8 c). Por lo tanto, las ascas tipo T encontradas en el análisis de tétradas son la evidencia de que el entrecruzamiento cromosómico debe ocurrir después de la replicación del material genético (después de la fase S del ciclo celular). Como consecuencia, las ascas DNP se formarían cuando hay dos eventos de entrecruzamientos cromosómicos después de la replicación, lo cual tendría una probabilidad baja, concordante con la que se recupera cuando hay ligamiento.

Por lo tanto el entrecruzamiento cromosómico es más probable que ocurra después de la síntesis del DNA.

1.3 Mapeo genético

La consistencia de las frecuencias de recombinación para dos genes ligados cualesquiera en experimentos repetidos mostró que los genes tenían una posición fija en los cromosomas, y que todos los genes en un grupo de ligamiento tenían un orden lineal a lo largo del mismo cromosoma (Sturtevant, 1913; Morgan *et al.*, 1920). Esto implicaba que los cerca de 100 caracteres mutantes estudiados en *Drosophila melanogaster* debían encontrarse en cuatro grupos, el número de cromosomas de la mosca (Morgan, 1911; Morgan *et al.*, 1915) y para cada cromosoma podía determinarse el orden de los genes que lo componían (Sturtevant, 1913).

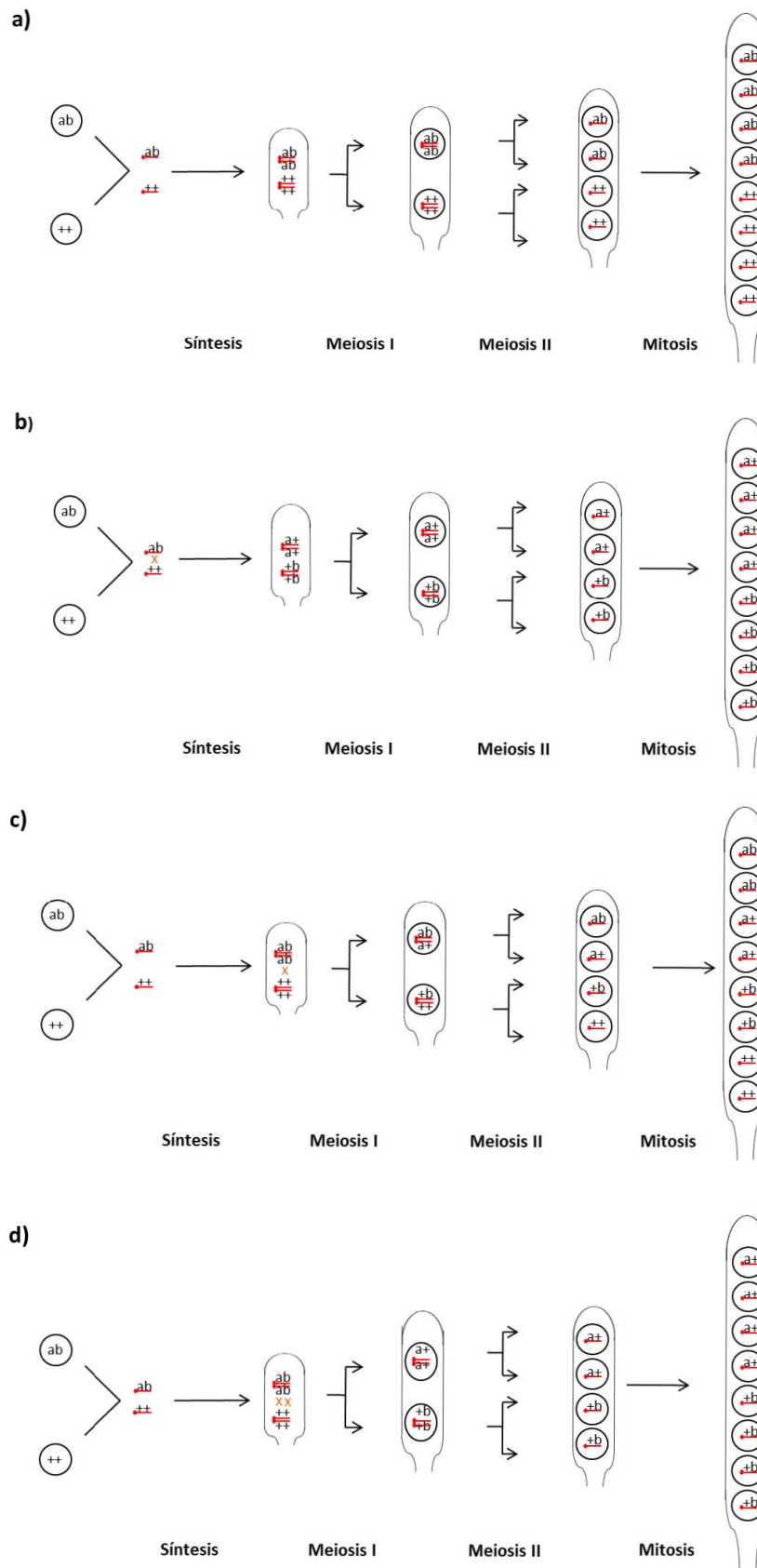


Figura 1.8 Formación de ascas para dos genes ligados: a) sin entrecruzamiento b) con entrecruzamiento antes de síntesis c) un entrecruzamiento después de síntesis d) dos entrecruzamientos después de síntesis

El mapeo genético es una herramienta que permite establecer el orden y la distancia entre los genes con base en la frecuencia de recombinación obtenida entre un par de genes y se basa en dos generalidades:

-Si cada gen ocupa un lugar determinado (locus) en un cromosoma entonces las diferentes proporciones de entrecruzamientos o frecuencias de recombinación encontradas para distintos pares de factores (genes) son una estimación de la distancia que separa a los dos genes a lo largo del cromosoma (Sturtevant, 1913; Morgan *et al.*, 1915).

-Cuanto mayor sea la distancia entre dos genes, mayor será la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento entre ellos porque hay más espacio para un evento que tendrá lugar en cualquier parte de la región. Si dos genes se encuentran más cerca, hay menos espacio y, por tanto, menos posibilidades de un intercambio que tendrá lugar entre ellos (Sturtevant, 1913; Morgan *et al.*, 1915; Morgan, 1919; Morgan *et al.*, 1920).

Por lo tanto, la frecuencia de recombinación, que es la proporción de recombinantes en la descendencia total de la progenie y una medida indirecta del número de entrecruzamientos que ocurrieron durante la formación de los gametos, puede utilizarse como un índice de las distancias entre dos genes (Sturtevant, 1913).

La distancia entre dos genes se expresa en unidades de mapa o centiMorgans. Las unidades de mapa o centiMorgans son una medida funcional relativa, no representan medidas reales de la longitud del cromosoma en micrómetros u otras unidades físicas (Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2002). Una unidad de mapa representa una porción de la longitud del cromosoma tal que, en promedio, en esta porción se produce un entrecruzamiento por cada 100 gametos formados (Sturtevant, 1913).

Con esta herramienta se construyó el mapa genético de cada uno de los cromosomas de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente los mapas genéticos fueron aplicados a otros seres vivos.

1.3.1. Mapeo de dos genes

El mapeo de dos genes nos permite determinar la distancia que hay entre genes que se encuentran en el mismo cromosoma.

Primero es necesario caracterizar el fenotipo que producen los genes estudiados y sus alelos alternativos, y obtener líneas puras para los dos genes estudiados. Después hay que hacer una cruce progenitora, con los individuos de las líneas puras, para obtener organismos dihíbridos, es decir, organismos heterocigotos para los dos genes. Posteriormente se realiza una cruce de prueba, con un organismo heterocigoto (obtenido en la cruce progenitora) y un homocigoto recesivo para los dos genes implicados (Fig. 1.9). Finalmente se requiere clasificar y contar la descendencia de la cruce de prueba en las cuatro categorías fenotípicas para calcular la frecuencia de recombinación entre los dos genes estudiados. El valor de la frecuencia de recombinación obtenido se traduce directamente en la distancia entre los genes estudiados (Anexo AI.3).

Los estudios de ligamiento realizados con *Drosophila* y otros organismos indican que las frecuencias de recombinación que se pueden detectar varían entre 0 y 50% para dos genes ligados en el mismo cromosoma (Avers, 1984).

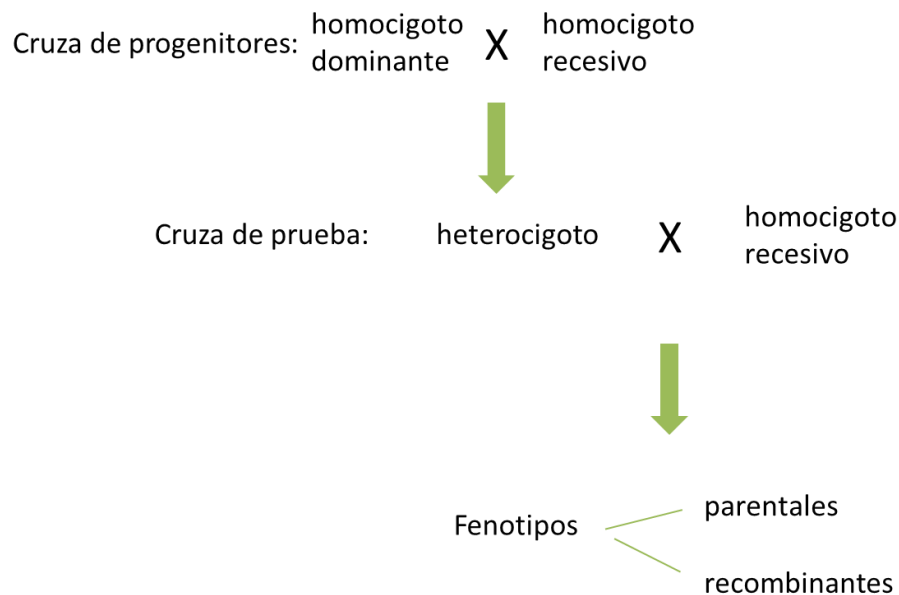


Figura 1.9 Esquemas de las cruces para realizar el mapeo de dos genes.

Si la frecuencia de recombinación es menor 0.50, indica que los dos genes estudiados se localizan en el mismo cromosoma, por lo que la tendencia a permanecer en el arreglo original es función de la distancia a la que se encuentran en el cromosoma, hasta un límite de 0.5, 50 % de recombinación o 50 unidades de mapa, donde el efecto del ligamiento ya no es detectable.

El porcentaje de recombinantes genéticos se convierte directamente en el porcentaje de entrecruzamiento durante la formación de los gametos y este porcentaje a su vez se traduce en las unidades de mapa de distancia entre dos genes ligados (Sturtevant, 1913). No obstante, el número de recombinantes genéticos no es igual al número de entrecruzamientos, por lo tanto la distancia entre los genes no es exacta (Avers, 1984). Esto debido a que los entrecruzamientos son un proceso aleatorio y entre dos genes (*A* y *B*) puede ocurrir más de un entrecruzamiento.

Una consecuencia del doble entrecruzamiento consiste en que el cambio en el arreglo de los genes provocado por el primer entrecruzamiento se cancela cuando se presenta un segundo evento de intercambio (Fig. 1.10). Con el fin de ver si el doble entrecruzamiento se produce entre dos genes y la frecuencia en la que ocurre este proceso es necesario utilizar tres genes (Sturtevant, 1913).

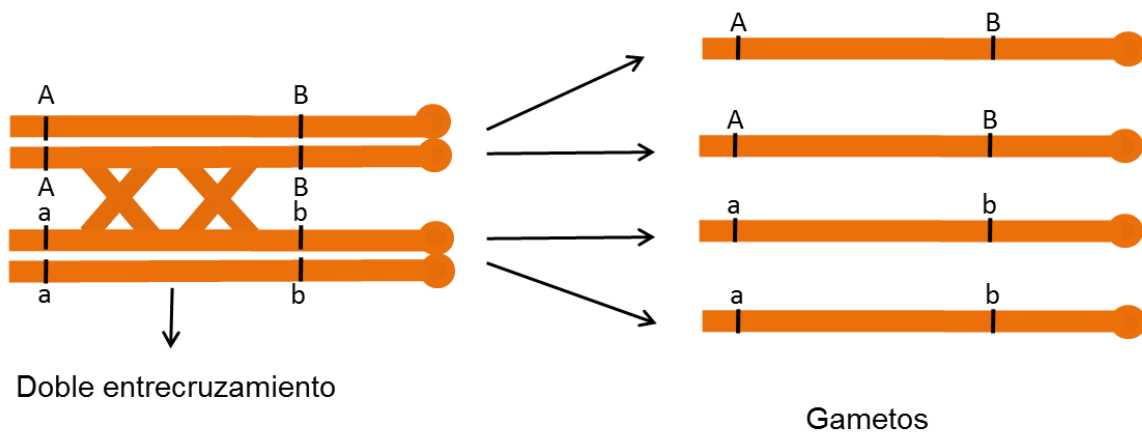


Figura 1.10 Representación de un doble entrecruzamiento entre las mismas cromátidas, el orden de los genes se mantiene en las gametas.

1.3.2. Mapeo de tres genes

El mapeo de tres puntos detecta los dobles entrecruzamientos en una región cromosómica, además de que permite conocer el orden de los genes a partir de una sola crucea.

Para realizar el análisis de ligamiento de tres genes: A, B y C, al igual que el análisis de dos genes es necesario partir de una crucea progenitora, para obtener organismos trihíbridos y con ellos realizar la crucea de prueba (Fig. 1.11).

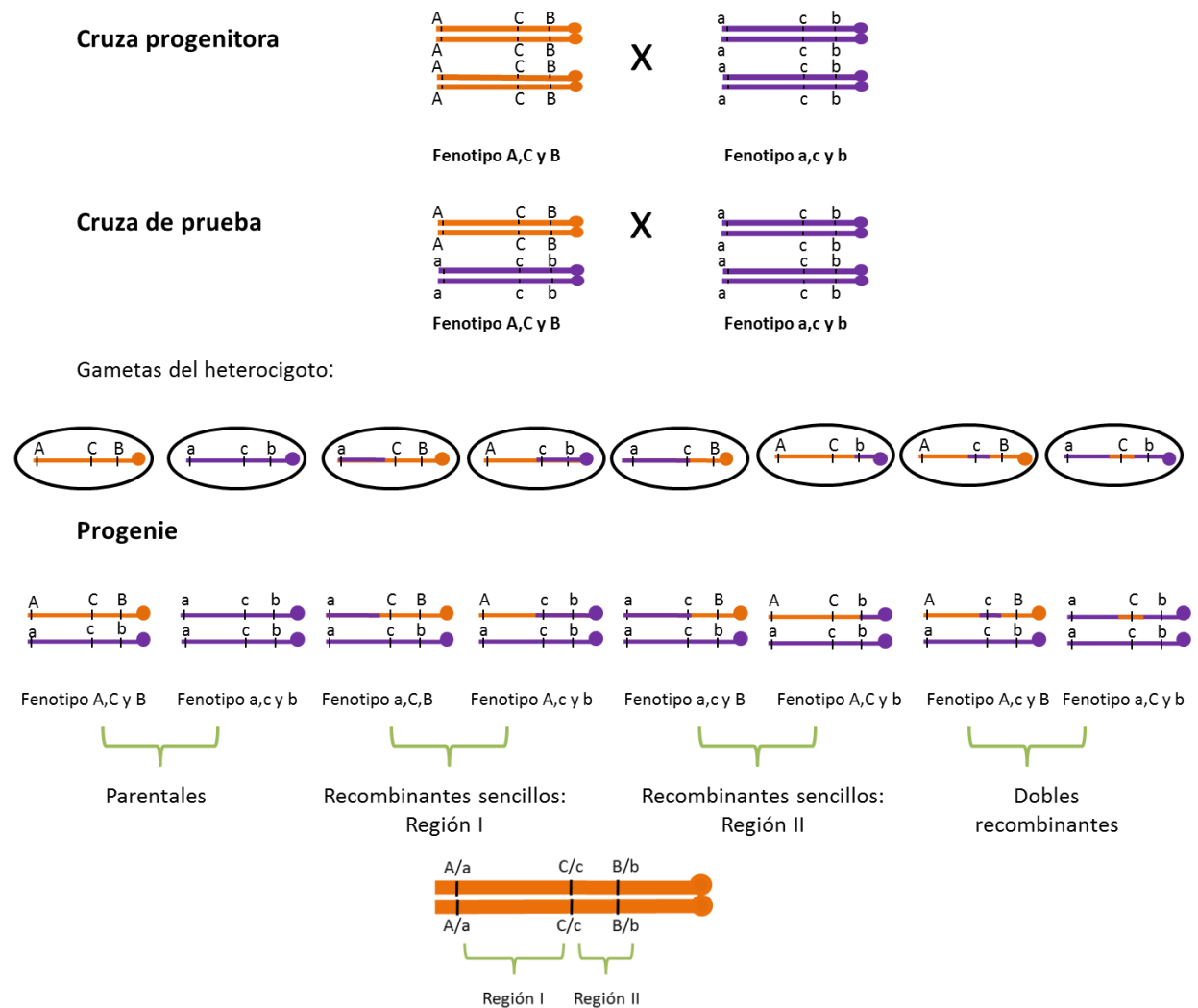


Figura 1.11. Mapeo de tres puntos para genes autosómicos. Los cromosomas encerrados en un círculo representan los gametos formados por el individuo heterocigoto, las gametas del organismo homocigoto recesivo no se representan porque todas son portadoras de los genes a, c y b. En la progenie se representa la progenie resultante de la unión de los gametos del heterocigoto con los gametos del homocigoto recesivo, su clasificación y el número de progenie por categoría. En el cromosoma de la parte inferior se indican la Región I y la región II.

Debido a que ahora se utilizan tres genes, en la cruce de prueba se esperan ocho categorías fenotípicas. Para facilitar el análisis se denominará región I al espacio entre los genes A y C y región II al espacio entre los genes C y B (Fig. 1.11).

En cada tétrada de un organismo trihíbrido (ACB/acb) pueden ocurrir: 1) ningún evento de intercambio por lo que sólo se producirán gametas con los arreglos parentales (ACB, acb) ; 2) un evento de intercambio en la región I ó en la región II, por lo que se obtendrán gametas recombinantes simples (aCB, Acb y acB, ACb para las regiones I y II, respectivamente) y 3) dos eventos de intercambio, uno en la región I y uno en la región II, los que producirán gametas AcB y aCb. (Fig. 1.12). El arreglo de los genes externos se mantiene, pero el gen de en medio cambió, lo que es indicativo de la presencia de dos eventos de intercambio, uno entre A y C y otro entre c y B.

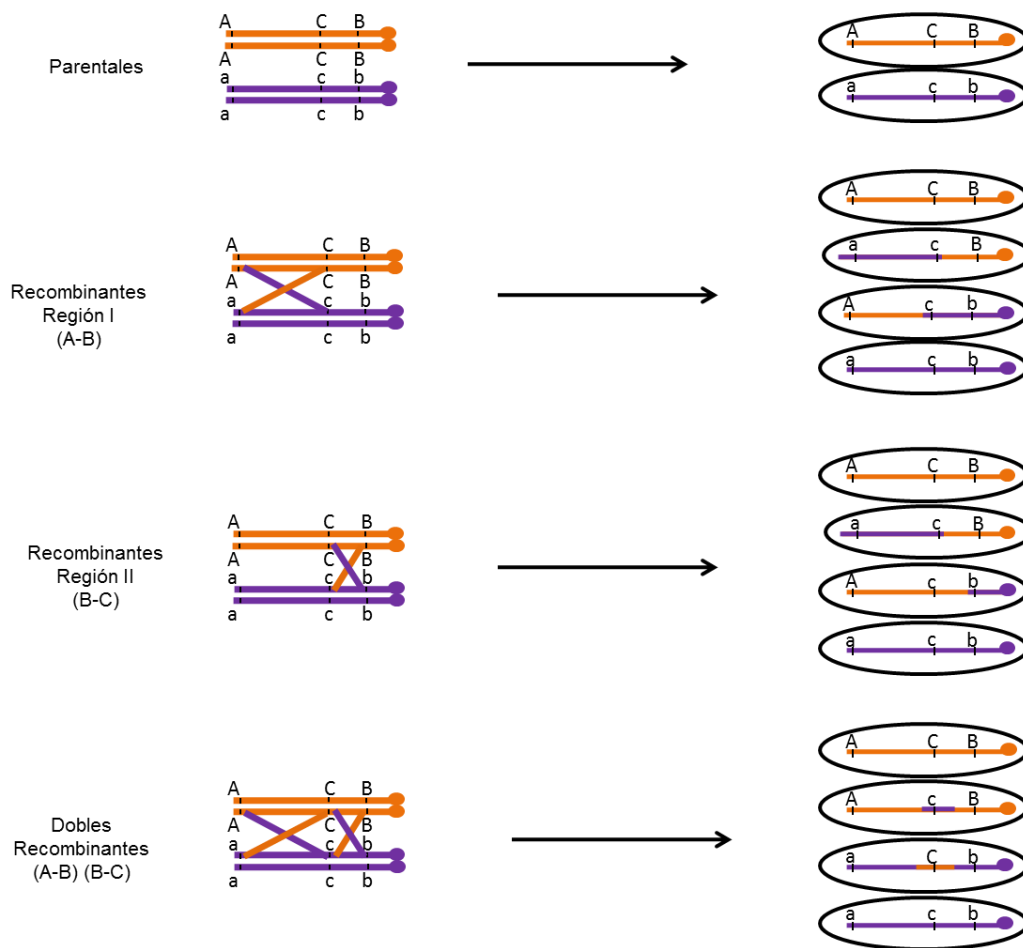


Figura 1.12. Tipos de gametas formadas por un organismo trihíbrido, dependiendo si no hay entrecruzamientos o si hay entrecruzamientos sencillos o dobles.

La descendencia de la cruce se debe clasificar y contar por fenotipos. Primero se debe determinar los fenotipos parentales, que son las dos categorías con mayor número de progenie que se complementan entre sí, es decir, que reconstruyen el arreglo de genes del heterocigoto (ACB/acb) (Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2003; Pierce, 2010). Después hay que identificar los fenotipos dobles recombinantes, que corresponden a las dos categorías complementarias pero con menor progenie, debido a que la probabilidad de que se produzca un doble entrecruzamiento es menor que la de un entrecruzamiento sencillo (Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2003; Pierce, 2010).

Posteriormente hay que comparar los fenotipos de los parentales y los dobles recombinantes, el fenotipo en el que difieran corresponderá al gen que se encuentra en medio; ya que para producir un doble entrecruzamiento, debe ocurrir un entrecruzamiento en el espacio entre el gen que está en medio y el gen que está a su derecha y otro entrecruzamiento entre el gen que se encuentra en medio y el gen a su izquierda. Por lo que el gen que se encuentra en medio cambiará su arreglo respecto a los parentales (Avers, 1984) indicando el orden de los genes (Fig. 1.13).

Una vez ordenados los genes correctamente se escriben los genotipos correctos con el fin de determinar los sitios donde han ocurrido los entrecruzamientos sencillos. Las cuatro categorías fenotípicas restantes corresponden a los recombinantes sencillos.

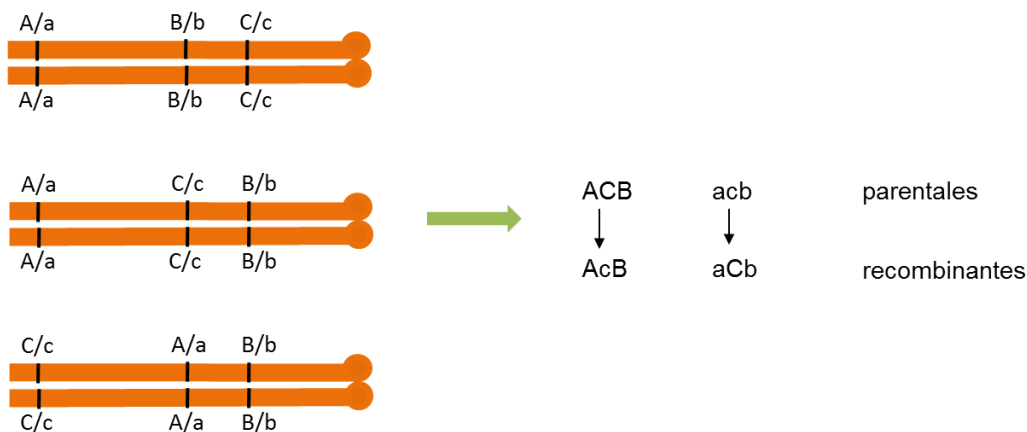


Figura 1.13. Los cromosomas naranjas representan las tres formas en las que se pueden ordenar los tres genes: A, B y C. La segunda secuencia es el orden correcto de los genes ya que al comparar los fenotipos parentales y dobles recombinantes el gen que cambia es el C lo que indica que es el gen que está en medio.

Finalmente, el porcentaje de entrecruzamiento se calcula por separado para cada región. Para calcular los entrecruzamientos en la región I se suma el total de dobles recombinantes más el total de recombinantes sencillos para esta región y se dividen entre el total de individuos recobrados. De la misma manera, se suman los dobles recombinantes, más los recombinantes sencillos para la región dos y se dividen entre el total de individuos recobrados (Avers, 1984; Griffiths *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2003; Pierce, 2010). Las frecuencias de recombinación obtenidas representan la distancia que hay entre los genes (Anexo I.4).

El mapeo genético permite establecer la disposición de los genes en los cromosomas, que se representa esquemáticamente como un mapa cromosómico unidimensional, que muestra las posiciones de los genes y la distancia que hay entre ellos. Esta información es crucial para construir genotipos complejos requeridos para fines experimentales, para aplicaciones comerciales o para explorar la interacción entre genes. Además, este tipo de metodología permite predecir el tipo y proporción de los fenotipos de la progenie en cruza nuevas.

Sturtevant (1913) fue el primero en obtener un mapa genético, a partir de las frecuencias de recombinación obtenidas de un conjunto de cruza que involucraban genes ligados al cromosoma X de *Drosophila melanogaster* y desde entonces se han construido mapas genéticos de los cuatro cromosomas de la mosca del vinagre con aproximadamente 3800 genes, un cuarto del total han sido mapeado por recombinación (Kafatos *et al.*, 1991).

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, fue introducida en la investigación genética por Thomas Morgan y desde entonces se convirtió en uno de los organismos más estudiados. Actualmente es un modelo biológico empleado en diferentes disciplinas científicas para la investigación de diversos procesos biológicos en común con otros eucariontes incluidos los humanos (Adams *et al.*, 2000) ya que el conocimiento sobre la estructura y función de su genoma es mucho mayor que el de otros organismos multicelulares. El genoma de *D. melanogaster* publicado en el 2000 mostró que contiene 180 Mb, de los cuales 120Mb es eucromatina con aproximadamente 13, 601 genes que se distribuyen en un cromosoma sexual, dos autosomas largos y un pequeño autosoma que contiene sólo alrededor de 1 Mb de eucromatina (Adams *et al.*, 2000).

1.4 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

La palabra “*Drosophila*” proviene del griego y significa amante del rocío, probablemente refiriéndose a la atracción de estas mosca por los frutos húmedos; *melanogaster* significa vientre negro, debido a la punta de color negro del abdomen del macho de la especie. Por lo tanto *D. melanogaster* significa "amante de rocío de vientre negro" (Powell, 1997).

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un insecto homometábolo, que pertenece al orden Diptera, (Demerek, 1994) dentro del grupo artificial llamado *melanogaster* del subgénero *Sophophora* (Jeffs *et al.*, 1994; Russo, 1995), que contiene más de 150 especies (Jeffs *et al.*, 1994; Powell 1997; Schawaroch,2002).

D. melanogaster es una especie cosmopolita (Bock y Wheeler, 1972), se localiza especialmente en las frutas suaves, donde la fermentación se ha iniciado y en general en alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos *et al.*, 1993; Powell, 1997).

Entre las ventajas que presenta *Drosophila melanogaster* se encuentran el tiempo generacional, aproximadamente de 10 a 12 días a 25°C y 60% de humedad (Fig. 1.14). Por otra parte su mantenimiento es de bajo costo y requiere de poco espacio, la progenie promedio por hembra son 500 huevos (Sobels y Vogel, 1976; Vogel, 1987). Además se cuenta con más de 12,000 cepas con marcadores específicos (Lindsley y Zimm, 1992) lo que permite elaborar diferentes tipos de cruzas para detectar y caracterizar la acción de agentes mutagénicos (Vogel, 1974).

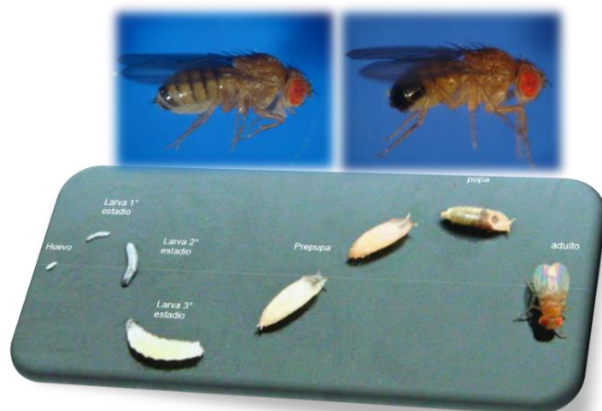


Figura 1.14 Ciclo de vida de las moscas del vinagre: hembras y machos. Modificado de Linda Muñoz Martínez.

En contraste con otros sistemas de prueba, donde sólo puede ser estudiado una clase de daño genético, *Drosophila melanogaster* permite determinar diferentes tipos de daño en distintos tipos celulares, tanto para hembras como para machos (Vogel, 1974) entre las que se incluyen: mutaciones puntuales, no disyunciones, translocaciones e inversiones cromosómicas, genes letales dominantes, genes letales recesivos y recombinación (Sobels, 1974). También es una poderosa herramienta para estudiar la reparación del rompimiento de ADN de cadena doble (Dezzani *et al.*, 1982).

D. melanogaster tiene la capacidad biotransformación de compuestos debido a la presencia de un complejo enzimático microsomal parecido a la fracción S9 del hígado de los mamíferos (Sobels y Vogel, 1976; Baars, 1980) la cual contienen numerosas enzimas de la familia P450 (Klaassen y Watkins, 2006). *D. melanogaster* tiene 90 genes pertenecientes a la familia del citocromo P450 (Adams *et al.*, 2000). Estas enzimas participan de manera importante en la activación de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos (Clark, 1982; Hällstrom, 1981 a, b), en particular en el de moléculas que contienen átomos de nitrógeno, como es el caso de aminas (Zijilstra y Vogel, 1988). Las larvas de tercer estadio presentan activas la mayoría de las rutas metabólicas que se expresaran en la mosca adulta (Hallstrom *et al.*, 1981; Clark, 1982).

Por esta razón *D. melanogaster* ha sido un modelo biológico utilizado ampliamente para el estudio de compuestos promutágenos, como la NaN_3 .

1.5 Características de la Azida de sodio

1.5.1 ¿Qué es la azida de sodio?

La azida de sodio (NaN_3) es una sal incolora o blanca, sin olor, soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol (Index Merck, 1989), forma parte de las azidas inorgánicas y tiene un pK de 4.8 (Kleinhof *et al.*, 1978). Este compuesto tiene una amplia variedad de usos en la industria, la agricultura, la medicina y la investigación.

En la industria es un reactivo común en la síntesis orgánica, ya que tiene una gran capacidad para realizar numerosas reacciones y producir átomos de nitrógeno, por lo que

se emplea como detonador, en la producción de caucho, en la purificación de aleaciones de aluminio y de silicón con aluminio, para prevenir la oxidación del acero y recientemente para inflar bolsas de aire de seguridad en los automóviles (Tomlinson,1980). En la agricultura es utilizada como herbicida, nematocida y fungicida, estimulante de la germinación de semillas, inhibidor de la nitrificación y como desinfectante de granos. En medicina, es un conservador de productos de diagnóstico y es empleado como un agente contra la hipertensión, ya que disminuye la presión arterial. En investigación es utilizada como un inhibidor de la respiración celular, bactericida y como un agente para seleccionar bacterias gram positivas (Sander *et al.*, 1978;Kleinhof *et al.*, 1978; Arenaz *et al.*,1989).

1.5.2. Mecanismos de acción de la NaN_3 .

La NaN_3 inhibe a las hemoproteínas, enzimas que contienen cobre, zinc u otros metales, como: la catalasa, el citocromo c, la reacción de indofenol y la anhidrasa carbónica. Estos efectos se deben principalmente a la interacción de la azida con el grupo hemo que contienen algunas proteínas. La inhibición puede efectuarse al combinarse la azida con un sitio de unión del metal en la forma de ácido libre HN_3 o en forma del compuesto iónico N_3^- . (Kleinhof *et al.*, 1978).

La NaN_3 , es un promutágeno que es metabolizado *in vivo* e *in vitro* a β azidoalanina (Owais *et al.*, 1979; Owais *et al.*, 1983; Owais y Kleinhofs, 1988) el intermediario más estable de la azida debido a los grupos aminos libres que presenta (Owais *et al.*, 1981, Owais *et al.*, 1983), los cuales son esenciales para la actividad mutagénica en *S. typhimurium* (La Velle y Mangold, 1987). La β azidoalanina es un compuesto fuertemente polar, soluble en agua, alcohol y dimetil-formamida, se recristaliza con gran dificultad, fue encontrado en cebada (Owais *et al.*, 1978) y bacterias (Owais *et al.*, 1979). La enzima involucrada en la conversión de la azida a la azidoalanina es la o-acetil-L-serina (thiol) sulfidrilasa (Owais *et al.*, 1981; Rosichan *et al.*,1983).

En bacterias como *Staphylococcus aureus* (Nilan *et al.*,1973;Owais *et al.*,1988), *Escherichia coli* (Kleinhofs *et al.*, 1978) y *Salmonella typhimurium* (Kleinhofs *et al.*, 1975; Kleinhofs *et al.*, 1978) la NaN_3 es un mutágeno potente. Sin embargo, en organismos eucariontes los resultados son controversiales.

En plantas se ha encontrado que la azida es un mutágeno potente en semillas de cebada (Nilan *et al.*, 1973) chícharos (Hadwiger *et al.*, 1976; Sander y Muehlbauer, 1977) habas y maíz (Kleinhofs *et al.*, 1978). Pero en *Arabidopsis thaliana* (Gichner y Valemínsky, 1977) y violetas africanas (Warfield, 1974) la azida de sodio no presenta actividad mutagénica, de la misma manera que en *Neurospora* (Tomlinson, 1980). En células de hámster chinos (Jones *et al.*, 1980) y ratón (Slamenová y Gabelova, 1980), la NaN₃ presenta una respuesta mutagénica débil; en cebada (Nilan *et al.*, 1973; Sander *et al.*, 1978) y leucocitos humanos (Sander *et al.*, 1978) no induce aberraciones cromosómicas, ni intercambio de cromátidas hermanas (Arenaz, 1983).

En el caso de *Drosophila melanogaster* el efecto mutagénico de la NaN₃ se ha evaluado mediante la prueba de genes letales recesivos, los resultados han sido negativos cuando la exposición se ha hecho por inyección de adultos (Clark, 1958; Sadiq y Owais, 2000), alimentación de larvas y por inmersión de larvas y adultos (Kleinhof *et al.*, 1978); pero cuando son expuestos machos adultos hay una respuesta significativa (Kamra y Gollapudi, 1979). Otro estudio, que cuantifica la inducción de mutación somática y recombinación mitótica (prueba SMART), muestra que la exposición de larvas del tercer estadio induce reparación por recombinación somática (González y Ramos, 1997).

El mecanismo mutagénico de la NaN₃ aún no ha sido establecido. Se ha reportado que en microesporas y semillas de cebada, así como en leucocitos humanos la NaN₃ no interactúa directamente con el DNA (Sander *et al.*, 1978) por lo que se ha propuesto que este compuesto actúa de manera indirecta (Arenaz, 1983) al inhibir la catalasa y peroxidasa genera la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (Nilan *et al.*, 1973; Kleinhofs *et al.*, 1975) los cuales producen daños acumulativos en el DNA. Otros estudios han reportado el potencial clastogénico de la NaN₃ en *Tradescantia* (Ma, *et al.*, 1994), *Vicia faba* (Kanaya *et al.*, 1994) y *Drosophila melanogaster* (González y Ramos, 1997)

Aunque han sido ampliamente estudiadas las propiedades genotóxicas de la NaN₃, su espectro mutagénico *in vivo* es aún controversial (González y Ramos, 1997).

Justificación

Los factores ambientales modulan los patrones de evolución. La evolución es el proceso de cambio, adaptación y diversificación de las poblaciones a través del tiempo. Subyacentes a todos estos cambios se encuentran las modificaciones en el material hereditario. Los cambios en el ambiente pueden alterar la calidad, cantidad y expresión del material genético. No obstante, se ha estudiado poco acerca del impacto del ambiente en procesos considerados altamente conservados como el entrecruzamiento cromosómico entre genes ligados en las células germinales y su posible impacto en las proporciones de nuevas combinaciones genéticas, las cuales en corto plazo, generan gran parte de la variación de las poblaciones (Futuyma, 1998; Griffiths *et al.*, 2003) y a largo plazo, contribuyen a la diversidad biológica.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar si la frecuencia de recombinación entre genes del cromosoma X de células germinales de *Drosophila melanogaster* es modificada por la exposición a NaN_3 .

Como objetivos particulares se plantearon:

- i).- Evaluar el efecto de la NaN_3 en los organismos expuestos y el impacto en sus descendientes, a partir de los siguientes biomarcadores: Índice de sobrevivencia, Proporción sexual, Fertilidad, Progenie por machos y Fecundidad.
- ii) Determinar frecuencias de recombinación entre los genes (*white-miniature*) a partir de mapeo de dos genes con la cepa *wm*.
- iii) Estimar las frecuencias de recombinación entre los genes (*yellow-white*) y (*white-miniature*) a partir de mapeo de tres genes con la cepa *ywm*.
- iv) Calcular las frecuencias de recombinación entre los genes (*white-miniature*) y (*miniature-forked*) a partir de mapeo de tres genes con la cepa *wmf*.
- v) Evaluar si las frecuencias de recombinación entre los diferentes pares de genes cambian en función de la concentración de NaN_3 .
- vi).- Determinar el tipo de progenie en la F_2 y su proporción en función de la concentración de NaN_3 .

Hipótesis

Los cambios en el ambiente como la exposición a azida de sodio (NaN_3) modificará la recombinación meiótica de *Drosophila melanogaster*.

Las frecuencias de recombinación obtenidas para cada sistema de cruce pueden verse influidas por los efectos tóxicos y reprotóxicos de los organismos expuestos a NaN_3 , ya que son estimadas a partir de la descendencia de la prole de machos silvestres sobrevivientes a la exposición de NaN_3 .

El efecto de la NaN_3 en las frecuencias de recombinación entre los genes (*white–miniature*) será el mismo para los tres sistemas de cruces.

Si existe un cambio inducido por la NaN_3 , éste será más evidente en las frecuencias de recombinación entre los genes más proximales (*yellow-white*) que entre los genes más alejados: (*white–miniature*) y (*miniature-forked*), ya que la probabilidad de que estos dos genes se entrecrucen dos veces es muy baja (Sturtevant, 1913).

Si la frecuencia de recombinación es sensible a los cambios en el ambiente, la NaN_3 modificará la proporción de los fenotipos en la F_2 .

II. METODOLOGÍA

2.1 Tratamiento con NaN_3

2.1.1 Obtención de larvas para tratamiento

Para obtener las larvas para el tratamiento se cruzaron hembras y machos silvestres en frascos con medio nuevo por un periodo de 8 horas, con la finalidad de coleccionar huevos, al termino de este periodo se obtuvieron larvas de 72 horas que se extrajeron por el método de Nöttinger (1970) el cual consiste en separar las larvas del medio mediante un gradiente de densidad generado por una disolución de sacarosa al 20%.

2.1.2 Tratamiento

Se disolvieron 2.4mg de azida de sodio en 10ml de agua destilada obteniendo una disolución de 3.6 mM, a partir de la cual se realizaron nueve diluciones sucesivas con las siguientes concentraciones: 0.125, 0.00049, 3.1E-05, 3.8E-06 , 2.4 E-07, 1.9 E-09, 1.5 E-11, 1.8E-12 y 1.13E-13mM. Como testigo negativo se ocupó agua destilada.

De las diluciones realizadas se tomaron 4.5ml por cada concentración que se mezclaron con 1g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) contenido en tubos homeopáticos. Por cada concentración se realizaron dos repeticiones. Posteriormente se colocaron aproximadamente 100 larvas de 72 horas de edad a cada tubo homeopático, donde permanecieron hasta el periodo de pupación (donde no ingiere alimento), sometándose a un tratamiento subcrónico vía alimentación (72X48 hrs).

Después de una semana se recobraron los adultos emergidos, los cuales se separaron y clasificaron por sexo, para obtener el índice de sobrevivencia y la proporción sexual.

2.2 Mapeo genético

2.2.1 Cepas para el mapeo genético

Se utilizaron cuatro cepas de *Drosophila melanogaster*, una cepa de moscas silvestres (Canton-S) y tres cepas mutantes (*wm*, *ywm* y *wmf*) involucrando los marcadores (Fig.2.1):

y (*yellow*) gen localizado en el cromosoma X a 0.0 unidades de mapa um (John Innes Laboratory, 1941; Meyer,1963; Mickey,1963; Neel,1942; Fernández Gianotti, 1950, University of Buenos Aires, 1951; Lindsley y Zimm, 1992), las moscas que presentan este fenotipo tienen el cuerpo color amarillo; pelos y cerdas cafés con puntas amarillas y las venas y pelos de las alas color amarillo (Lindsley y Zimm, 1992).

w (*white*) gen localizado en el cromosoma X a 1.5 um (Mickey,1963, Farmer, 1974; Lindsley y Zimm, 1992) las moscas con este fenotipo presentan los ojos de color blanco (Lindsley y Zimm, 1992).

m (*miniature*) gen localizado en el cromosoma X a 36.1 um (Kaufman,1969; Lindsley y Zimm, 1992), provoca que las moscas con este fenotipo tengan el tamaño de las alas reducido, sólo ligeramente más largas que el abdomen y con proporciones normales. Las alas son de color gris oscuro y menos transparentes que las silvestres (Lindsley y Zimm, 1992).

f (*forked*) gen localizado en el cromosoma X a 56.7 um (Neel, 1942, Williams, 1956, Oliver, 1939, Buzzati-Traverso, 1947, Goldschmidt, 1944, Mickey, 1952, University of Buenos Aires, 1951;Lindsley y Zimm, 1992),las moscas presentan cerdas acortadas, retorcidas y dobladas con los extremos bifurcados o totalmente doblados (Lindsley y Zimm, 1992).



Figura 2.1 Marcadores fenotípicos: a) *yellow*; b) *white*; c) *miniature*; d) *forked*. Las flechas señalan: a) cuerpo b) ojos c) alas d) cerdas.

2.2.2 Mapeo genético

Se realizaron tres tipos de cruzas con machos silvestres tratados y hembras vírgenes no tratadas de las cepas: *wm*, *ywm*, y *wmf* (Fig. 2.2).

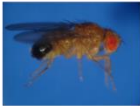
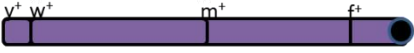





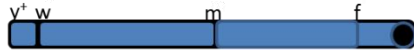
Cepa	Fenotipo	Genotipo
silvestre	 Cuerpo café ojos rojos alas largas cerdas regulares	
<i>wm</i>	 Ojos blancos alas reducidas	
<i>ywm</i>	 Cuerpo amarillo ojos blancos alas reducidas	
<i>wmf</i>	 Ojos blancos alas reducidas Cerdas bifurcadas	

Figura 2.2 Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas para el mapeo genético.

Para determinar si la frecuencia de recombinación entre los genes seleccionados se modificó se seleccionaron aleatoriamente 10 machos por concentración de las moscas recobradas del tratamiento de NaN_3 . Cada macho se colocó en un tubo homoeopático con medio de cultivo con una hembra virgen (*wm*, *ywm* y *wmf*). Obteniendo 10 cruzas individuales por concentración, por cada línea (Para la crusa $wm/wm \times w+m+/Y$, se inició con 15 parejas progenitoras).

Después de 13 días se recuperaron la F_1 de cada crusa progenitora y se cuantificó la frecuencia de machos y hembras para cada uno de los viales. Por cada concentración se escogieron cinco viales de manera aleatoria (Para la crusa $wm/wm \times w+m+/Y$, se

escogieron 8 viales). Por cada vial escogido, se tomaron cinco hembras y cinco machos hermanos para cruzarse ($F_1 \times F_1$) y obtener una F_2 . Las cruces se hicieron de manera individual, en un vial con medio de cultivo se colocaron una hembra y un macho, de manera que se obtuvieron 25 viales sembrados por concentración, (Para la cruce $wm/wm \times w+m+/Y$, se obtuvieron 40 viales) (Fig. 2.3).

Pasados 13 días emergieron los adultos pertenecientes a la F_2 , para cada vial se contó el número de machos y hembras de cada uno de los fenotipos posibles que corresponden a las diferentes categorías de recombinantes y no recombinantes de cada sistema de cruce, wm (Fig. 2.4), ywm (Fig. 2.5) y wmf (Fig. 2.6).

Para la línea wm se hicieron dos repeticiones y para las líneas ywm y wmf se hicieron tres repeticiones.

Las tres cepas mutantes que se utilizaron para el mapeo genético tienen en común los genes *white* y *miniature*, los cuales están separados por 34 μm (Fig. 2.7) por lo tanto se obtuvo la frecuencia de recombinación entre estos dos genes a partir de cada sistema de cruce, permitiendo evaluar si el efecto de la NaN_3 en las frecuencias de recombinación es similar en los tres casos e independiente de las cepas utilizadas para el mapeo.

Además, como las cepas ywm y wmf tienen un tercer marcador fenotípico nos permitió calcular las frecuencias de recombinación entre otras parejas de genes. En el caso de la cepa ywm además de los dos marcadores mencionados tiene al gen *yellow*, el cual está localizado a la izquierda del gen *white* a 1.5 μm , lo que permitió obtener la frecuencia de recombinación entre dos genes de una región adyacente a la región en común (Fig. 2.7). Mientras que la cepa wmf tiene al gen *forked* que se ubica a la derecha del gen *miniature* a una distancia de 20 μm . (Fig. 2.7), obteniendo las frecuencias de una región adyacente a la región entre los genes *white- miniature*.

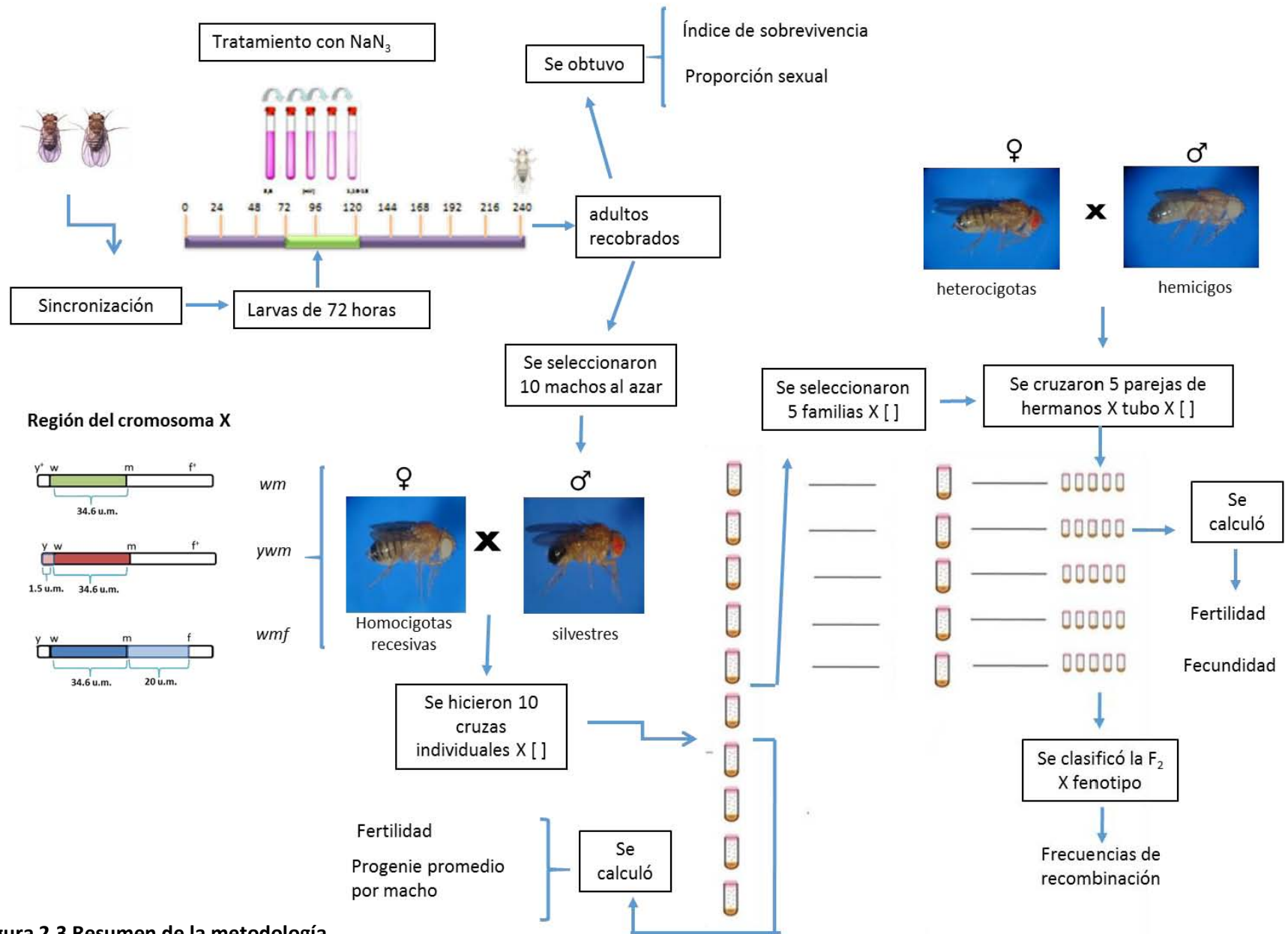


Figura 2.3 Resumen de la metodología

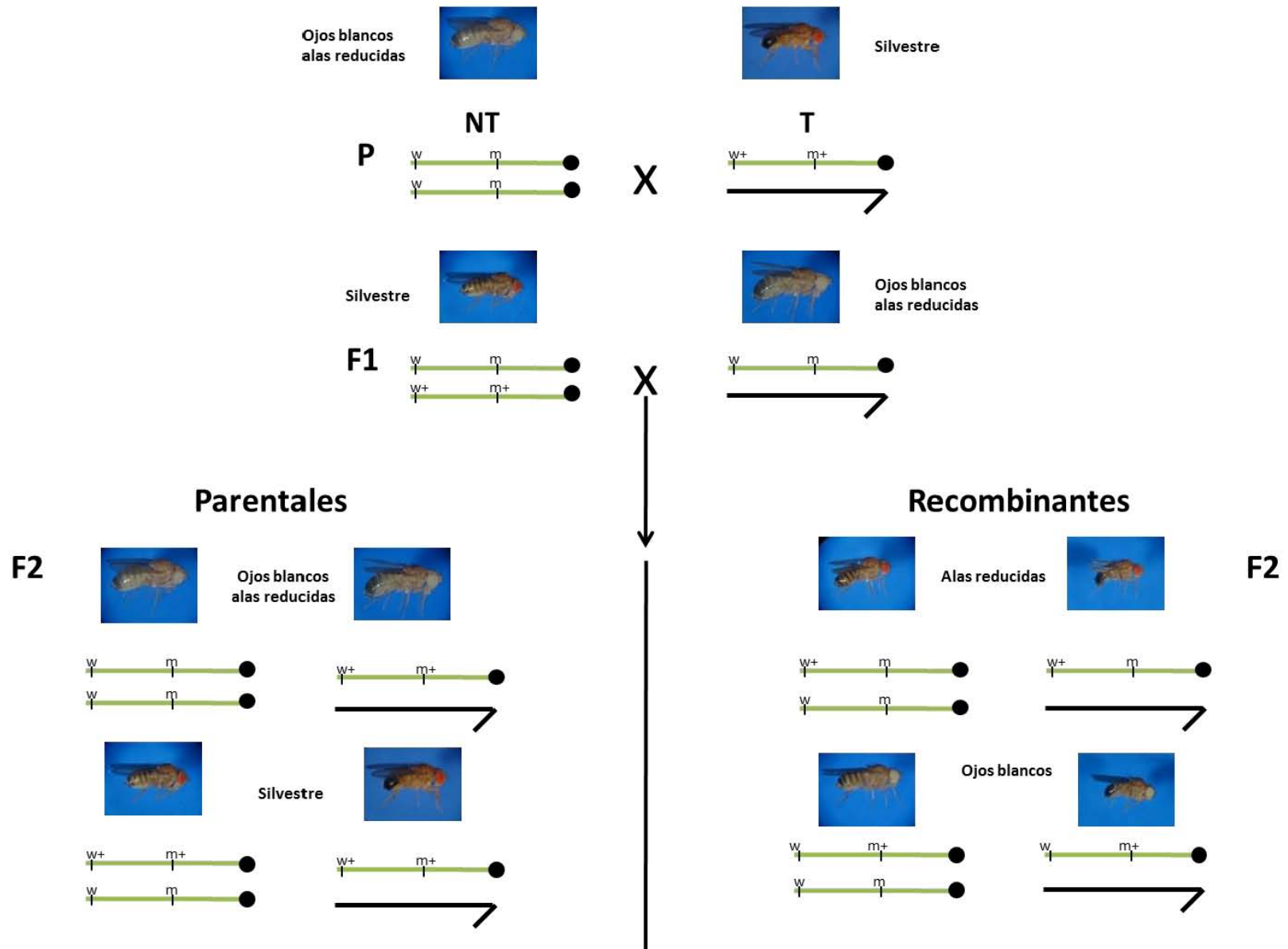


Figura 2.4 Sistema de cruas para el mapeo de dos genes (*white-miniature*), en la F₂ se muestra las categorías fenotípicas resultantes.

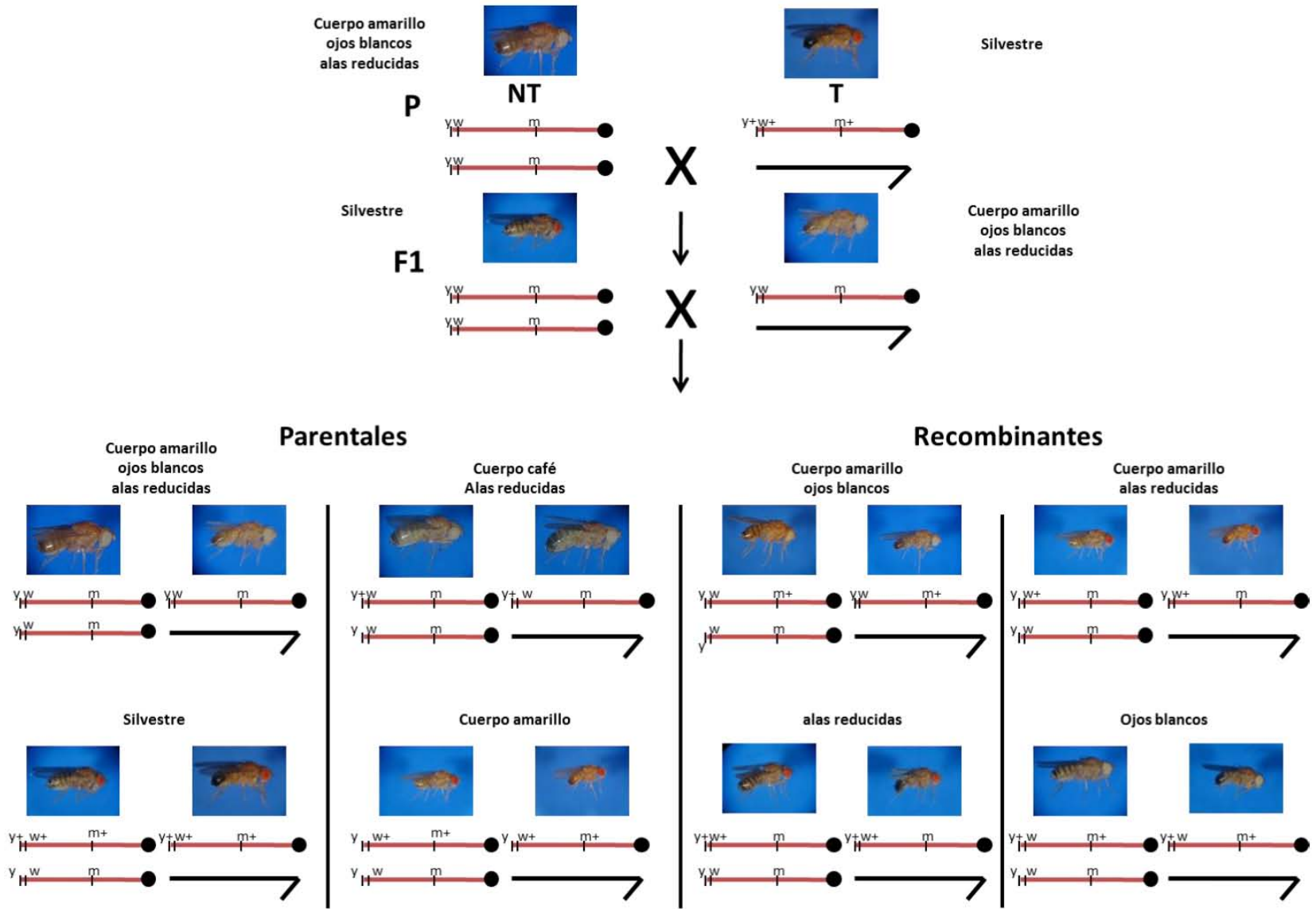


Figura 2.5 Sistema de cruas para el mapeo de tres genes (*yellow-white-miniature*), en la F₂ se muestra las categorías fenotípicas resultantes.

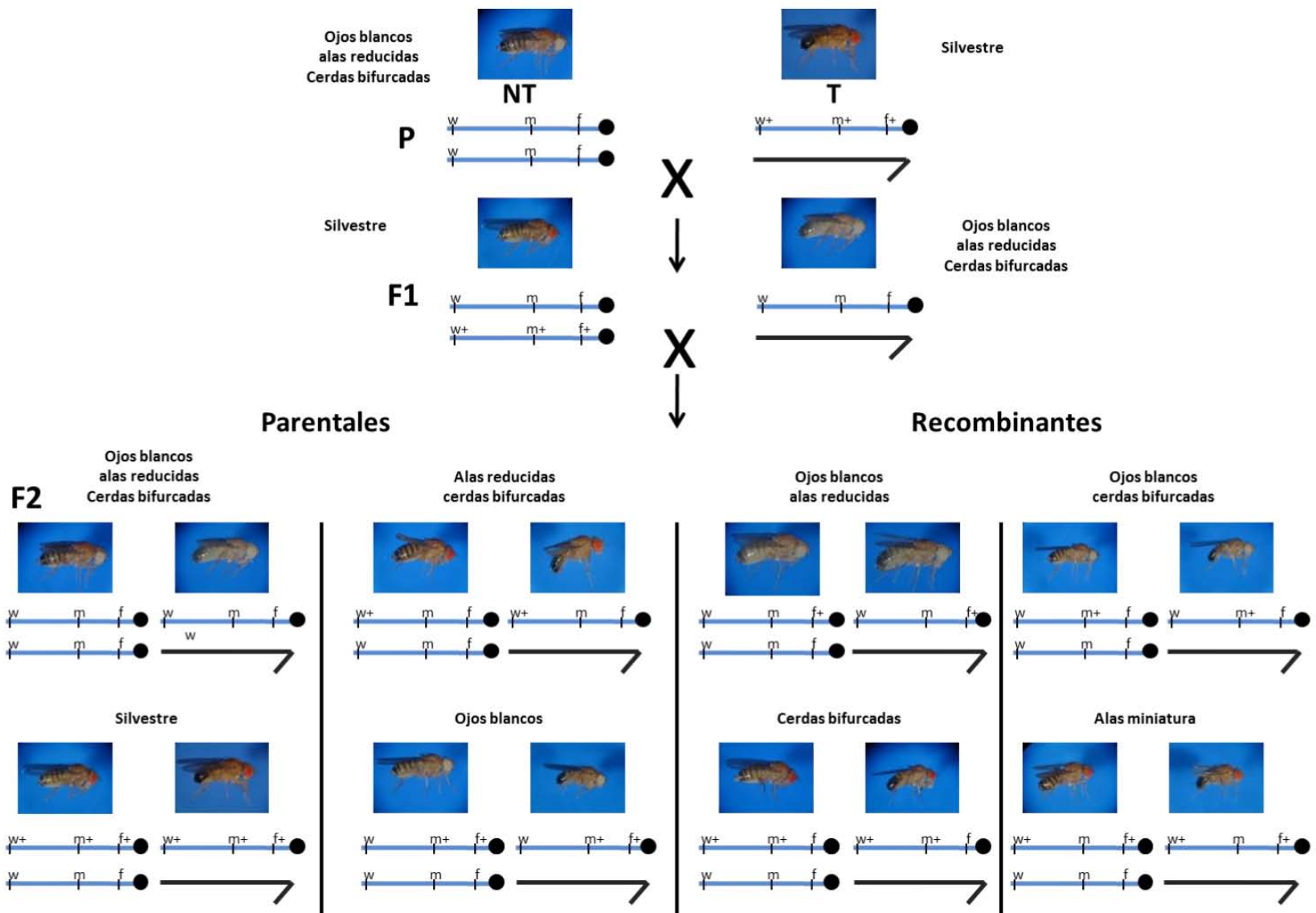


Figura 2.6 Sistema de cruza para el mapeo de tres genes (white-miniature-forked), en la F₂ se muestra las categorías fenotípicas obtenidas.

Sistemas de cruzas

Región de cromosoma

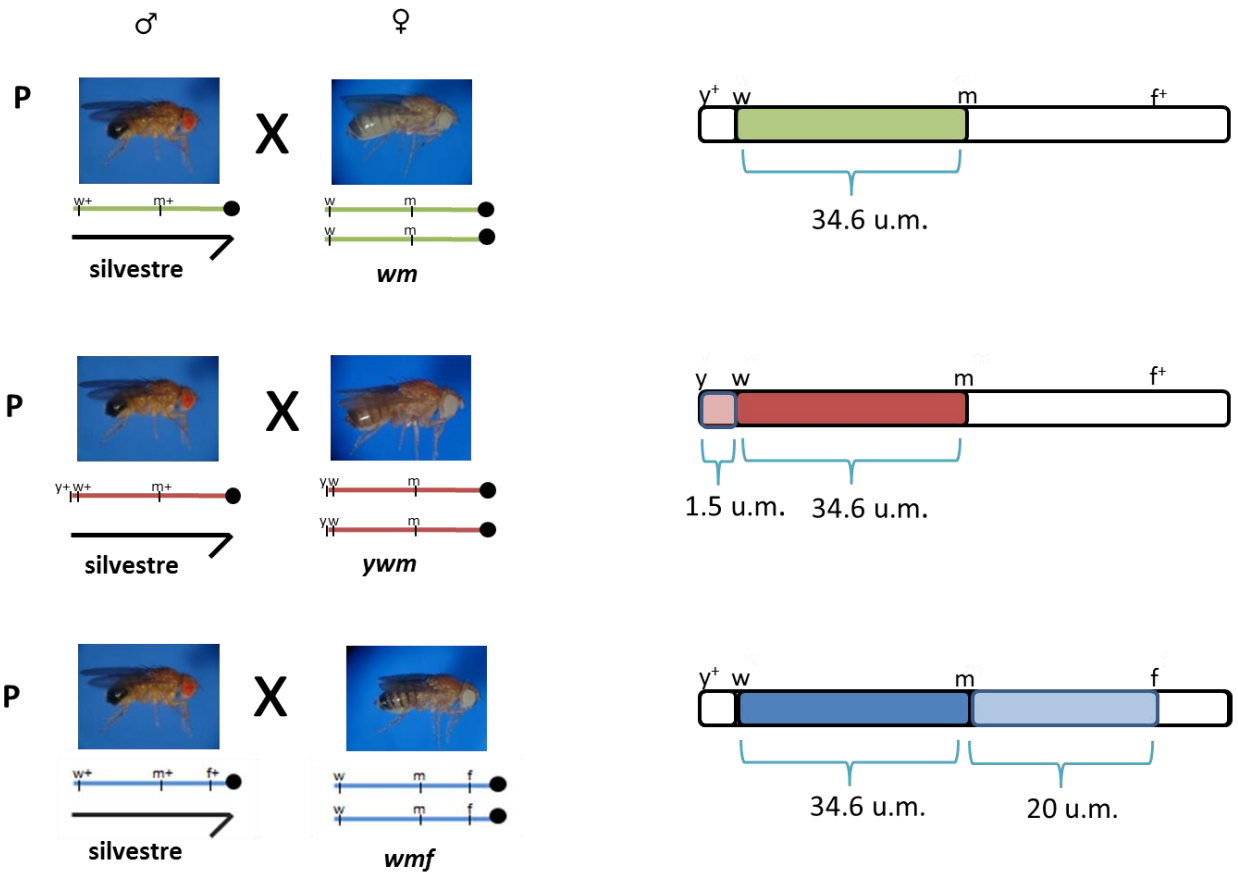


Figura 2.7 Sistemas de cruzas utilizadas para el mapeo genético y la región del cromosoma X analizada en cada caso.

2.3 Análisis de resultados: efecto de la NaN_3 en los organismos expuestos y en su progenie.

2.3.1 Efecto tóxico: Índice de sobrevivencia (IS) y Proporción sexual (PS)

El índice de sobrevivencia (IS) permite la evaluación del daño a las moscas expuestas a NaN_3 en función del número de organismos adultos recuperados del tratamiento durante su estadio larvario.

Para obtener el índice de sobrevivencia se obtuvo el cociente del total de los organismos recobrados para cada concentración de cada serie entre el número de organismos recobrados en el testigo de cada serie (Arellano, 2002):

$$\text{Índice de sobrevivencia} = \frac{\text{\# total de moscas recobradas por [X] NaN}_3}{\text{\# total de moscas testigo}}$$

Para determinar si hubo un efecto del tratamiento en el número de machos y hembras recobradas se calculó la proporción sexual dividiendo el total de machos o hembras recobrados entre el número total de machos y hembras recobrados para cada [X] NaN_3 y el testigo de cada serie:

$$\text{Proporción sexual} = \frac{\text{\# de machos o hembras recobradas por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}{\text{\# total de moscas recobradas por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}$$

Posteriormente se obtuvo el promedio del IS y PS para el testigo y cada [x] de NaN_3 .

Para determinar diferencias significativas en el IS y PS para cada [x] de NaN_3 y el testigo se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para cada uno, y una prueba de Tukey cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

2.3.2 Efecto reprotóxico: Fertilidad (F), Promedio de la progenie por macho (PPM) y Proporción sexual de la progenie (PS).

La fertilidad evalúa el posible daño en la capacidad reproductora de los machos expuestos a NaN_3 . Para cada sistema de cruza progenitora del mapeo de dos y tres puntos se obtuvo la

progenie F₁, a partir de la cual se calculó la fertilidad dividiendo el número total de machos que produjeron progenie entre el total de machos que se cruzaron para cada [X] NaN₃ y el testigo de cada sistema de cruce :

$$\text{Fertilidad} = \frac{\text{\# de machos con progenie por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}{\text{\# total de machos cruzados por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}$$

Para determinar diferencias significativas, se realizó un prueba de Z para proporciones comparando la proporción de machos fértiles cada [x] de NaN₃ con la proporción de machos fértiles del testigo.

El promedio de la progenie por macho (PPM) evaluó si se modificó la cantidad de la progenie de los machos expuestos a NaN₃. La PPM se obtuvo dividiendo el número total de progenie entre el número total de machos que tuvieron hijos. Se calculó para cada [X] de NaN₃ y el testigo por repetición de cada sistema de cruce:

$$\text{Promedio de la progenie por macho} = \frac{\text{\# de machos con progenie por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}{\text{\# total de machos cruzados por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}$$

Posteriormente se obtuvo el promedio del PPM de las tres repeticiones que se hicieron para cada sistema de cruce. Para determinar diferencias significativas en la PPM en las [x] de NaN₃ y el testigo se realizó una ANOVA de una vía por sistema de cruce y una prueba de Tukey cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

Para determinar cuántas hembras y machos se obtuvieron en la progenie de machos silvestres tratados y hembras no tratadas se calculó la proporción sexual como se indicó.

2.3.3 Efecto transgeneracional: Fertilidad y Fecundidad de la progenie.

La progenie obtenida en la F₂ se utilizó para evaluar si la capacidad reproductora de la progenie F₁(no tratada) producida por los machos tratados disminuyó y se calculó la fertilidad de la misma manera que se presentó en el punto 3.5.2., solo que ahora de la progenie de los machos tratados con NaN₃ y hembras no tratadas.

La Fecundidad (Fe) refleja el número de moscas producidas por cada hembra de la F₁ no tratada, y se obtiene dividiendo el número total de progenie entre el número total de hembras, esto se hace para cada [X] de NaN₃ y para el testigo:

$$\text{Fecundidad} = \frac{\text{\# total de progenie por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}{\text{\# total de hembras cruzadas por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}$$

Con este parámetro se evaluó el número de hijos que tuvo la progenie de los machos tratados con NaN₃ y hembras no tratadas.

Se obtuvo el promedio de la Fe de las tres repeticiones que se hicieron para cada sistema de cruce. Para determinar diferencias significativas en la Fe en las [x] de NaN₃ y el testigo se realizó una ANOVA de una vía por sistema de cruce y una prueba de Tukey cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

Se determinó el número de hembras y machos de los hijos de la progenie de machos silvestres tratados y hembras no tratadas, y se calculó la proporción sexual de la manera que se señaló en el apartado 3.5.1.

2.4 Determinación y análisis de las frecuencias de recombinación.

2.4.1 Mapeo de dos genes.

Para la cruce de mapeo de dos genes se utilizaron hembras heterocigotas y machos hemicingotas para los genes *w-m*, en la progenie se obtuvieron cuatro categorías fenotípicas, dos con fenotipos parentales y dos con fenotipos recombinantes.

La frecuencia de recombinación (FR) entre el gen *w* y *m*, se estimó como propuso Sturtevant (1913) a partir del número total de moscas con fenotipo recombinante entre el total de moscas obtenidas en la F₂ para cada [X] de NaN₃ y para el testigo de cada repetición:

$$\text{Frecuencia de recombinación entre } w-m = \frac{\text{\# de moscas recombinantes en la F}_2 \text{ por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}{\text{\# total de moscas de la F}_2 \text{ por [X] NaN}_3 \text{ o en el testigo}}$$

Para evaluar si las frecuencias de recombinación entre los genes $w-m$ fueron modificadas por la exposición de los machos silvestres progenitores a NaN_3 se usó el número de moscas recombinantes totales del testigo y de cada [x] de NaN_3 para calcular la FR. Las diferencias significativas, se obtuvieron mediante una prueba de Z para proporciones comparando la frecuencia de recombinación de cada [x] de NaN_3 con la frecuencia de recombinación del testigo.

2.4.21 Mapeo de tres genes

Para la cruce de mapeo de tres genes se utilizaron hembras heterocigotas y machos hemicigotos para los tres genes ($y-w-m$ o $w-m-f$), en la progenie se obtuvieron ocho categorías fenotípicas para cada sistema de cruce: dos con fenotipos parentales y cuatro con fenotipos recombinantes simples y dos con fenotipos de dobles recombinantes.

Para el sistema de cruce con la cepa ywm , la frecuencia de recombinación entre el gen $y-w$, y entre los genes $w-m$ se estimó como propuso Sturtevant (1913) para el mapeo de tres genes a partir del número de recombinantes simples más los dobles recombinantes entre el total de moscas obtenidas en la F_2 para cada [X] NaN_3 y para el testigo:

$$\text{Frecuencia de recombinación entre } w-m = \frac{\text{\# de moscas recombinantes } w-m \text{ más los dobles recombinantes}}{\text{\# total de moscas de la } F_2}$$

$$\text{Frecuencia de recombinación entre } y-w = \frac{\text{\# de moscas recombinantes } m-f \text{ más los dobles recombinantes}}{\text{\# total de moscas de la } F_2}$$

De la misma manera se obtuvieron las FR entre los genes $w-m$ y $m-f$ para el sistema de cruce con la cepa wmf :

$$\text{Frecuencia de recombinación entre } w-m = \frac{\text{\# de moscas recombinantes } w-m \text{ más los dobles recombinantes}}{\text{\# total de moscas de la } F_2}$$

$$\text{Frecuencia de recombinación entre } m-f = \frac{\text{\# de moscas recombinantes } m-f \text{ más los dobles recombinantes}}{\text{\# total de moscas de la } F_2}$$

$$\text{Frecuencia de dobles recombinante .} = \frac{\text{\# de moscas dobles recombinantes en la } F_2}{\text{\# total de moscas de la } F_2}$$

Para evaluar si las frecuencias de recombinación entre los genes involucrados en cada sistema de cruce de tres genes fueron modificadas por la exposición de los machos silvestres progenitores a NaN_3 se utilizó el número de moscas recombinantes totales del testigo y de cada [x] de NaN_3 se determinó la FR total del testigo y para cada [x] de NaN_3 . Para determinar diferencias significativas, se realizó un prueba de Z para proporciones comparando la frecuencia de recombinación de cada [x] de NaN_3 con la frecuencia de recombinación del testigo.

2.5 Tipo y proporción de fenotipos obtenidos en la F_2

Para cada sistema de cruce se calculó la proporción de recombinantes respecto a los parentales (R/P), permitiendo estimar si el número de recombinante fue menor, mayor o igual que el número de parentales en la F_2 de cada concentración respecto al testigo. Posteriormente se evaluó si todos los recombinantes contribuyeron en la misma intensidad calculando la proporción de fenotipos de tipo recombinantes (recombinantes sencillos región I y región dos y dobles recombinantes para los sistemas de mapeo de tres genes). Las diferencias significativas se obtuvieron mediante una prueba de Z para proporciones entre las [x] de NaN_3 y el testigo.

Para evaluar la distribución del número de categorías fenotípicas por familia se modificó con las diferentes concentraciones de NaN_3 se utilizó una prueba de X^2 de independencia.

III. RESULTADOS

Para un mejor análisis de los resultados, este trabajo se dividió en tres etapas. En la primera se evaluó el efecto de la NaN_3 en los organismos expuestos. La segunda consistió en analizar el efecto de la NaN_3 en la progenie de los organismos expuestos. Finalmente en la última se evaluó el efecto de la NaN_3 en la recombinación de células germinales y su impacto en las proporciones fenotípicas.

3.1 Efecto de la NaN_3 en los organismos expuestos.

3.1.1 Efecto tóxico de la NaN_3 .

Los organismos pueden presentar respuestas tóxicas e incluso la muerte ante la exposición a un compuesto determinado. Para evaluar si existe un efecto tóxico en moscas silvestres expuestas a diferentes concentraciones de NaN_3 se calculó el Índice de sobrevivencia (IS). A partir de éste se determinó que la NaN_3 tiene un efecto tóxico en las concentraciones mayores a 0.125 mM (Fig. 3.1a) ya que se encontraron diferencias significativas en el IS de las moscas tratadas con NaN_3 ($F_{9,146}=3.049$; $p<0.05$).

Tabla I. Índice de sobrevivencia y Proporción sexual de moscas silvestres tratadas con NaN_3 .

[NaN_3]	N	IS	±	ee	α	PS h	±	ee	α	PS m	±	ee	α
testigo	1394	1.00	±	0.00		0.50	±	0.019		0.50	±	0.019	
1.13E-13	845	0.85	±	0.07	-	0.48	±	0.017	-	0.52	±	0.017	-
1.82E-12	1114	0.80	±	0.03	-	0.49	±	0.013	-	0.51	±	0.013	-
1.46E-11	1280	0.94	±	0.06	-	0.47	±	0.026	-	0.53	±	0.026	-
1.86E-09	1218	0.88	±	0.05	-	0.49	±	0.016	-	0.51	±	0.016	-
2.38E-07	1243	0.91	±	0.05	-	0.48	±	0.020	-	0.52	±	0.020	-
3.81E-06	1124	0.83	±	0.06	-	0.49	±	0.017	-	0.51	±	0.017	-
3.05E-05	1156	0.84	±	0.05	-	0.48	±	0.019	-	0.52	±	0.019	-
4.88E-04	1261	0.92	±	0.05	-	0.47	±	0.014	-	0.53	±	0.014	-
1.25E-01	933	0.67	±	0.07	*	0.47	±	0.029	-	0.53	±	0.029	-
3.60E+00	0	0.00											

N, número de moscas; IS, índice de sobrevivencia; PS h, proporción sexual de hembras; PS m, proporción sexual de machos; ee, error estándar; α, prueba de ANOVA. Para cada [x] n=16, para la [1.13E-13] n=12. El * indica diferencias significativas $p<0.05$.

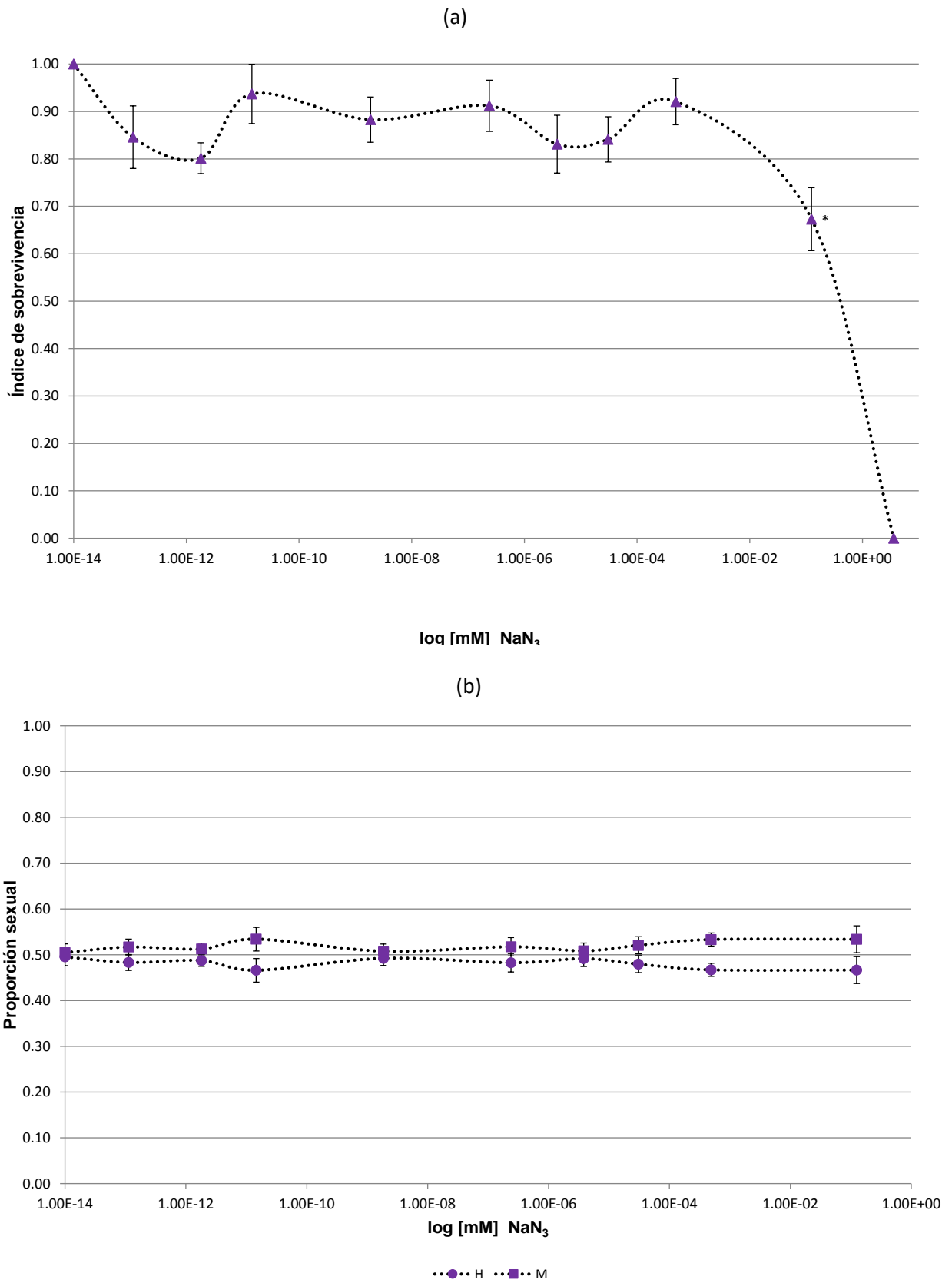


Figura 3.1. a) Promedio del Índice de sobrevivencia de moscas silvestres tratadas con NaN_3 . b) Promedio de la Proporción sexual de moscas silvestres tratadas con NaN_3 . El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

Las diferencias encontradas fueron entre la concentración 0.125 mM y el testigo (Tukey; $p < 0.05$). En la concentración 3.6 mM no se recobraron moscas por lo que para esta concentración no se continuó con el protocolo (Tabla I).

De las moscas que sobrevivieron al tratamiento con [x] de NaN_3 se recobraron en la misma proporción hembras y machos que en el testigo ($F_{9,146} = 0.9706$; $p > 0.05$). Es decir, el tratamiento no afectó específicamente a un sexo (Fig. 3.1b).

3.1.2 Efecto reprotóxico de la NaN_3 .

Para analizar si la NaN_3 afectó la capacidad de tener hijos de los machos expuestos, éstos fueron cruzados con hembras no tratadas (*wm*, *ywm*, o *wmf*). La fertilidad de los machos silvestres cruzados con hembras no tratadas *wm* presentó una tendencia a ser menor en todas las concentraciones que en el testigo (Fig. 3.2 a) pero sólo las concentraciones 1.46E-11, 2.38E-07 y 4.88E-04mM presentaron diferencias significativas respecto al testigo ($Z_{0.05} = 1.96$; $p < 0.05$). La fertilidad de los machos silvestres cruzados con hembras no tratadas *ywm* o *wmf* no mostró diferencias significativas respecto al testigo en ninguna concentración ($Z_{0.05} = 1.96$; $p > 0.05$) por lo tanto para estos dos sistemas de cruza, la fertilidad de los machos silvestres no se afectó por la exposición a NaN_3 (Fig. 3.2 b y c).

Para cada una de las cruza anteriores se obtuvo el promedio de la progenie de los machos silvestres tratados con NaN_3 , en los machos que se cruzaron con hembras *wm* se presentó una tendencia a ser más numerosa en las concentraciones que en el testigo (Fig. 3.3 a) pero no presentó diferencias significativas ninguna concentración respecto al testigo ($F_{9,234} = 1.93$; $p < 0.05$; Tukey; $p < 0.05$). Para los sistemas de cruce *ywm* y *wmf* tampoco se afectó la cantidad de progenie producida por los machos silvestres tratados con NaN_3 (Fig. 3.3 b y c) (*ywm*: $F_{9,216} = 0.9684$; $p > 0.05$; *wmf*: $F_{9,237} = 2.03$; $p > 0.05$).

La proporción sexual de la progenie de los machos tratados con NaN_3 y hembras no tratadas no presentó diferencias significativas en ningún sistema de cruce (*wm*: $F_{9,234} = 1.46$; $p > 0.05$; *ywm*: $F_{9,216} = 0.7774$; $p > 0.05$; *wmf*: $F_{9,237} = 0.7416$; $p > 0.05$) (Tabla II).

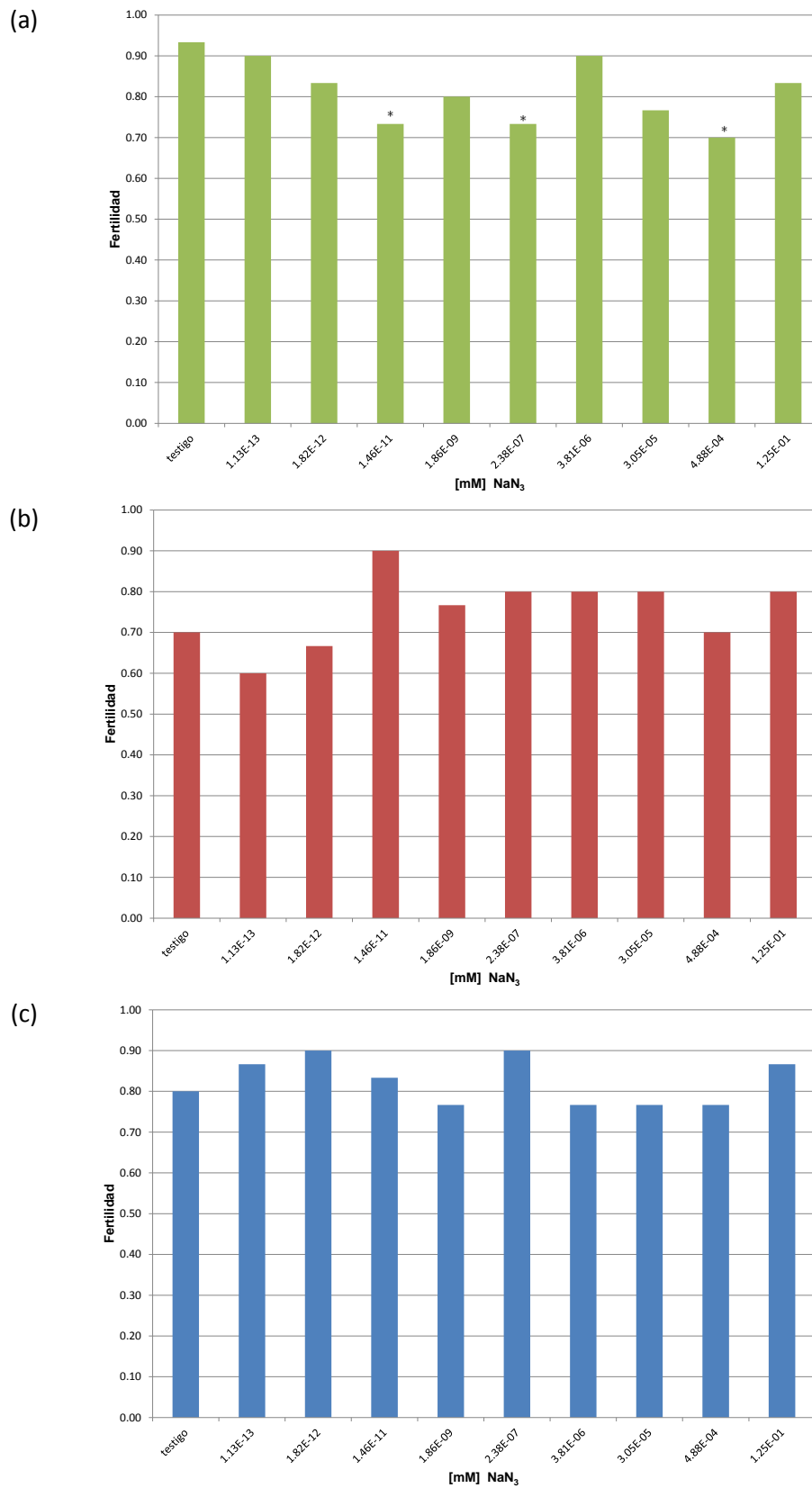


Figura 3.2 Fertilidad de machos CS tratados con NaN_3 cruzados con hembras no tratadas. a) *wmf* b) *ywm* y c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

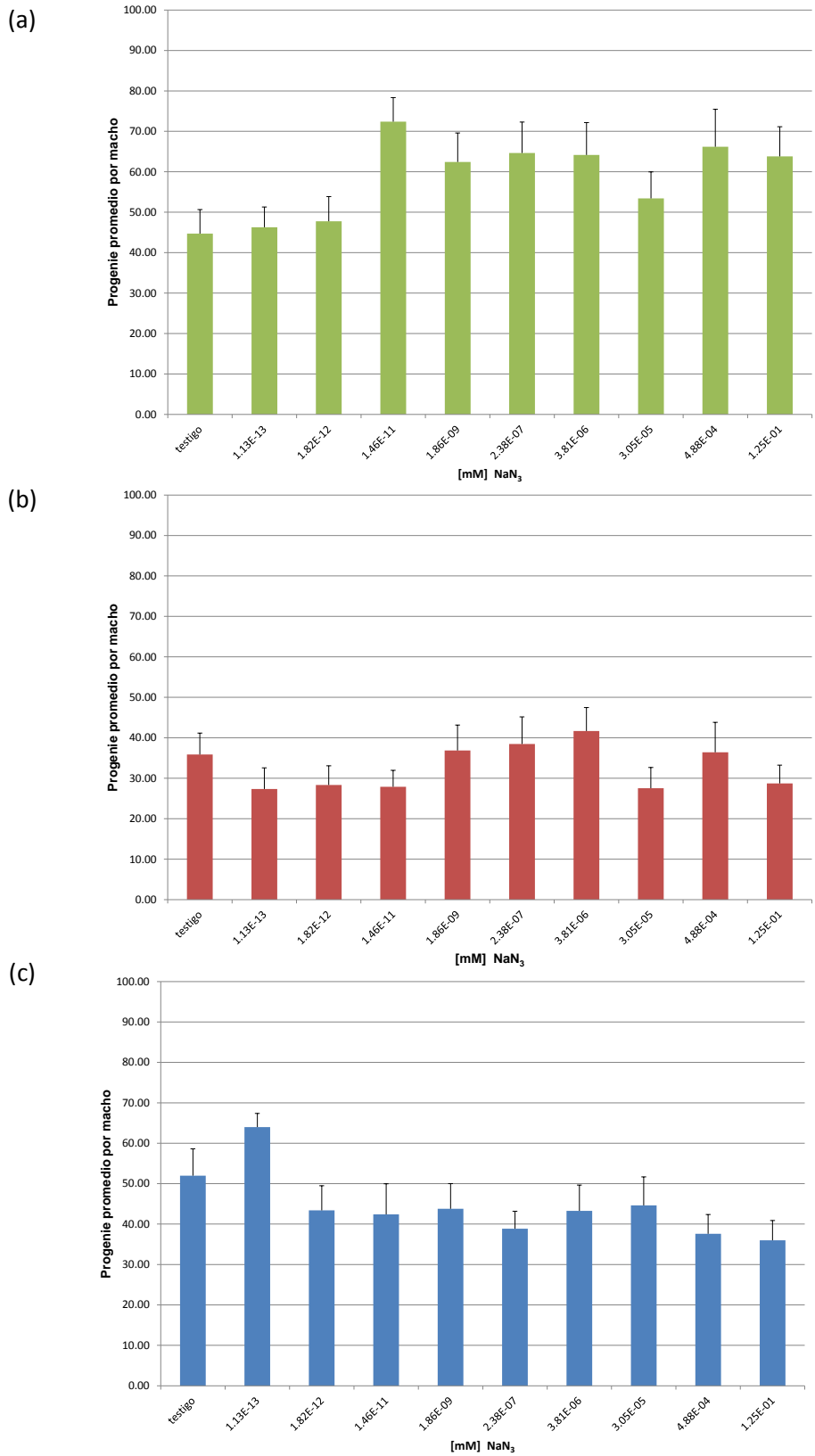


Figura 3.3 Progenie promedio de machos CS tratados con NaN_3 cruzados con hembras no tratadas: a) *wm* b) *ywm* c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

Tabla II. Fertilidad y Progenie obtenida de cruzas de hembras *wm*, *wmf* y *ywm* X machos silvestres tratados con NaN_3

[NaN_3]	n	F	± ee	Progenie						
				β	Total	PPM ± ee	α	PS h ± ee	α PS m ± ee	α
a) hembras <i>wm</i>										
testigo	30	0.93	± 0.046		1252	44.71 ± 5.93		0.53 ± 0.029	0.47 ± 0.03	
1.13E-13	30	0.90	± 0.055	-	1250	46.30 ± 5.01	-	0.53 ± 0.025	0.47 ± 0.03	-
1.82E-12	30	0.83	± 0.068	-	1194	47.76 ± 6.10	-	0.54 ± 0.025	0.46 ± 0.02	-
1.46E-11	30	0.73	± 0.081	*	1593	72.41 ± 5.95	-	0.53 ± 0.019	0.47 ± 0.02	-
1.86E-09	30	0.80	± 0.073	-	1498	62.42 ± 7.19	-	0.52 ± 0.018	0.48 ± 0.02	-
2.38E-07	30	0.73	± 0.081	*	1422	64.64 ± 7.68	-	0.53 ± 0.018	0.47 ± 0.02	-
3.81E-06	30	0.90	± 0.055	-	1732	64.15 ± 8.04	-	0.51 ± 0.012	0.49 ± 0.01	-
3.05E-05	30	0.77	± 0.077	-	1229	53.43 ± 6.53	-	0.48 ± 0.022	0.52 ± 0.02	-
4.88E-04	30	0.70	± 0.084	*	1390	66.19 ± 9.27	-	0.44 ± 0.035	0.56 ± 0.04	-
1.25E-01	30	0.83	± 0.068	-	1595	63.80 ± 7.35	-	0.52 ± 0.029	0.48 ± 0.03	-
b) hembras <i>ywm</i>										
testigo	30	0.70	± 0.084		753	35.86 ± 5.29		0.56 ± 0.03	0.44 ± 0.03	
1.13E-13	30	0.60	± 0.089	-	492	27.33 ± 5.24	-	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.03	-
1.82E-12	30	0.67	± 0.086	-	567	28.35 ± 4.74	-	0.55 ± 0.04	0.45 ± 0.04	-
1.46E-11	30	0.90	± 0.055	-	753	27.89 ± 4.07	-	0.53 ± 0.03	0.47 ± 0.03	-
1.86E-09	30	0.77	± 0.077	-	848	36.87 ± 6.27	-	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.03	-
2.38E-07	30	0.80	± 0.073	-	923	38.46 ± 6.70	-	0.55 ± 0.04	0.45 ± 0.04	-
3.81E-06	30	0.80	± 0.073	-	1000	41.67 ± 5.81	-	0.54 ± 0.02	0.46 ± 0.02	-
3.05E-05	30	0.80	± 0.073	-	661	27.54 ± 5.12	-	0.58 ± 0.03	0.42 ± 0.03	-
4.88E-04	30	0.70	± 0.084	-	765	36.43 ± 7.39	-	0.53 ± 0.04	0.47 ± 0.04	-
1.25E-01	30	0.80	± 0.073	-	689	28.71 ± 4.55	-	0.54 ± 0.04	0.46 ± 0.04	-
c) hembras <i>wmf</i>										
testigo	30	0.80	± 0.073		1247	51.96 ± 6.64		0.57 ± 0.03	0.43 ± 0.03	
1.13E-13	30	0.87	± 0.062	-	1664	64.00 ± 3.39	-	0.53 ± 0.01	0.47 ± 0.01	-
1.82E-12	30	0.90	± 0.055	-	1172	43.41 ± 6.07	-	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.02	-
1.46E-11	30	0.83	± 0.068	-	1060	42.40 ± 7.57	-	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.02	-
1.86E-09	30	0.77	± 0.077	-	1007	43.78 ± 6.21	-	0.55 ± 0.02	0.45 ± 0.02	-
2.38E-07	30	0.90	± 0.055	-	1049	38.85 ± 4.33	-	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.03	-
3.81E-06	30	0.77	± 0.077	-	995	43.26 ± 6.38	-	0.53 ± 0.03	0.47 ± 0.03	-
3.05E-05	30	0.77	± 0.077	-	1026	44.61 ± 7.09	-	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.02	-
4.88E-04	30	0.77	± 0.077	-	865	37.61 ± 4.77	-	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.02	-
1.25E-01	30	0.87	± 0.062	-	936	36.00 ± 4.88	-	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	-

n, Número de cruzas; F, Fertilidad; PPM, progenie promedio por macho; PS h, Proporción sexual de hembras; PS m, Proporción sexual de machos; ee, error estándar; α, prueba de ANOVA; β, prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

3.2 Efecto transgeneracional de la NaN₃.

La progenie de los machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas (*wm*, *ywm*, y *wmf*;) se cruzó para evaluar la capacidad de tener hijos, es decir, su Fertilidad y el número de hijos que tuvieron por hembra, Fecundidad.

La fertilidad de la progenie de machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *wm* no presentó diferencias significativas ($Z_{0.05}=1.96$; $p>0.05$) (Fig. 3.4 a). En el caso de la progenie de las cruza de machos tratados con NaN₃ y hembras no tratadas (*ywm* o *wmf*) se recobraron diferencias significativas en la concentración 1.46E-11 ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.4 b y c).

La fecundidad de la progenie de machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *wm*, a excepción de las dos concentraciones más bajas de NaN₃, presentaron mayor fecundidad que el testigo (Fig. 3.5 a) ($F_{9, 714}=16.18$; $p<0.05$; Tukey; $p<0.05$). En el caso de la progenie de machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *ywm* no se encontraron diferencias significativas en ninguna concentración respecto a su testigo ($F_{9,613}=5.282$; $p<0.05$; Tukey; $p<0.05$) (Fig. 3.5 b). La fecundidad de la progenie de machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *wmf* presentaron diferencias significativas ($F_{9,658}=7.959$; $p<0.05$) en las dos concentraciones más bajas (Tukey; $p<0.05$) teniendo menor número de progenie que el testigo (Fig. 3.5 c).

La fecundidad incrementó en los hijos de la progenie de machos expuestos a NaN₃ y hembras no expuestas *wm* mientras que disminuyó en los hijos de la progenie de machos expuestos a NaN₃ y hembras no expuestas *wmf* (Tabla III).

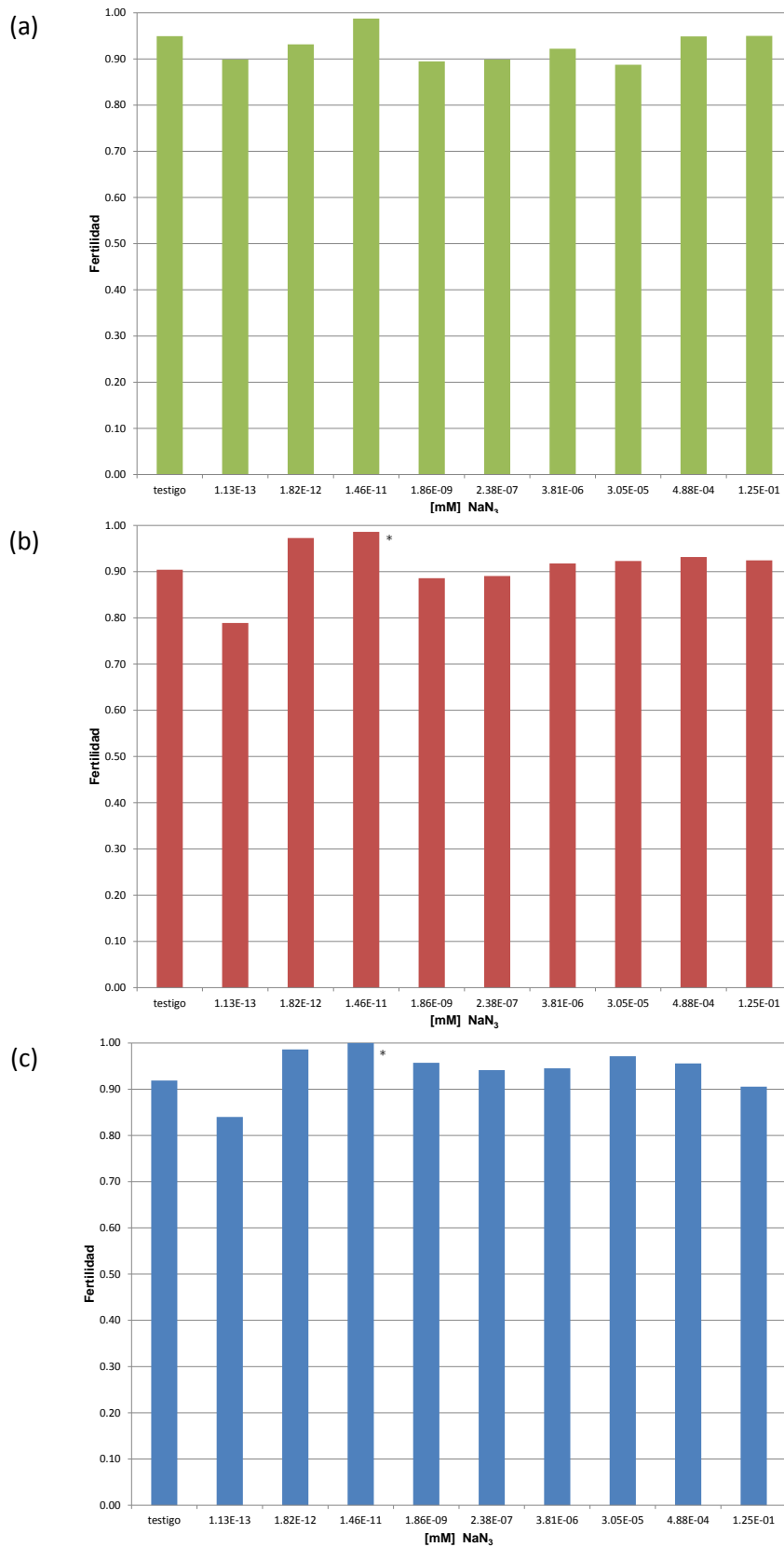


Figura 3.4 Fertilidad de la progenie de machos tratados con NaNO_3 y hembras no tratadas: a) *wm* b) *ywm* y c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

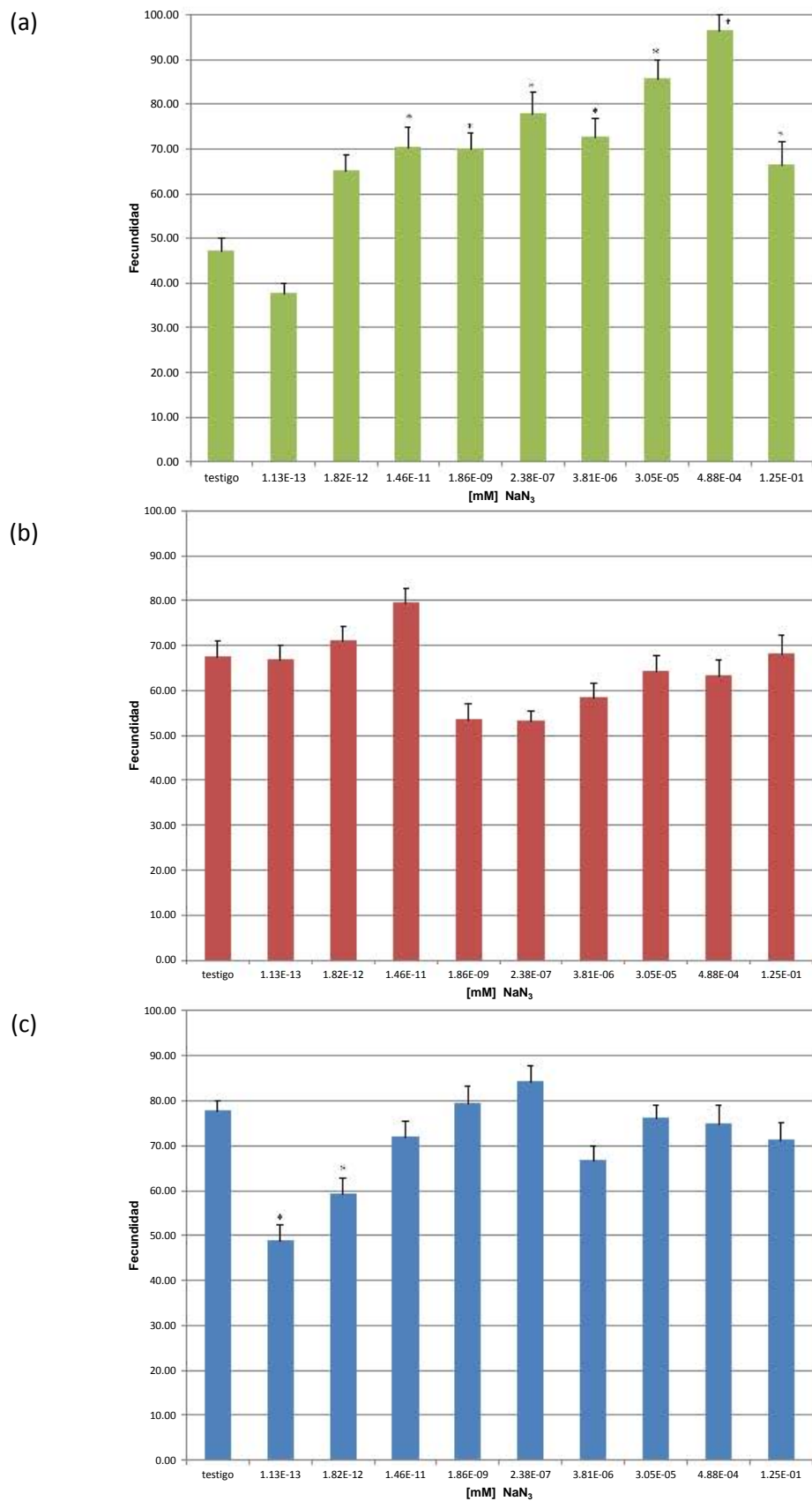


Figura 3.5 Fecundidad de la progenie de machos tratados con NaN_3 y hembras no tratadas a) *wm* b) *ywm* y c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo

Tabla III. Fertilidad y Fecundidad de la Progenie de cruzas de hembras *wm*, *ywm* y *ywm* X machos silvestres tratados con NaN_3 .

[NaN_3]	n	Progenie									
		F \pm ee	β	Total	Fe \pm ee	α	PS h \pm ee	α	PS m \pm ee	α	
a) hembras <i>wm</i>											
testigo	79	0.95 \pm 0.02		3540	47.20 \pm 2.96		0.51 \pm 0.01		0.49 \pm 0.01		
1.13E-13	79	0.90 \pm 0.03	-	2667	37.56 \pm 2.23	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-	
1.82E-12	73	0.93 \pm 0.03	-	4425	65.07 \pm 3.59	-	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
1.46E-11	80	0.99 \pm 0.01	-	5556	70.33 \pm 4.69	*	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
1.86E-09	76	0.89 \pm 0.04	-	4750	69.85 \pm 3.65	*	0.50 \pm 0.01	-	0.50 \pm 0.01	-	
2.38E-07	79	0.90 \pm 0.03	-	5524	77.80 \pm 5.03	*	0.49 \pm 0.01	-	0.51 \pm 0.01	-	
3.81E-06	77	0.92 \pm 0.03	-	5151	72.55 \pm 4.15	*	0.50 \pm 0.01	-	0.50 \pm 0.01	-	
3.05E-05	80	0.89 \pm 0.04	-	6076	85.58 \pm 4.45	*	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
4.88E-04	78	0.95 \pm 0.02	-	7127	96.31 \pm 3.73	*	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
1.25E-01	80	0.95 \pm 0.02	-	5056	66.53 \pm 5.08	*	0.50 \pm 0.01	-	0.50 \pm 0.01	-	
b) hembras <i>ywm</i>											
testigo	73	0.90		4463	67.62 \pm 3.46		0.50 \pm 0.01		0.50 \pm 0.01		
1.13E-13	71	0.79	-	3743	66.84 \pm 3.31	-	0.50 \pm 0.01	-	0.50 \pm 0.01	-	
1.82E-12	73	0.97	-	5034	70.90 \pm 3.52	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-	
1.46E-11	72	0.99	*	5646	79.52 \pm 3.37	-	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
1.86E-09	70	0.89	-	3320	53.55 \pm 3.49	-	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
2.38E-07	73	0.89	-	3446	53.02 \pm 2.49	-	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
3.81E-06	73	0.92	-	3914	58.42 \pm 3.31	-	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
3.05E-05	65	0.92	-	3854	64.23 \pm 3.63	-	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
4.88E-04	73	0.93	-	4307	63.34 \pm 3.48	-	0.56 \pm 0.02	-	0.44 \pm 0.02	-	
1.25E-01	66	0.92	-	4164	68.26 \pm 3.97	-	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
c) hembras <i>wmf</i>											
testigo	74	0.92		5281	77.66 \pm 2.19		0.51 \pm 0.01		0.49 \pm 0.01		
1.13E-13	75	0.84	-	2836	48.90 \pm 3.31	*	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
1.82E-12	72	0.99	-	4210	59.30 \pm 3.47	*	0.51 \pm 0.01	-	0.49 \pm 0.01	-	
1.46E-11	71	1.00	*	5112	72.00 \pm 3.50	-	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
1.86E-09	70	0.96	-	5312	79.28 \pm 3.90	-	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
2.38E-07	68	0.94	-	5379	84.05 \pm 3.57	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-	
3.81E-06	73	0.95	-	4601	66.68 \pm 3.15	-	0.52 \pm 0.01	-	0.48 \pm 0.01	-	
3.05E-05	70	0.97	-	5174	76.09 \pm 2.97	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-	
4.88E-04	68	0.96	-	4866	74.86 \pm 4.10	-	0.54 \pm 0.01	-	0.46 \pm 0.01	-	
1.25E-01	74	0.91	-	4760	71.04 \pm 3.96	-	0.53 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-	

n, Número de cruzas; F, Fertilidad; Fe, Fecundidad; PS h, Proporción sexual de hembras; PS m, Proporción sexual de machos; ee, error estándar; α , prueba de ANOVA; β , prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

3.3 Efecto de la NaN₃ en las frecuencias de recombinación

A partir de los hijos de la cruce de mapeo genético se obtuvieron las frecuencias de recombinación entre los genes involucrados para cada sistema de cruce, las cuales fueron analizadas mediante una prueba de Z para proporciones.

3.3.1 Frecuencia de recombinación entre los genes: *w-m*

En la Tabla IV se muestra los resultados obtenidos para la frecuencia de recombinación entre los genes *w-m* de cada sistema de cruce (*wm*, *ywm* y *wmf*).

La frecuencia de recombinación entre los genes *w-m* obtenida a partir de la F₂ de los machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *wm* presentó diferencias significativas en todas las concentraciones ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.6 a).

En el caso de la frecuencia de recombinación obtenida a partir de la F₂ de los machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *ywm* se encontraron diferencias significativas para las concentraciones 1.13E-13, 1.82E-12, 2.38E-07, 3.81E-06, 3.05E-05 4.88E-04, y 1.25E-01mM de NaN₃ ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.6 b).

La frecuencia de recombinación calculadas a partir de la F₂ de machos silvestres tratados con NaN₃ y cruzados con hembras *wmf*, sólo la concentración 3.81E-06mM de NaN₃ presentó diferencias significativas ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.6 c).

Tabla IV Frecuencias de recombinación entre los genes white- miniature

Teórico	0.346														
	a) cepa <i>wm</i>				b) cepa <i>ywm</i>				c) cepa <i>wmf</i>						
[NaN ₃]	N	Fr (<i>w-m</i>)	±	ee	β	N	Fr (<i>w-m</i>)	±	ee	β	N	Fr (<i>w-m</i>)	±	ee	β
testigo	3540	0.2797	±	0.0075		4463	0.2859	±	0.0068		5281	0.3312	±	0.0065	
1.13E-13	2667	0.3052	±	0.0089	*	3743	0.2567	±	0.0071	*	2836	0.3166	±	0.0087	-
1.82E-12	4425	0.3087	±	0.0069	*	5034	0.2495	±	0.0061	*	4210	0.3173	±	0.0072	-
1.46E-11	5556	0.3022	±	0.0062	*	5646	0.2708	±	0.0059	-	5112	0.3245	±	0.0065	-
1.86E-09	4750	0.3164	±	0.0067	*	3320	0.2877	±	0.0079	-	5312	0.3309	±	0.0065	-
2.38E-07	5524	0.3193	±	0.0063	*	3446	0.2385	±	0.0073	*	5379	0.3278	±	0.0064	-
3.81E-06	5151	0.3095	±	0.0064	*	3914	0.2624	±	0.0070	*	4601	0.3504	±	0.0070	*
3.05E-05	6076	0.3334	±	0.0060	*	3854	0.2558	±	0.0070	*	5174	0.3378	±	0.0066	-
4.88E-04	7127	0.3290	±	0.0056	*	4307	0.2528	±	0.0066	*	4866	0.3208	±	0.0067	-
1.25E-01	5056	0.3200	±	0.0066	*	4164	0.2534	±	0.0067	*	4758	0.3375	±	0.0069	-

N, número total de moscas; Fr (*w-m*), frecuencias de recombinación entre los genes white-miniature; ee, error estándar; β, prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$.

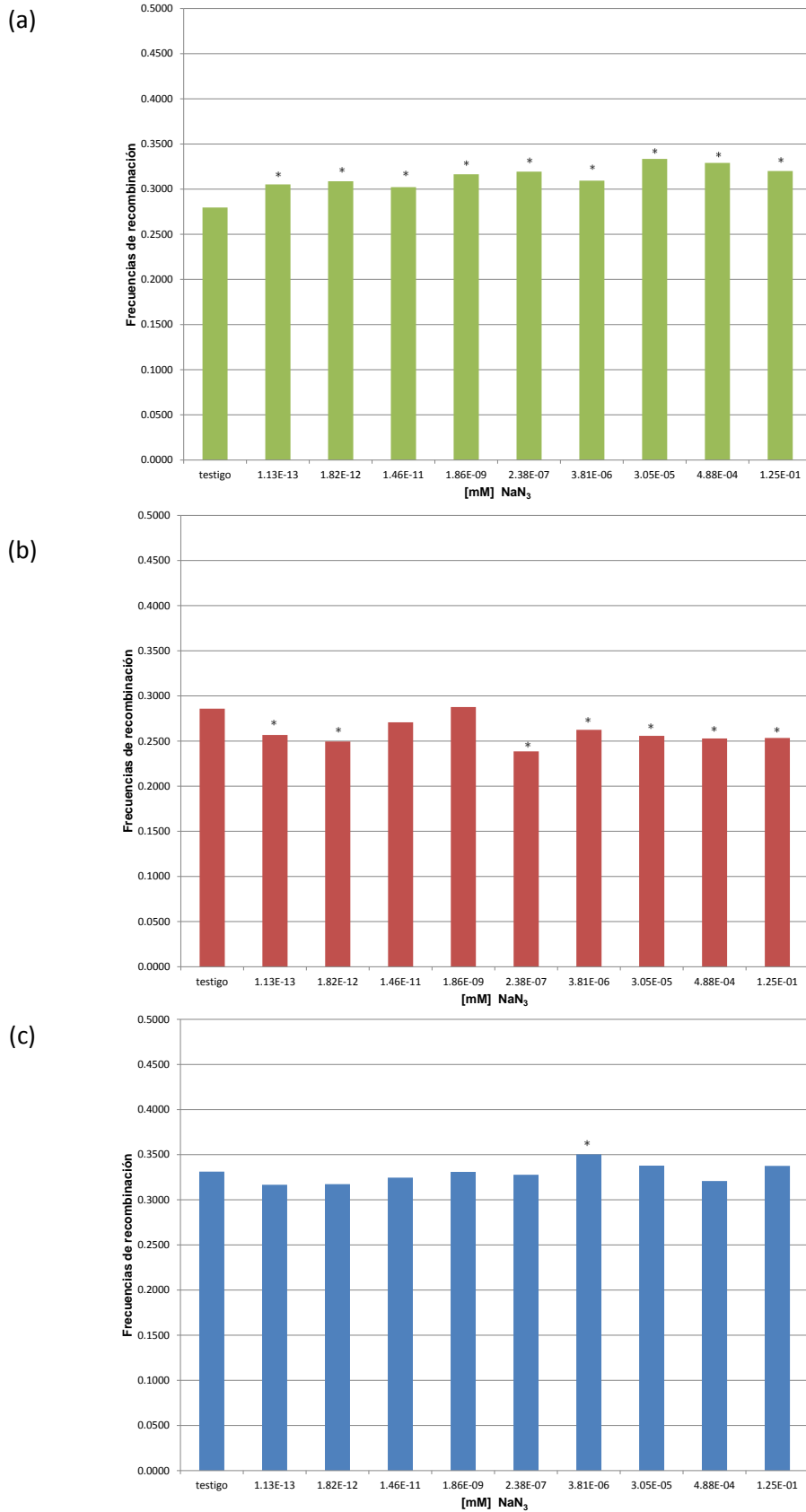


Figura 3.6 . Frecuencias de recombinación entre los genes *white-miniature* en función de la [mM] de NaN_3 para los tres sistemas: a) *wm* b) *ywm* y c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

3.3.2 Frecuencia de recombinación entre los genes: *y-w*

Las frecuencias de recombinación entre los genes *y-w* obtenida a partir de la F₂ de los machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *ywm* presentaron una tendencia a ser mayor que en el testigo (Fig. 3.7) pero solo hubo diferencias significativas en las concentraciones 3.81E-06 y 3.05E-05mM ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Tabla V).

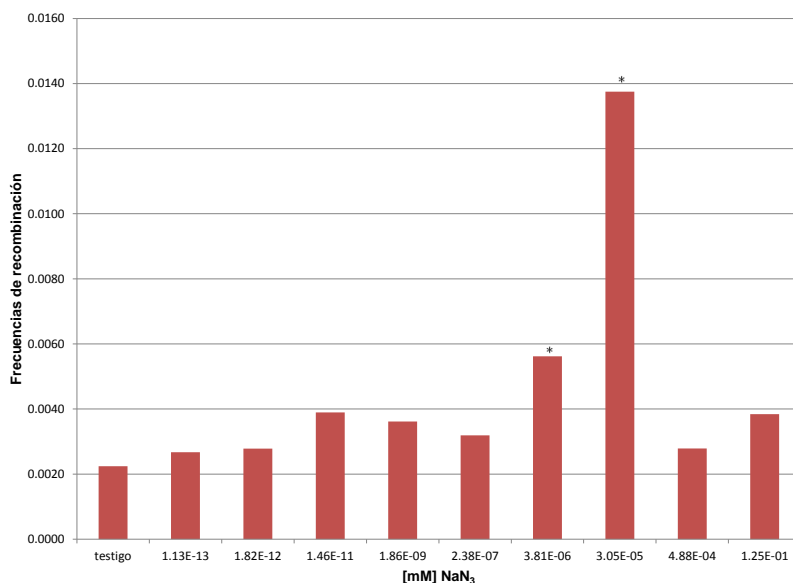


Figura 3.7. Frecuencias de recombinación entre los genes: *yellow-white* en función de la [mM] de NaN₃ para mapeo de tres genes (cepa *ywm*). El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

Tabla V Frecuencias de recombinación entre los genes *yellow-white*

[NaN3]	N	0.015		
		Fr (w-m)	±	ee
testigo	4463	0.0022	± 0.0007	
1.13E-13	3743	0.0027	± 0.0008	-
1.82E-12	5034	0.0028	± 0.0007	-
1.46E-11	5646	0.0039	± 0.0008	-
1.86E-09	3320	0.0036	± 0.0010	-
2.38E-07	3446	0.0032	± 0.0010	-
3.81E-06	3914	0.0056	± 0.0012	*
3.05E-05	3854	0.0138	± 0.0019	*
4.88E-04	4307	0.0028	± 0.0008	-
1.25E-01	4164	0.0038	± 0.0010	-

N, número total de moscas; Fr (*y-w*), frecuencias de recombinación entre los genes *yellow-white*; ee, error estándar; β, prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$

3.3.3 Frecuencia de recombinación entre los genes: *m-f*

Para las frecuencias de recombinación entre los genes *m-f* obtenida a partir de la F₂ de los machos silvestres tratados con NaN₃ y hembras no tratadas *wmf* presentaron una tendencia a ser mayor que en el testigo (Fig. 3.8) pero solo las concentraciones 1.13E-13, 1.82E-12, 1.46E-11, 1.86E-09, 2.38E-07, 3.81E-06 y 4.88E-04 mM de NaN₃ mostraron diferencias significativas respecto al testigo ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Tabla VI).

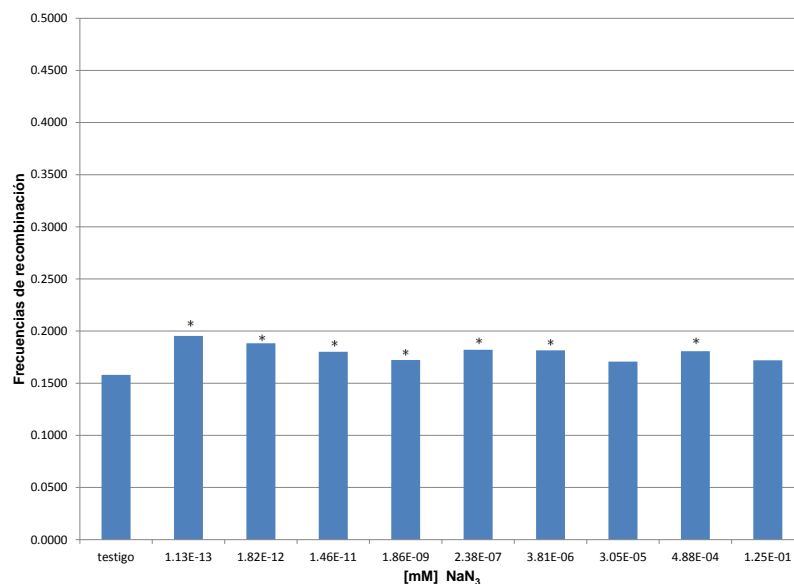


Figura 3.8. Frecuencias de recombinación entre los genes: *miniature-forked* en función de la [mM] de NaN₃ para mapeo de tres genes (cepa *wmf*). El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

Tabla VI Frecuencias de recombinación entre los genes *miniature-forked*

Teórico		0.022			
[NaN ₃]	N	Fr (w-m)	±	ee	β
testigo	5281	0.1579	±	0.0050	
1.13E-13	2836	0.1953	±	0.0074	-
1.82E-12	4210	0.1884	±	0.0060	-
1.46E-11	5112	0.1802	±	0.0054	-
1.86E-09	5312	0.1723	±	0.0052	-
2.38E-07	5379	0.1820	±	0.0053	-
3.81E-06	4601	0.1815	±	0.0057	*
3.05E-05	5174	0.1707	±	0.0052	*
4.88E-04	4866	0.1806	±	0.0055	-
1.25E-01	4758	0.1719	±	0.0055	-

N, número total de moscas; Fr (y-w), frecuencias de recombinación entre los genes yellow-white; ee, error estándar; β, prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas $p < 0.05$

3.4 Impacto de la NaN_3 en los fenotipos de la F_2

F_2 de machos silvestres tratados con NaN_3 y hembras no tratadas wm

La proporción de fenotipos recombinantes respecto a los fenotipos de tipo parental (R/P) fue mayor en todas las concentraciones de NaN_3 en comparación con el testigo ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.9a), es decir, se obtuvo una mayor proporción de organismos recombinantes y menor proporción de organismos de tipo parental en todas las concentraciones de NaN_3 en comparación con el testigo ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Tabla VII).

F_2 de machos silvestres tratados con NaN_3 y hembras no tratadas ywm

La proporción de fenotipos recombinantes respecto a los fenotipos de tipo parental fue menor en la mayoría las concentraciones de NaN_3 en comparación con el testigo excepto en la concentración $1.86\text{E}-09$ mM ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig. 3.9b). Ya que se recobraron mayor número de organismos parentales y menor número de organismos recombinantes. Sin embargo, el número de recombinantes varió dependiendo de la región, para los recombinantes sencillos entre los genes $w-m$ disminuyó el número de recombinantes de las diferentes concentraciones de NaN_3 en comparación con el testigo, mientras que para la región entre los genes $y-w$ y los dobles recombinantes se obtuvieron más recombinantes que en el testigo (Tabla VII).

F_2 de machos silvestres atados con NaN_3 y hembras no tratadas wmf

La proporción de recombinantes respecto a los parentales fue mayor en todas las concentraciones de NaN_3 , ($Z_{0.05}=1.96$; $p<0.05$) (Fig.3.9c). Debido a que el número de organismos con fenotipo parental fue menor en todas las concentraciones. Mientras que el incremento en los recombinantes se observó específicamente en la región entre los genes $m-f$ y en los dobles recombinantes (Tabla VII).

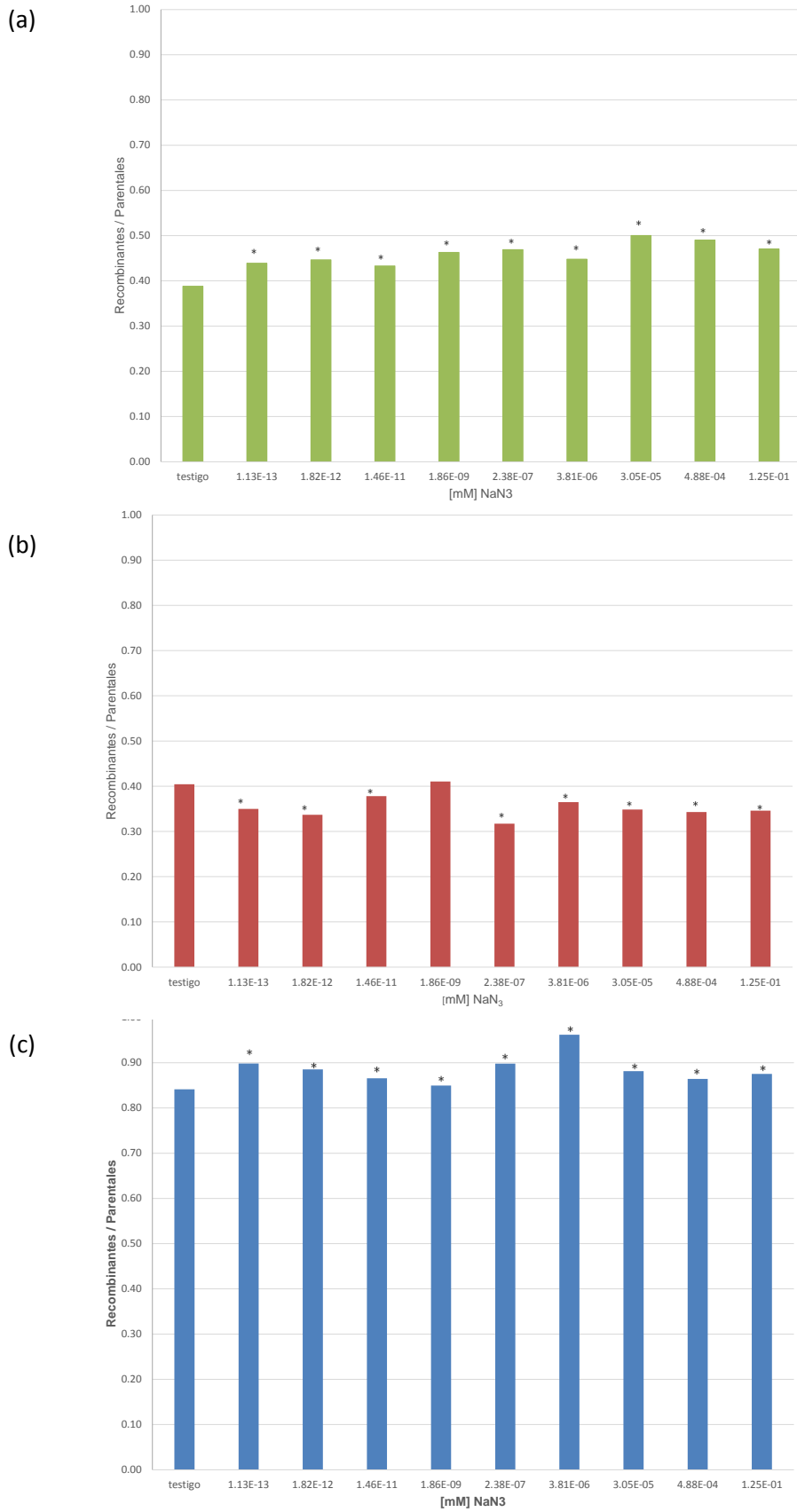


Figura 3.9. Proporción de recombinantes respecto a los parentales en función de la [mM] de NaNO₃ a) *wm* b) *ywm* c) *wmf*. El * indica diferencias significativas respecto al testigo.

Tabla VII Proporción de fenotipos parentales y recombinantes de la F₂ de hembras no tratadas y machos tratados con NaN₃

a) hembras wm									
[NaN3]	N	Parentales	β	Recombinantes sencillos (w-m)					
				β	β				
testigo	3540	0.7203			0.2797				
1.13E-13	2667	0.6948	*		0.3052	*			
1.82E-12	4425	0.6913	*		0.3087	*			
1.46E-11	5556	0.6978	*		0.3022	*			
1.86E-09	4750	0.6836	*		0.3164	*			
2.38E-07	5524	0.6807	*		0.3193	*			
3.81E-06	5151	0.6905	*		0.3095	*			
3.05E-05	6076	0.6666	*		0.3334	*			
4.88E-04	7127	0.6710	*		0.3290	*			
1.25E-01	5056	0.6800	*		0.3200	*			

b) hembras ywm									
[NaN3]	N	Parentales	β	Recombinantes sencillos (w-m)	β	Recombinantes sencillos (y-w)	β	Dobles Recombinantes	β
testigo	4463	0.7121		0.0020		0.2857		0.0002	
1.13E-13	3743	0.7408	*	0.0024	-	0.2565	*	0.0003	-
1.82E-12	5034	0.7481	*	0.0024	-	0.2491	*	0.0004	-
1.46E-11	5646	0.7256	-	0.0035	-	0.2705	-	0.0004	-
1.86E-09	3320	0.7090	-	0.0033	-	0.2873	-	0.0003	-
2.38E-07	3446	0.7591	*	0.0023	-	0.2377	*	0.0009	-
3.81E-06	3914	0.7328	*	0.0049	*	0.2616	*	0.0008	-
3.05E-05	3854	0.7416	*	0.0026	-	0.2447	*	0.0112	*
4.88E-04	4307	0.7446	*	0.0026	-	0.2526	*	0.0002	-
1.25E-01	4164	0.7430	*	0.0036	-	0.2531	*	0.0002	-

b) hembras wmf									
[NaN3]	N	Parentales	β	Recombinantes sencillos (w-m)	β	Recombinantes sencillos (m-f)	β	Dobles Recombinantes	β
testigo	5281	0.5431		0.2990		0.1257		0.0322	
1.13E-13	2836	0.5268	-	0.2779	*	0.1566	*	0.0388	-
1.82E-12	4210	0.5304	-	0.2812	-	0.1523	*	0.0361	-
1.46E-11	5112	0.5360	-	0.2838	-	0.1395	*	0.0407	*
1.86E-09	5312	0.5407	-	0.2871	-	0.1284	-	0.0439	*
2.38E-07	5379	0.5269	-	0.2911	-	0.1454	*	0.0366	-
3.81E-06	4601	0.5097	*	0.3088	-	0.1400	*	0.0415	*
3.05E-05	5174	0.5315	-	0.2978	-	0.1307	-	0.0400	*
4.88E-04	4866	0.5364	-	0.2830	-	0.1428	*	0.0378	-
1.25E-01	4758	0.5332	-	0.2949	-	0.1293	-	0.0427	*

N, Total de moscas de la F₂; β , prueba de Z para proporciones. El * indica diferencias significativas p<0.05.

3.5 Efecto de la NaN_3 en el número de categorías fenotípicas por familia .

Para el sistema de cruce de mapeo de dos puntos wm se esperaba que las familias presentaran cuatro categorías fenotípicas: dos parentales y dos recombinantes. Sin embargo, se recobraron familias con menos de cuatro categorías fenotípicas, principalmente en las familias descendientes de machos expuestos a NaN_3 (Fig. 3.10a). Esto significa que la exposición a NaN_3 ocasiona que en algunas familias no se recobren todos los fenotipos esperados, y como consecuencia los fenotipos expresados en la población F_2 provienen sólo de algunas familias (Fig. 3.10b).

Para los sistemas de cruce de mapeo de tres puntos ywm o wmf se esperaban ocho categorías fenotípicas por familia: dos categorías de tipo parental, dos categorías de tipo recombinantes sencillos RI, dos categorías de tipo recombinantes sencillos RII y dos categorías dobles recombinantes.

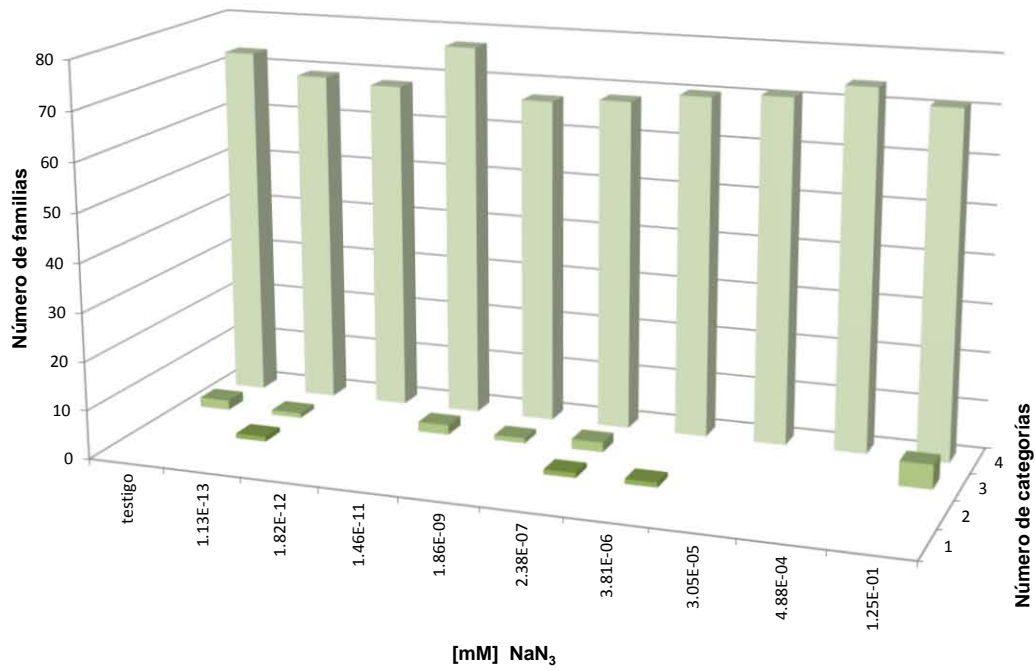
En el caso del sistema de cruce ywm ninguna familia del testigo ni de las concentraciones de NaN_3 presentó siete y ocho categorías fenotípicas (Fig. 3.11a) sólo se recobraron familias con una y hasta seis categorías fenotípicas.

La distribución del número de categorías fenotípicas de cada familia fue diferente entre el testigo y las diferentes concentraciones de NaN_3 ya que el testigo sólo presentó familias con tres, cuatro y cinco categorías mientras que en las familias descendientes de machos silvestres expuestos a NaN_3 presentaron desde una, dos, tres, cuatro, cinco y seis categorías fenotípicas. Es decir, que en un mayor número de familias no se recobraron los fenotipos esperados, por lo tanto no todas las familias contribuyeron a los fenotipos observados en la F_2 .

El número de familias que contribuyeron en los fenotipos observados en la F_2 cambia dependiendo de la [X] de NaN_3 , principalmente en los fenotipos: $yw^{+m^{+}}$, y^{+wm} , que son recombinantes sencillos de la región I, entre los genes $y-w$ y $y^{+wm^{+}}$, $y^{+wm^{+}}$ que representan los dobles recombinantes (Fig. 3.11b).

Para el sistema de cruce wmf el número de categorías por familia fue dependiente de la concentración NaN_3 ($\chi^2= 43.22$, $gl=18$, $p < 0.05$), debido a que por un lado se recobraron

(a)



(b)

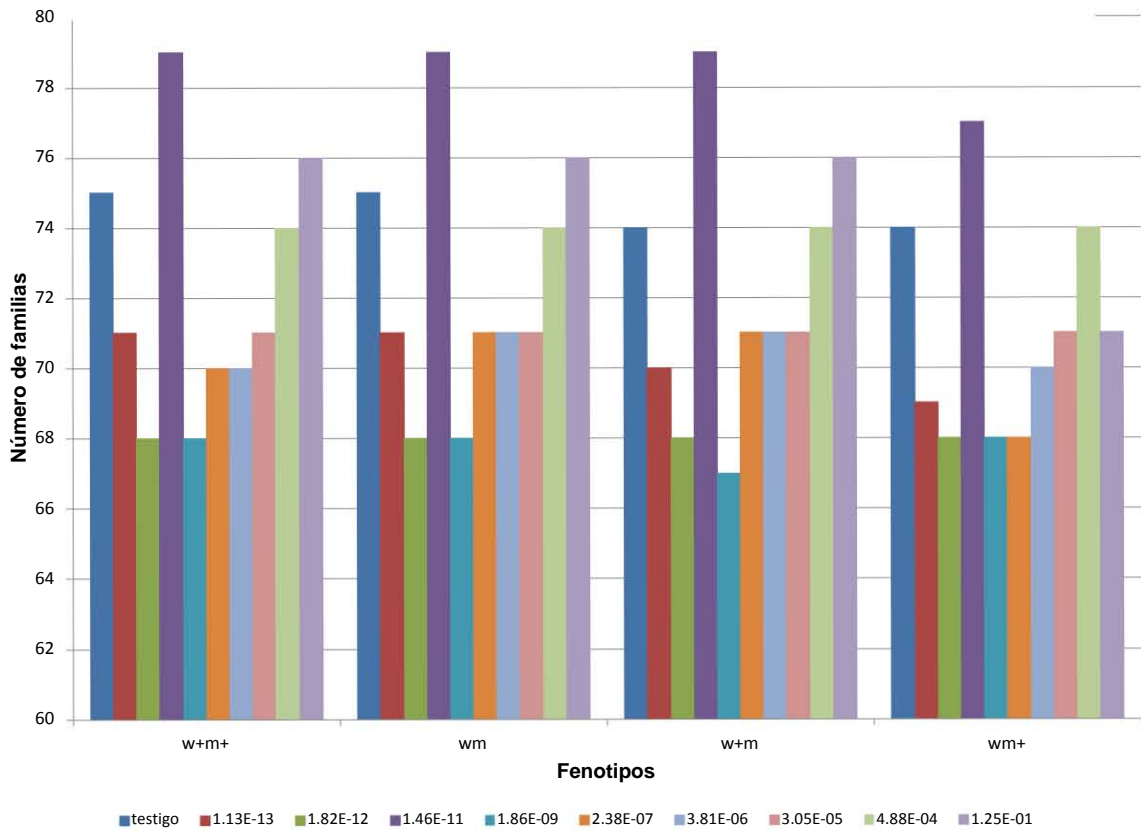
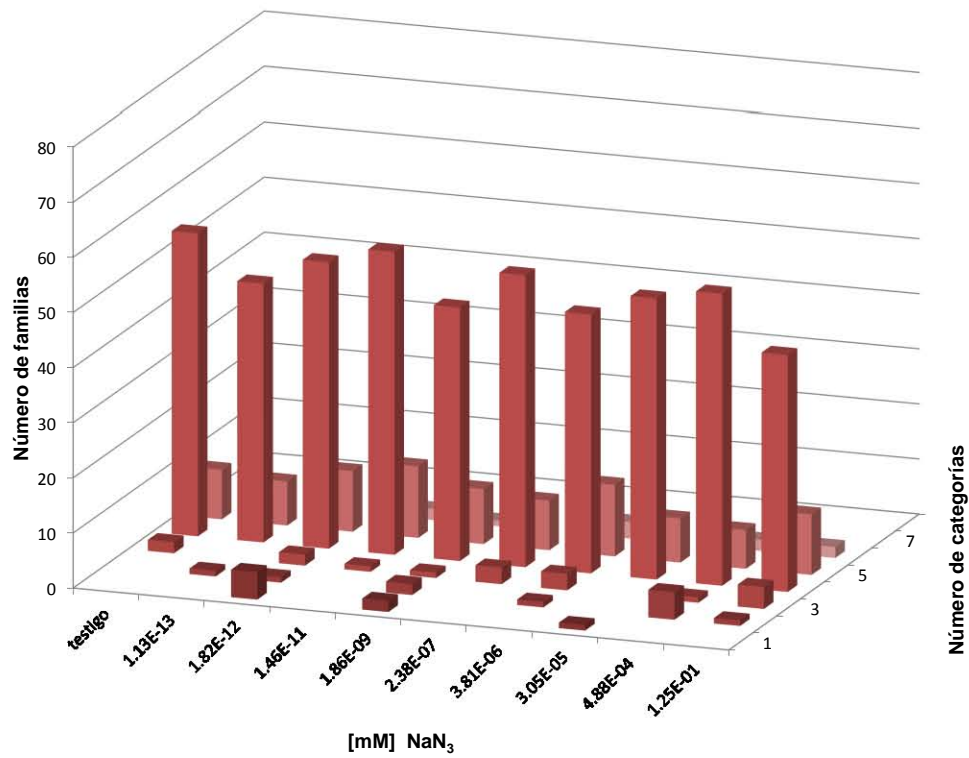


Figura 3.10 a) Número de categorías fenotípicas por familia en función de la [mM] de NaN_3 , b) Número de familias que presentan cada categoría fenotípica en función de la [mM] de NaN_3 . Mapeo con la cepa *wm*.

(a)



(b)

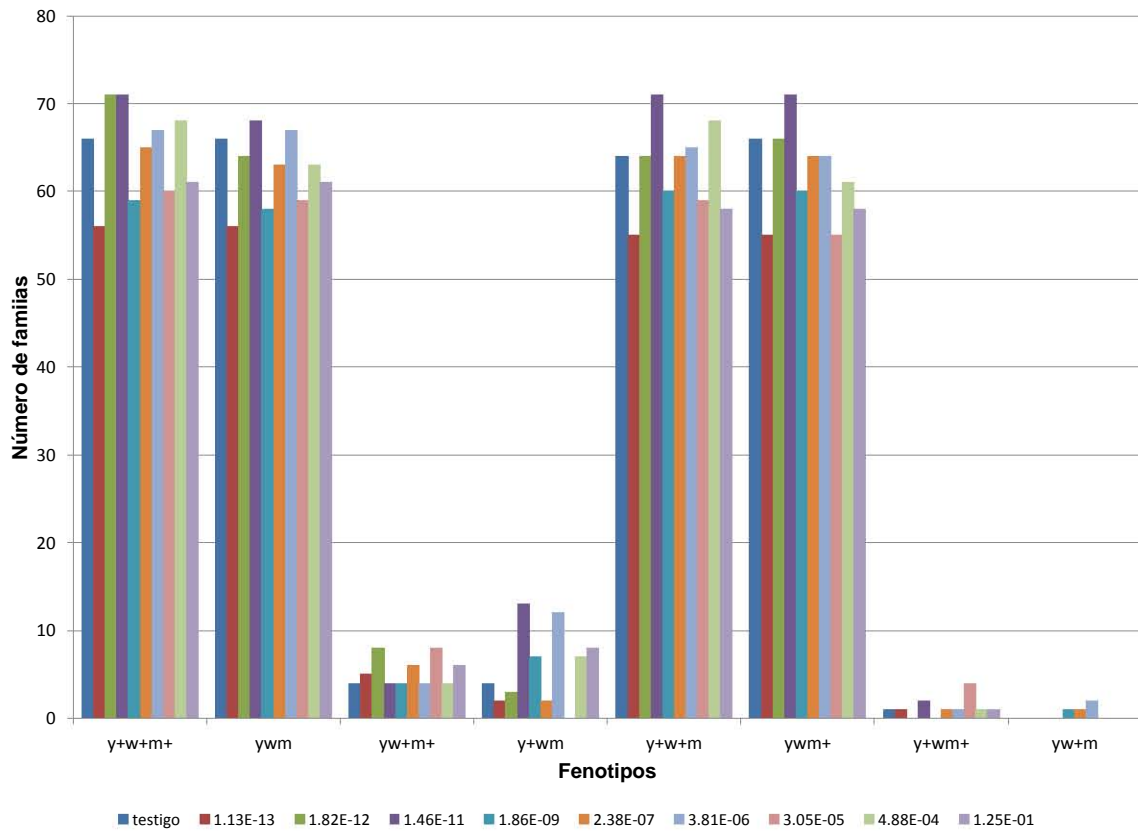
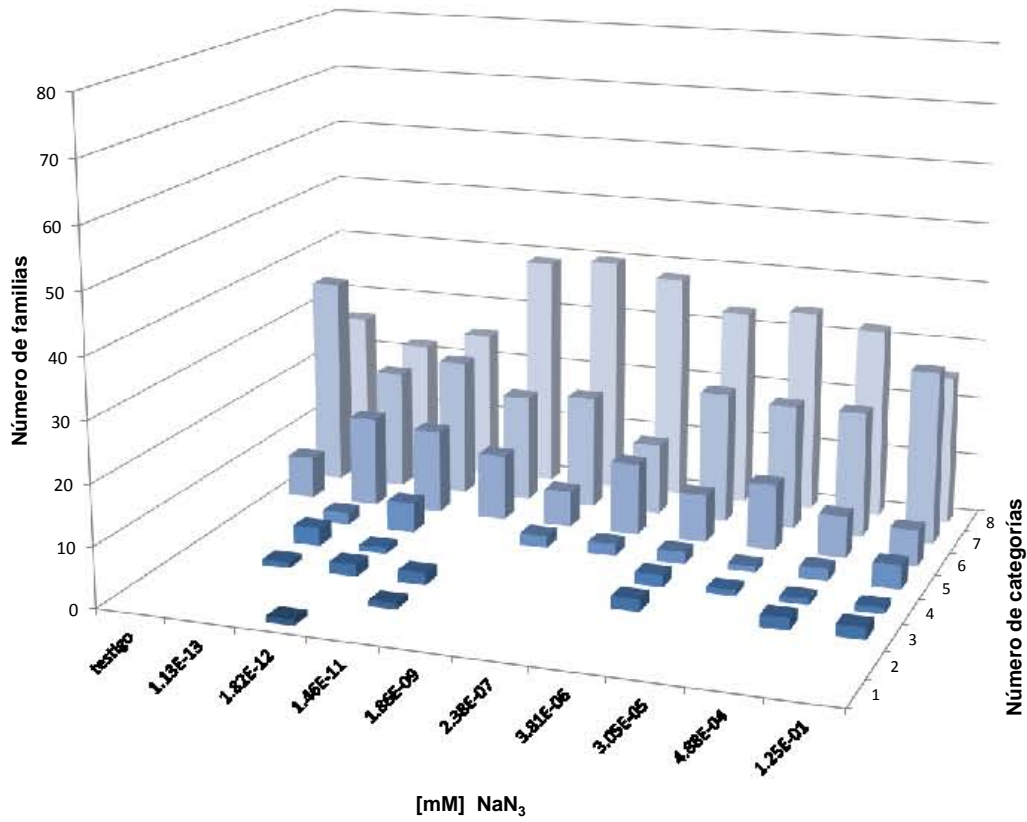


Figura 3.11 a) Número de categorías fenotípicas por familia en función de la [mM] de NaNO_3 , b) Número de familias que presentan cada categoría fenotípica en función de la [mM] de NaNO_3 . Mapeo con la cepa *ywm*

(a)



(b)

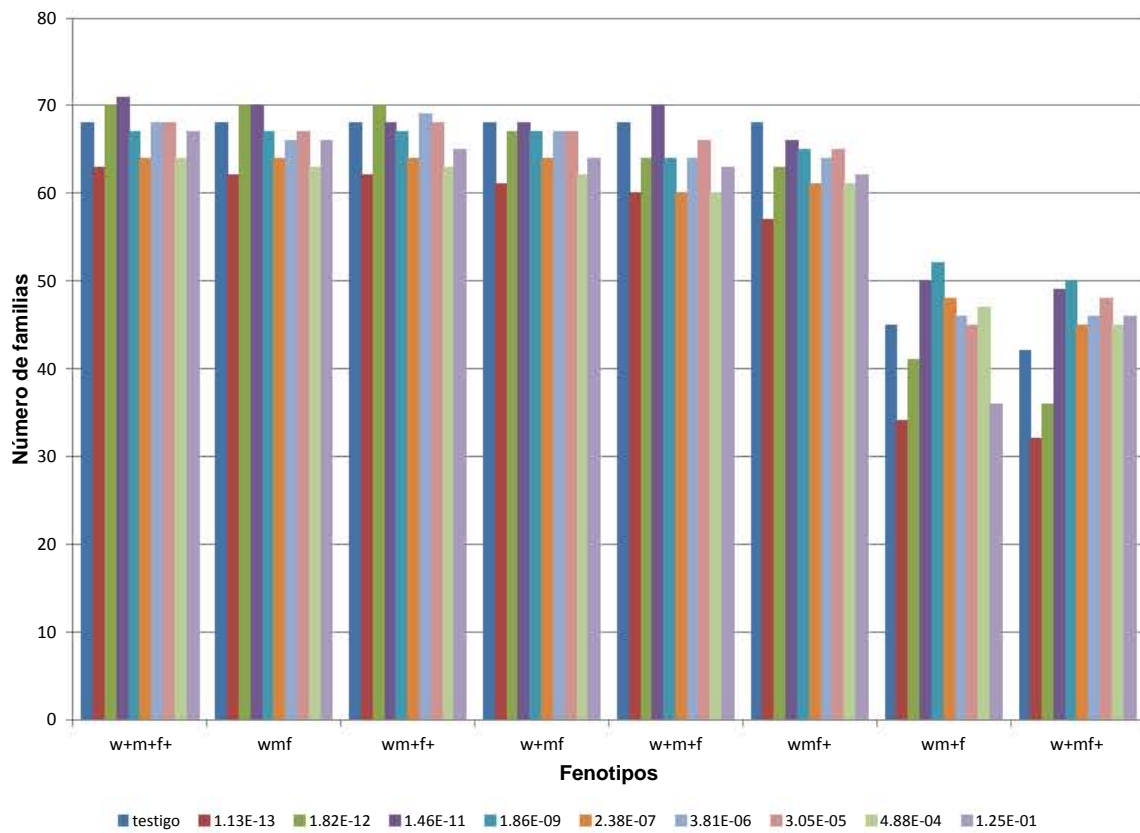


Figura 3.12 a) Número de categorías fenotípicas por familia en función de la [mM] de NaN_3 , b) Número de familias que presentan cada categoría fenotípica en función de la [mM] de NaN_3 . Mapeo con la cepa *wmf*

más familias con ocho categorías en las [X] de NaN₃ que en el testigo, y por otro lado se recuperaron familias con una, dos, tres, cuatro y cinco categorías fenotípicas en las concentraciones de NaN₃ mientras que en el testigo sólo se obtuvieron familias con seis, siete y ocho categorías fenotípicas (Fig. 3.12a).

Esto significa que, de las familias descendientes de los machos expuestos a [X] de NaN₃, algunas familias presentan todos los fenotipos esperados mientras que otras familias no. Por lo que la contribución de los fenotipos observados en la F₂ sólo proviene de algunas familias. El número de familias que contribuyen a cada fenotipo depende de la [X] de NaN₃ (Fig. 3.12b).

En los tres sistemas de cruzas se recobran mayor número de familias con menor número de categorías fenotípicas que en los testigos. Por lo tanto, la exposición a NaN₃ ocasiona que en algunas familias no se recobren todos los fenotipos, es decir, que se pierdan algunos fenotipos y como consecuencia los fenotipos expresados en la población F₂ provienen sólo de algunas familias.

IV. DISCUSIÓN

Los seres vivos están expuestos de manera continua a una gran variedad de compuestos que van desde metales y otros químicos inorgánicos, hasta moléculas orgánicas complejas y agentes físicos, todos ellos potencialmente dañinos y que ponen en riesgo la integridad de los organismos.

La evaluación y cuantificación del riesgo de la exposición a diversos compuestos se enfoca en los efectos de concentraciones altas ya que sigue el modelo clásico de dosis - respuesta que asume que en las concentraciones mayores hay mayor efecto (Klaassen y Watkins, 2006) dejando de lado las concentraciones bajas. No obstante varios estudios han evidenciado que la respuesta a concentraciones bajas de radiaciones y algunos compuestos no es lineal e incluso algunas veces resulta contraria a los resultados obtenidos en concentraciones altas (Stebbing, 1997; Calabrese y Baldwin, 1998; Calabrese y Baldwin, 2001). Este aspecto es especialmente crítico en la determinación del daño al material genético hereditario de los organismos sobrevivientes a la exposición ante algún compuesto (Ramos *et al.*, 2006).

En este trabajo se evaluó el daño al material genético hereditario en las células germinales de machos silvestres sobrevivientes a la exposición de NaN_3 , mediante el cambio en las frecuencias de recombinación entre tres genes del cromosoma X estimadas en los descendientes de su progenie.

4.1. La NaN_3 afecta a los organismos expuestos y a sus descendientes.

Para determinar el efecto tóxico en los organismos expuestos se utilizó el índice de sobrevivencia, que es un biomarcador que evalúa de manera global la toxicidad de un compuesto (Ramos *et al.*, 2006). Con base en este biomarcador las concentraciones menores a 0.125mM de NaN_3 no mostraron un efecto tóxico por lo tanto se recobraron organismos en los cuales se pudo evaluar el daño al material genético hereditario por la exposición a NaN_3 . La proporción de hembras y machos de los organismos recobrados no

se alteró, los machos sobrevivientes cruzados con hembras no tratadas, no presentaron un efecto diferencial por la NaN_3 .

La toxicidad de los compuestos además de comprometer la sobrevivencia y proporción sexual de los organismos, también tiene efecto a otros niveles como en la capacidad de reproducción de estos organismos ya que pueden sufrir alteraciones en los procesos fisiológicos relacionados con la diferenciación, la maduración sexual, la producción de gametos, y la fertilización (Repetto, M y G. Repetto, 2009).

Los efectos de la NaN_3 en cuanto a la fertilidad y progenie promedio por macho se esperaba que fueran similares para los tres sistemas de cruza dado que en todos los casos los organismos tratados fueron los machos silvestres. Sin embargo el efecto de la NaN_3 fue diferente dependiendo del tipo de hembras con las que fueron cruzados los machos tratados. Este efecto diferencial se mantuvo en la fertilidad y fecundidad de la F_1 .

La respuesta diferencial en la fertilidad dependiendo del sistema de cruza podría ser resultado de una menor fertilidad de las cepas *ywm* o *wmf* o por otro lado podrían indicar que el daño causado en las células germinales de los machos silvestres por la exposición a NaN_3 es amortiguado de alguna manera por las diferencias en la constitución genética de las hembras.

Un estudio reciente muestra que el genoma de las hembras modula el efecto del tratamiento de machos expuestos a NaN_3 (Castillo y Ramos, 2010). En otros estudios se ha establecido que lesiones en el DNA de los espermatozoides es reparado eficientemente dentro de unas pocas horas después de la fertilización (Generoso *et al.*, 1979; Brandriff y Pedersen, 1981). Esta reparación puede desencadenar una cascada de eventos en el huevo fertilizado, similar al sistema de reparación en las espermatogonias deficientes (Dubrova, 2003). La activación de esta cascada puede estar asociada a los diferentes componentes maternos asociados al citoplasma de las hembras modulando el impacto que produce el daño en los organismos expuestos. En este caso la constitución genética de las hembras es diferente, lo cual tiene un impacto en los componentes citoplasmáticos de sus óvulos y en la forma de modular el daño en las células germinales de los machos expuestos a NaN_3 .

El mecanismo por el cual la NaN_3 afectó la fertilidad de los machos podría estar relacionada con la inhibición del citocromo C, el cual forma parte del complejo proteico de la cadena transportadora de electrones que genera un gradiente de protones para formar el ATP en las mitocondrias (Alberts *et al.*, 2004; Campbell y Reece, 2008,) por lo que la inhibición del citocromo C disminuiría la cantidad de ATP producido, el ATP es indispensable para varios procesos, incluyendo la motilidad de los espermatozoides (Gilbert, 2006) alterando la capacidad reproductiva de los machos.

Sin embargo, en algunas de las concentraciones de NaN_3 , los machos fértiles tuvieron mayor número de hijos que en el testigo. Esta respuesta se hizo más evidente en la siguiente generación. Esto implica que hubo un efecto transgeneracional, pues aunque la progenie (F_1) no estuvo expuesta directamente, detectó y respondió al daño ocasionado en sus progenitores machos por la NaN_3 .

4.2. La NaN_3 modifica las frecuencias de recombinación

Las frecuencias de recombinación entre los genes: *white-miniature*, *yellow-white* y *miniature-forked* del cromosoma X en las células germinales de *Drosophila melanogaster* fueron modificadas por la exposición de los progenitores a NaN_3 .

No obstante, los cambios que obtuvimos en las frecuencias de recombinación por la exposición a NaN_3 no fueron homogéneos ya que intervinieron factores como la constitución genética de las cepas utilizadas, la distancia entre los genes y la región cromosómica en donde se localizan.

La intervención de la constitución genética de las cepas se evidenció en los resultados de la frecuencia de recombinación entre los genes *white-miniature*.

La frecuencia de recombinación entre estos genes se obtuvo para los tres sistemas de cruza, y dado que era la misma región cromosómica, se esperaba que los efectos de la NaN_3 fueran similares en los tres casos. Pero los resultados fueron contradictorios, en el caso de las cepas *wmy* y *wmf* las frecuencias de recombinación incrementaron mientras que para la cepa *ywm* disminuyeron. Estas diferencias podrían ser atribuidas a la presencia del gen *yellow* en la cepa *ywm*, el cual parecería impedir el entrecruzamiento entre los genes

white-miniature. Por lo tanto, la presencia de un gen mutante en la constitución genética de las cepas utilizadas podría intervenir en la frecuencia con la que ocurren los entrecruzamientos cromosómicos, estimados mediante la frecuencia de recombinación.

En otra de las hipótesis se planteaba que el cambio en las frecuencias de recombinación sería más evidente entre los genes que se encontraban más proximales (*yellow-white*) que en los genes con mayor distancia (*white-miniature*) y (*miniature-forked*). Ese supuesto no se cumplió, ya que el cambio en las frecuencias de recombinación fue más evidente entre la región *white-miniature* y *miniature-forked*.

A lo anterior contribuyó que existe un efecto diferencial entre las regiones de los cromosomas, siendo mayor la incidencia de entrecruzamientos en la región central que las regiones centroméricas y teloméricas (Müller,1925); incluso ahora se sabe que existen regiones cromosómicas que son puntos calientes para el entrecruzamiento (Lewin,2008) En este caso los genes *yellow-white* además de estar muy cercanos entre sí, se encuentran en el extremo derecho del cromosoma X, por lo que eso podría ser un factor adicional por el cual no se encontraron los cambios esperados.

4.3.La exposición de los progenitores a NaN_3 impacta en los fenotipos de las nuevas generaciones

El incremento o la disminución en las frecuencias de recombinación tiene un impacto directo en el tipo y la proporción de genotipos en las poblaciones nuevas. El número de organismos que presentan fenotipos parentales y fenotipos recombinantes incrementa o disminuye cuando los progenitores son expuestos a NaN_3 afectando la composición genética de las siguientes generaciones. Estos cambios en la variación genética en las nuevas generaciones tiene una implicación biológica, debido a que la variación genética de las poblaciones es materia prima para la selección natural (Darwin, 1859).

No obstante, no todas las familias de la población contribuyen en la misma magnitud, debido a que en los tres sistemas de cruza se recobran mayor número de familias con menor número de categorías fenotípicas que en los testigos. Por lo tanto, la exposición a la

NaN₃ ocasiona que en algunas familias no se recobren todos los fenotipos, es decir, que se pierdan algunos fenotipos y como consecuencia los fenotipos expresados en la población F₂ provienen sólo de algunas familias.

4.4. ¿Por qué las frecuencias de recombinación pueden modificarse por los cambios en el ambiente, como la exposición a NaN₃?

La alteración de las frecuencias de recombinación por la exposición a NaN₃ coinciden con otros estudios que muestran que las frecuencias de recombinación durante la gametogénesis son modificadas por factores externos como la edad (Bridges,1915; Bridges,1927), la temperatura (Plough,1917; Plough,1921; Stern,1926), la exposición a rayos X (Mavor 1923; Mavor y Svenson,1924; Muller,1925) y rayos gamma (Whittinghill,1951).

Esta respuesta de las células germinales es similar a la alteración en la frecuencia de entrecruzamientos cromosómicos en las células somáticas (Lidsley *et al.*, 1967) para factores como la temperatura y la edad (Stern, 1936).

En el caso de las células somáticas, el entrecruzamiento cromosómico entre cromátidas no hermanas también llamado recombinación homóloga, ha sido considerado como un proceso crítico para la reparación de las lesiones del ADN (Krejci *et al.*, 2012).

Las lesiones en el ADN ocasionadas por fuentes endógenas o exógenas ponen en riesgo la supervivencia de las células (Lewin, 2008). Por lo tanto las células presentan diferentes vías bioquímicas para reparar las diferentes lesiones, la vía que utilice dependerá del tipo y la intensidad del daño lesiones (Ouyang, et al, 2008). La recombinación homóloga es un mecanismo que repara rompimientos en las cadenas de ADN (Krejci *et al.*, 2012) también repara daños persistentes en una molécula hija del material genético después de la replicación obteniendo otra copia de la secuencia a partir de una fuente no dañada (Lewin, 2008). Este mecanismo ocurre durante la fase S y G₂ del ciclo celular mitótico (Mathiasen y Lisby, 2014)

Mientras que la recombinación homóloga en las células germinales es considerada como un proceso crucial para generar variación en los gametos de los organismos de reproducción

sexual, produciendo nuevos arreglos genéticos en las siguientes generaciones. La ocurrencia de este proceso se ha ubicado en la Profase I de la meiosis (Alberts *et al.*, 2004).

No obstante, existen algunas similitudes entre la recombinación homóloga en las células somáticas y la recombinación homóloga en las células germinales.

En ambos casos el entrecruzamiento se produce cuando los cromosomas están duplicados, e implica el corte y la reunión entre cromátidas no hermanas (Lidsley *et al.*, 1967). Se ha observado que la presencia de roturas de dobles cadenas inicia el proceso de recombinación homóloga tanto en células somáticas como germinales (Keeney, *et al.*, 1997; Lewin, 2008; Mathiasen y Lisby, 2014). En levaduras se ha encontrado que existe una correlación directa entre la frecuencia de rompimientos de dobles cadenas y los eventos de recombinación meiótica (Resnick, 1976). Además las enzimas involucradas en estos mecanismos son similares (Krejci *et al.*, 2012).

Por otro lado, los dos procesos de recombinación homóloga son recíprocos y dan lugar a recombinantes genéticos, es decir, formación de células con nuevos arreglos genéticos y, finalmente se obtiene un el mismo orden inequívoca de los genes en el cromosoma utilizando la frecuencias de recombinación mitótica o meiótica (Lidsley *et al.*, 1967).

La susceptibilidad del entrecruzamiento cromosómico ante factores externos, y las semejanzas de éste con el sistema de reparación por recombinación plantean la posibilidad de que el entrecruzamiento cromosómico en las células germinales se comporte como un sistema de reparación como en las células somáticas.

Esta hipótesis permitiría explicar el cambio en las frecuencias de recombinación producidas por la exposición a NaN_3 .

El cambio en las frecuencias de recombinación por la NaN_3 estimadas en la F_2 , indican que el número de entrecruzamientos ocurridos durante la formación de los gametos de la hembra heterocigota F_1 modificaron su frecuencia.

Las hembras heterocigotas de la F_1 no fueron expuestas a la NaN_3 , la exposición se realizó en los machos silvestres progenitores de las hembras heterocigotas F_1 . El daño ocasionado por la NaN_3 en las células germinales de los machos podría ser cualquier alteración en la

estructura del DNA que cambia la constitución génica, para este caso la alteración del cromosoma X, el cual es heredado a sus hijas (heterocigotas). Las hembras hijas presentan dos cromosomas X, el del padre (posiblemente dañado) y el de la madre (no dañado), cuando sus células inician el proceso de división, si el cromosoma X que proviene del padre está dañado y el daño persistió después de la replicación éste podría ser reparado a partir del cromosoma X no dañado, mediante el proceso de entrecruzamiento.

En consecuencia, el incremento o la disminución en las frecuencias de recombinación estimadas a nivel poblacional en la progenie de las hembras heterocigotas de la F₁, pone en evidencia que aunque éstas no hayan recibido el daño directo pueden detectar el daño ocasionado en las células germinales de sus progenitores machos por la exposición a NaN₃.

La exposición de moscas a concentraciones subtóxicas de NaN₃ pone en riesgo la integridad de los organismos sobrevivientes, comprometiendo la fertilidad y el número de descendientes. El daño ocasionado al material genético hereditario de los organismos sobrevivientes, tiene efectos en sus descendientes, en su fertilidad, número de hijos alterando la calidad, cantidad y expresión del ADN, que alteran y modifican la frecuencia de procesos como el entrecruzamiento cromosómico.

La alteración en las frecuencias de recombinación implica que el entrecruzamiento cromosómico en las células germinales responde a los cambios ambientales, como la exposición a NaN₃, incrementando o disminuyendo su frecuencia, ocasionando el aumento o reducción de gametos con nuevos arreglos genéticos, lo que provoca un impacto directo en el tipo y la proporción de genotipos en las nuevas generaciones.

Las proporciones de nuevas combinaciones genéticas, en corto plazo, generan gran parte de la variación de las poblaciones (Futuyma,1998; Griffiths *et al.*, 2003) y a largo plazo, contribuyen a la diversidad biológica.

V CONCLUSIONES

La NaN_3 modificó las frecuencias de recombinación poblacionales entre los genes del cromosoma X en células germinales de *D. melanogaster*: (*yellow-white*), (*white-miniature*) y (*miniature-forked*) .

*La exposición de los machos a NaN_3 tuvo un impacto en sus descendientes (Fertilidad, Progenie por machos, Fecundidad) que fue parcialmente amortiguada por la constitución genética de las hembras progenitoras no expuestas.

*El efecto en las frecuencias de recombinación estimadas en la F_2 es un efecto transgeneracional de la exposición de los progenitores machos expuestos a la NaN_3 .

*El cambio en las frecuencias de recombinación es diferencial dependiendo de la distancia entre los genes, la región cromosómica en donde se localizan y la constitución genética de las cepas.

*La NaN_3 modificó la composición genética y fenotípica de la población de las generaciones provenientes de los machos silvestres expuestos a NaN_3 ,

VI LITERATURA CITADA

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, WoodageT, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, VenterJC.2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461): 2185-2195.
- Alberts, B., A. Johnson; J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2004. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, Barcelona. 1463pp.
- Arenaz, P., R.A. Nilan y A. Klein. 1983. Lack induction of single-strand breaks in mammalian cells by sodium azide and its proximal mutagen. *Mutation Research*. 116, 423-429.
- Arenaz P., L. Hallberg y F. Mancillas. 1989. Sodium azide mutagenesis in mammals: inability of mammalian cells to convert azide to a mutagenic intermediate. *Mutation Research*. 227: 63-67.
- Arellano, O. 2002. *Drosophila* como modelo in vivo para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los Azufres, Mich. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.México. 51p
- Avers, C. 1983. *Biología celular*. Grupo Editorial Iberoamericana.México. 532 pp.
- Avers,C. 1984. *Genetics*. 2 Edition Ed Willard Grant Press . Estados Unidos de América. 644 pp.
- Ayala,F.J.1994. *La Teoría de la evolución*. Ediciones Tema de Hoy, Madrid. 240 pp.

- Baars, A.J., G.H. Blijleven, Mohn, A.T. Natarajan A.T., y D.D.Brüner 1980. Preliminary studies on the ability of *Drosophila melanogaster* preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutation Research*: 257-264.
- Beadle, G.W. y E.L.Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 27: 499-506.
- Bock, I.R. y M.R.Wheeler. 1972. The *Drosophila melanogaster* species group. Univ. Texas Publ.7103:273-280.
- Brandriff y Pedersen RA. 1981. Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science*, 211(4489): 1431-1433.
- Bridges, C.B. 1915. A linkage variation in *Drosophila*. *Jour.Exp. Zoöl.* 19 (1):1-21.
- Bridges, C.B. 1927. The relation of the age of the female to crossing over in the third chromosome of *drosophila melanogaster*. *The Journal of General Physiology.* 8 (6):689-700.
- Brooker, Robert. 2005. Genetic. Analysis and Principles . Mcgraw Hill. USA p. 823.
- Buzzati-Traverso, A. (1947). [New mutants report.] *DrosInfServ.* 21: 66 (<http://flybase.org/>)
- Calabrese, E.J. y L.A. Baldwin. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 106, suplemento I.
- Calabrese, E.J. y L.A. Baldwin. 2001. Hormesis: U-shaped dose response and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Science.* 22(8): 285-291.
- Campbell, Neil y Jane Reece. 2008. *Biology*, Pearson Cummings. California, Estados Unidos de América.
- Castillo, M. y Ramos, P. 2010. Determinación del impacto del aporte citoplasmático materno en el daño reprotóxico de azida de sodio en *D. melanogaster*. Memorias del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética 2010. Sociedad Mexicana de Genética (SMG) 203 pp.
- Clark, A.M. 1958. Genetic effects of carbon monoxide, cyanide and azide on *Drosophila*. *Nature.* 181:500-501.
- Clark, A. M. 1982. The use of laval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research*: 2, 89-97.
- Creighton H. y McClintock. B. 1931. A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proc. N.A.S.* 17:492-497.
- Darwin, C. 1859. El origen de las especies. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 759pp.
- Demerec, M. 1994. *Biology of Drosophila* . Wiley and Sons New York. 632 pp.

- Dezzani, W., P.V. Harris y J.B. Boyd J.1982. Repair of double-strand DNA breaks in *Drosophila*. *Mutation research*: 92,151-160.
- Dubrova, Y.E. 2003. Radiation induced transgenerational instability. *Oncogene*. 22, 7087-7093.
- Eguiarte,L.2009. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En J. Morrone y P. Magaña (editores). *Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Farmer, J.L. (1974). [New mutants report.] *DrosInf Serv*. 51: 20 (<http://flybase.org/>)
- Feibel, C.S. 2008. Debatiendo los factores ambientales en la evolución humana. En: García, P., M., Montellano, S., Quiroz, F., Sour, S. Ceballos,y L. Chavéz. *Lecturas seleccionadas. Paleobiología*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 291-305.
- Fernandez Gianotti, A.A. (1950). [New mutants report.] *DrosInf Serv*. 24: 57 (<http://flybase.org/>)
- Futuyma, 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc.Publishers. Estados Unidos de América. 763 pp.
- Generoso, W.M., K.T., M., Krishna y S.W., Huff.1979. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1): 435–437.
- Gichner, T., y J. Velemínsky. 1977. The very low mutagenic activity of sodium azide in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.*, 19, 153-155.
- Gilbert, S. 2006. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc. Estados Unidos de América. 917pp.
- Goldschmidt, R.B. (1944). [New Mutants report.] *DrosInfServ*. 18: 40—44 (<http://flybase.org/>)
- González, E.C. y M.P. Ramos. 1997. Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutation Research*,389:157-165.
- Griffiths, A., W., J.H. Miller, D.T.Suzuki, R. Lewontin y R. Gelbart. 2002. *Genetics*. Mcgraw Hill.
- Griffiths, A., W. Gelbart, R. Lewontin y J. Miller. 2003. *Moder genetic Analysis. Integrating genes and Genomes*. Segundaedicion. 1999 W. H. Freeman and Company, New York Estados unidos.736.pp
- Hadwiger L.A., C. Sander, J. Eddyvean y J. Ralston. 1976. Sodium azide-induced mutants of peas that accumulate pisatin. *Phytopathology* 66, 629-630.
- Hålmström, I.,A. Sundvall, U. Rannug, R. Grafström y C. Ramel. 1981 a. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. 1.- Activation of vinyl chloride, 2.- aminoanthracene and benzo [α] pyrene as measured by mutagenic effects in *Salmonella thphimurium*. *Chem. Biol. Interactions*: 34, 129-143.

- Hålmström I., y R.Grafstrom. 1981 b. The metabolim of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of drosophila melanogaster. Enzyme induction and metabolism of benzo a pyrene. *Chem.-Biol. Interactions*, 34:145-159
- Index Merck. 1989. Merck, OneilMaryadele J. (Editor), A. Smith (Editor), P. E. Heckelman. Budavari S. Eds.
- Jeffs, P.S.;E.C. Holmes y M. Ashburner. 1994. The molecular evolution of the alcohol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase-related genes in the drosophila melanogaster species subgroup. *Mol.Biol.Evol.* 11(2): 287-304
- John Innes Laboratory, (1941). [New mutants report.] *DrosInf Serv.* 14:39. (<http://flybase.org>)
- Jones, J.A., J.R. Starkey y A. Kleinhofs. 1980. Toxicity and mutagenicity of sodium azide in mammalian cell cultures. *Mutation Research.*, 77, 293-299.
- Kafatos, F., C. Louis, C. Savakis, D. Glover., M. Ashburner, A, Link, I. Sidén-Kiamos y R. Saunders. 1991. Integrated maps of the Drosophila genome: progress and prospects.
- Kamra, O.P. y B. Gollapudi.1979. Mutagenic effects of sodium azide in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research.*, 66,381-384.
- Kanaya, N., B.S. Gill., I.S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S.S. Sandhu y H.C. Andersson.1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research.*, 310, 231-247.
- Kaufman, T.C. (1969). [New mutants report.] *DrosInf Serv.* 44: 44 (<http://flybase.org/>)
- Keeney, S., C.Giroux y N. Kleckner. 1997. Meiosis-specif DNA double-strand breaks are catalyzed by Sop11, a member of a Widely conserved protein family. *Cell.*,88:375-384.
- Klaassen, C.D. y J.B. Watkins. 2006. Casarett y Doull. Fundamentos de Toxicolog
- Kleinhofs, A., M. Kleinschmidt, D. Sciaky y S. Von Broembsen. 1975. Azide mutagenesis. *In vitro* studies. *Mutation Research.*, 29, 497-500.
- Kleinhofs, A., W. M. Owais y R.A. Nilan. 1978. Azide. *Mutation Research.*, 55, 165-195.
- Krejci,L., V.Atmannova, M.Spirek y X. Zhao. 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids Research.*, 140 (13): 5795-5818.
- LaVelle J.M. y J.B. Mangold. 1987. Structure-activity relationships of the azide metabolite, azidoalanine, in *S. typhimurium*. *Mutation Research.*, 177, 27-33.
- Lewin, B. 2008. Genes IX. Mac Graw Hill, México 892 pp.

- Lindsley, D.L., L. Sander, B. Nicoletti y G. 1967. Trippa. Genetic control of recombination in *Drosophila*. In: Peacock, W.J. y R.D. Brock (eds.) Replication and recombination of genetic material. Australian Academy of Science. Pp.253-259
- Lindsley D.L. y G. Zimm. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic, Press, Inc. U.S.A. 1133 pp.
- Ma, T.H., G.L. Cabrera, R. Chen, B.S. Gill, S.S Sandhu, A.L. Vandenberg y M.F. Salamone. 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Research*. 310,221-230.
- Mathiasen, D. y M. Lisby. 2014. Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* publicado en línea DOI: 10.1111/1574-6976 12066.
- Mavor, J.W. 1923. An effect of X rays on the linkage of Mendelian characters in the first chromosome of *Drosophila*. *Genetics*.8:355-366.
- Mavor, J. W. y H.K. Svenson. 1924. An effect of X rays on the linkage of mendelian characters in the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 9: 70-87.
- McClintock, B. 1930. A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. *Proc. N.A.S.*, 6: 791-796.
- Mendel, Gregor. 1865. Experiments in plant hybridization. *Versuche über Pflanzhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn. Bd. IV für das Jahr 1865*, Abhandlungen, 3-47.
- Meyer, H.U. (1963). [New mutants report.] *DrosInfServ.* 37: 50—51 (<http://flybase.org>)
- Mickey, G.H. (1952). [New mutants report.] *DrosInfServ.* 26: 67 (<http://flybase.org>)
- Mickey, G.H. (1963). [New mutants report.] *DrosInfServ.* 38: 28—30 (<http://flybase.org>)
- Morgan, T. H. 1910.a Sex-limited inheritance in *Drosophila*, *Science*, 32: 120-122.
- Morgan, T.H.1910.b Chromosomes and heredity. *The American Naturalist*, 44:449-496.
- Morgan, T. H. 1911. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science*, 34: 384.
- Morgan, T.H., A.H., Sturtevant, H.J. Muller, y C.B. Bridges. 1915. *The Mechanism of Mendelian Heredity*. Ed. Henry Holt and Company New York .
- Morgan, T.H. 1915. Localization of the heredity material in the germ cells. Department of Zoology. Columbia University.

- Morgan, Thomas H. 1919. *The Physical Basis of Heredity*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company
- Morgan, T.H., A.H. Sturtevant y C.B., Bridges. 1920. The evidence for the linear order of the genes. Communicated.
- Muller, H.J. 1925. The regionally differential effect of X rays on crossing over in autosomes of drosophila. *Genetics*. 10:470-507.
- Neel, J. (1942). [New mutants report.] *DrosInf Serv*. 16: 49--52. (<http://flybase.org>)
- Nilan, R.A., E.G. Sideris, A. Kleinhofs, C. Sander y C.F. Konzak. 1973. Azide- a potent mutagen. *Mutation Research.*, 17, 142-144.
- Notinger, R. 1970. Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of Drosophila larvae. *DrosInfServ* 45, 177.
- Oliver, C.P. (1939). [New mutants report.] *DrosInf Serv*. 12: 48. (<http://flybase.org>)
- Ouyang, K., L.L.Wou y N.A. Ellis.2008. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mechanisms of Ageing and Development.*,129:425-440.
- Owais, W.M., M.A. Zariwiz, R.A. Gunovich, A.L. Hodgdon, A. Kleinhofs y R.A. Nilan. 1978. A mutagenic in vivo metabolite of sodium azide. *Mutation Research*. 53, 355-358.
- Owais, W.M., A. Kleinhofs y R.A. Nilan.1979. In vivo conversion of sodium azide to a stable mutagenic metabolite in *Salmonella Typhimurium*. *Mutations Research*. 68, 15-22.
- Owais,W.M.,i A. Kleinhofs, R.C. Ronald, A. Kleinhofs y R.A. Nilan. 1981 Isolation of an azide mutagenic metabolite in *Salmonella typhimurium*.. *Mutation Research*. 91, 155-161.
- Owais,W.M., J.L. Rosichan, R.C. Ronald, A. Kleinhofs y R.A. Nilan. 1983. A mutagenic metabolite synthesized by *Salmonella typhimurium* grown in the presence of azide is azidoalanine. *Mutation Research*. 118, 229-239.
- Owais, W.M. y A. Kleinhofs. 1988. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. *Mutation Research.*, 197, 313-323.
- Pierce, B. 2006. Conceptos de genetica. Perason- Prentice Hall. España, 920pp.
- Pierce, B. 2010. Genética. Un enfoque conceptual. Editorial Medical Panamericana, España. 832 pp.
- Plough,H.H.1917.The effect of temperature on crossing over in drosophila. *Jour. Exp. Zoöl.* 24: 147-209.

- Plough, H.H. 1921. Further studies on the effect of temperature on crossing over. *Jour. Exp. Zoöl.* 32:187-202
- Powell, J.R. 1997. Progress and prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* model. Oxford University Press, New York
- Ramos M.P., H.M. Abundis, J.C. Gaytán, M.G. Ordaz., P.G. Orozoco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. Galicia, J.A. Muñoz. 1993. Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, México, 131 pp.
- Ramos, -Morales P., J Herrera Bazán, A. Muñoz-Moya, A. Muñoz-Hernández, H. Rivas-Martínez, B. Hernández-Bernal, V. García-Martínez. Comparación de cuatro biomarcadores en la curva de concentración-efecto de moscas expuestas a la NDMA. Memorias del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética 2006. Sociedad Mexicana de Genética (SMG) 70 p.
- Repetto, M y G. Repetto. 2009. Toxicología fundamental. Cuarta edición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 616p.
- Resnick, M.A. 1976. The repair of double-strand breaks in DNA; a model involving recombination. *J. Theor. Biol.*, 59, 97-106.
- Rosichan, J.L., W.M. Owais, A. Kleinhofs y R.A. Nilan. 1983. In vitro production of azide mutagenic metabolite in *Arabidopsis*, *Drosophila* y *Neurospora*. *Mutation Research.*, 119, 281-285.
- Russo, C.; N. Takezaki y M. Nei. 1995. Molecular phylogeny and divergence times of *Drosophilid* species. *Mol. Biol. Evol.* 12 (3):391-404.
- Sadiq, M. F. y W.M. Owais. 2000. Mutagenicity of sodium azide and its metabolite azidoalanine in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 469: 253-257.
- Sander, C. y F.J. Muehlbauer. 1977. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. *Environmental and experimental botany.* 17, 43-47.
- Sander, C., R. Nilan y A. Kleinhofs. 1978. Mutagenic and chromosome-breaking effects of azide in barley and human leukocytes. *Mutation Research.*, 50, 67-75.
- Schawaroch, V. 2002. Phylogeny of a paradigm lineage: The *Drosophila melanogaster* species group (Diptera: Drosophilidae). *Biol Linn Soc.* 76:21-37
- Slamenová, D. y A. Gabelova. 1980. The effects of sodium azide on mammalian cells cultivated in vitro. *Mutation Research.*, 71, 253-261.
- Sobels, F.H. 1974. The advantages of *Drosophila* for mutation studies, *Mutation Research*, 26: 277-284.
- Sobels, F. H. y E.W. Vogel. 1976. The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. *Mutation Research* 41: 95-106.
- Stanley, S. M. 2008. Macroevolución y Registro Fósil. En: García, P., M., Montellano, S., Quiroz, F., Sour, S. Ceballos, y L. Chavéz. *Lecturas seleccionadas.*

Paleobiología. Facultad de Ciencia. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 241-260.

- Stebbing, A.R.D. 1997 A theory for growth hormesis. *BELLE News letter*. 6 (2):1-11.
- Stern. 1926. An effect of temperatura and age on crossing-over in the first chromosome of *Drosophila melanogaster*. PROC. N.A.S. 12: 530-532. Communicated
- Sturtevant, A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14:43-59.
- Sutton, Walter S. 1903. The chromosomes in heredity. *Biological Bulletin*, 4: 231-251.
- Tamarin, R. 1982. Principles of genetics. Ed. Williar Grant Press Publishers. Estados Unidos de América 732pp.
- Tomlinson, C. 1980. Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in *Neurosporacrassa* and *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 70, 179-191.
- University of Buenos Aires, (1951). [New mutants report.] *DrosInf Serv*. 25: 69—70 (<http://flybase.org/>)
- Vogel, E.W. 1974. Some aspects of the detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. *Mutation Research* 29: 241-250.
- Vogel, E. 1987. Evaluation of potencial mammalian genotixins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*. 2(3): 161-171.
- Warfield, D.L. 1974. Azide mutagenicity and peroxidase inhibition. *Mutations Research*. 23, 399-400.
- Watson, J. D. y Crick, F. H. C. 1953.a Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.
- Watson, J. D. y Crick, F. H. C. 1953. b Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967.
- Whittinghill, M. 1951. Some effects of gamma rays on recombination and on crossing over in *drosophila melanogaster*. *Genetics* 36:332.
- Winder. 1993. The toxicity of lead. *Mutations Research*. 285:117-124.
- Williams, J.W. (1956). [New mutants report.] *DrosInfServ*. 30: 79—80 (<http://flybase.org/>)
- Zijilstra, J.A. y E. W.Vogel. 1988 a. Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 198:73-83.

ANEXOS

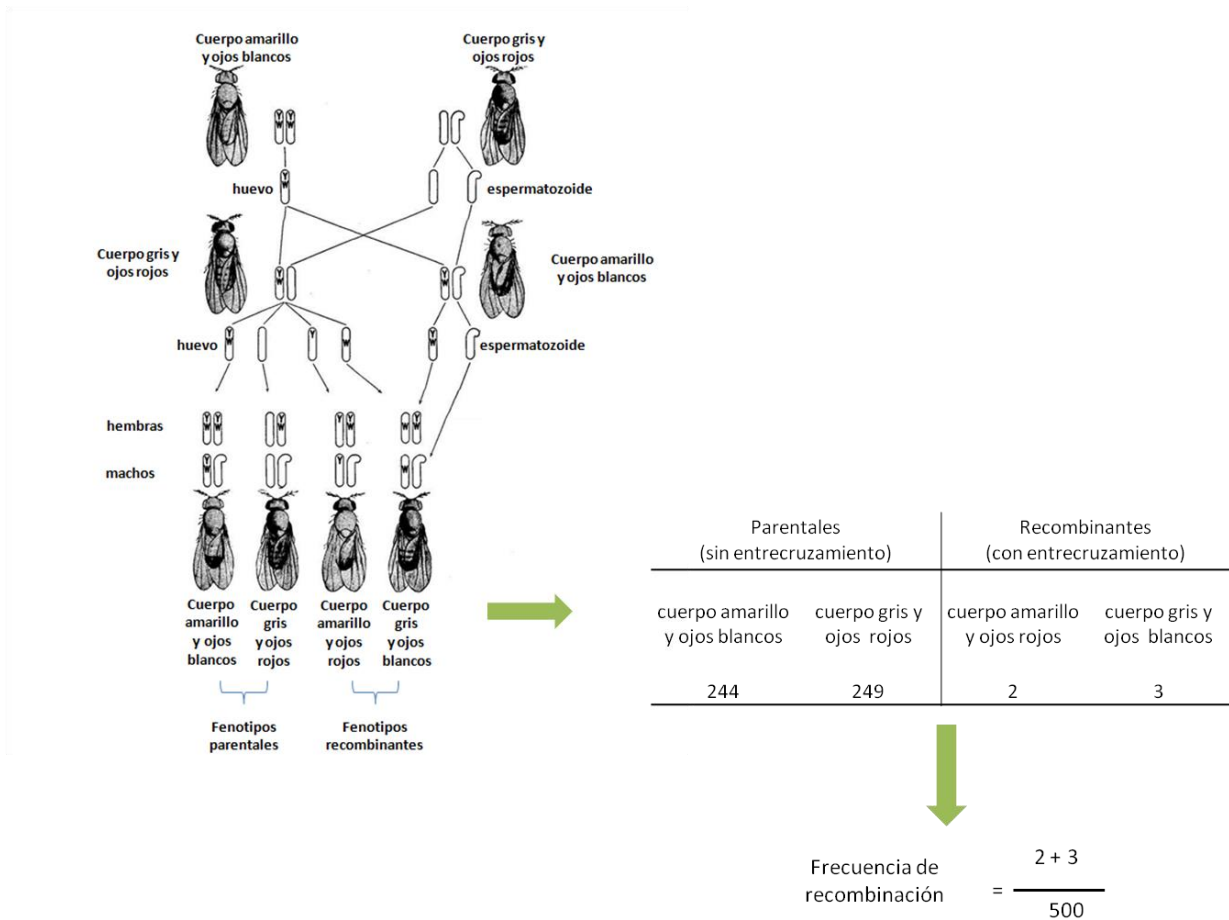
Anexo I.1 Obtención de las frecuencias de recombinación.

En diferentes tipos de cruzas que involucraban simultáneamente dos genes ligados (autosómicos o ligados al X) Morgan y sus colaboradores obtenían resultados que indicaban que los dos genes estaban ligados pero que en algunos casos no permanecían juntos. A los descendientes de este tipo de cruzas los clasificó en dos categorías: parentales y recombinantes, los organismos parentales presentaban el fenotipo de los progenitores y los recombinantes eran los organismos con nuevas combinaciones.

Morgan observó que la proporción de progenie recombinante resultante de una crusa de prueba, se modificaba considerablemente dependiendo de los genes ligados que estuviera analizando. Por lo que propuso que a partir de la progenie obtenida se podía calcular la frecuencia de recombinantes entre los dos genes analizados de la siguiente manera:

$$\text{Frecuencia de recombinación entre dos genes} = \frac{\text{\# de individuos con fenotipos recombinante}}{\text{\# total de progenie}} \times 100$$

Para obtener la frecuencia de recombinación entre dos genes ligados: *yellow-white*, que se localizan en el cromosoma X, se cruzan hembras con cuerpo amarillo y ojos blancos con machos silvestres (cuerpo gris y ojos rojos). Luego se cruza la $F_1 \times F_1$ para obtener la F_2 . En la F_2 se obtienen cuatro fenotipos, los cuales deben clasificarse en parentales (moscas con cuerpo gris y ojos rojos y moscas con cuerpo amarillo y ojos blancos) y recombinantes (moscas con cuerpo gris y ojos blancos y moscas con cuerpo amarillo y ojos rojos). Finalmente se cuenta el número de organismos de cada fenotipo para calcular la frecuencia de recombinación entre los genes. En este caso fue de 1%, e indica que el 1% de la descendencia son moscas con fenotipos recombinantes (nuevos fenotipos) (Figura AI.1).



Al.1 .Tipo y número de progenie F₂ de una crza para dos genes ligados al cromosoma X de *Drosophila melanogaster*: *yellow* y *white* y el cálculo de la frecuencia de recombinación entre los dos genes. Modificado de Morgan, 1915.

Anexo I.2 Evidencia citologica del entrecruzamiento

Con el fin de establecer la ocurrencia de los entrecruzamientos, Mc Clintock (1930) logró alterar físicamente dos cromosomas del maíz.

Algunas variedades de maíz presentan una acumulación visible de una sustancia coloreable en el brazo corto del cromosoma nueve, llamada Knob. Esta característica es transmitida de generación en generación. En consecuencia, en este cromosoma, se podría distinguir si estuvo involucrado en un intercambio con otro cromosoma (Mc Clintock, 1930). Entre el cromosoma nueve con knob y el cromosoma ocho de maíz hubo un intercambio tipo translocación que llevó a la formación de dos cromosomas morfológicamente diferentes: el

brazo largo del cromosoma nueve incrementó en longitud, mientras que el brazo largo del cromosoma ocho quedó más corto, conforme a los cromosomas nueve y ocho regulares, respectivamente (Figura AI.2) (Mc Clintock, 1930; Creighton y Mc Clintock, 1931). La modificación en el aspecto de los cromosomas facilitaría mostrar la existencia del intercambio a nivel citológico (Creighton y Mc Clintock, 1931).

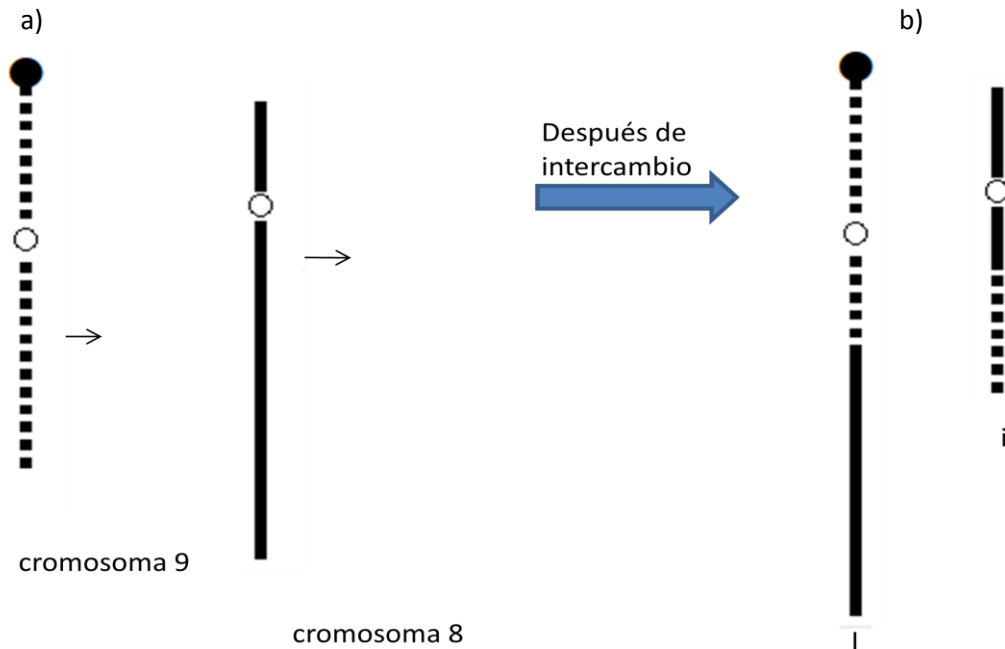


Figura AI.2 Diagrama de los cromosomas del maíz. a).- Se ilustran los cromosomas 9 y 8 normales. Las líneas punteadas son un recurso para distinguir un cromosoma de otro. La línea negra en cada cromosoma indica el lugar donde ocurre el intercambio cromosómico para producir la configuración b. b).- Los dos cromosomas producto del intercambio cromosómico, l es el cromosoma intercambiado largo e i es el cromosoma intercambiado corto. Modificada de Mc Clintock, 1930.

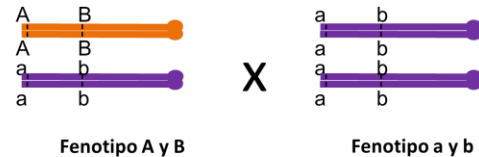
Anexo I.3. Mapeo de dos genes.

Si tenemos los genes A y B, debemos obtener líneas puras para los dos genes a partir de las cuales hacemos la cruce progenitora AB/AB X ab/ab para obtener organismos dihíbridos AB/ab, estos organismos son cruzados con un organismo ab/ab, para hacer la cruce de prueba necesaria para el mapeo. La descendencia de esta cruce se clasifica y cuenta por categorías fenotípicas (Figura AI.3). En este ejemplo, el número de organismos recombinantes no se ajusta a la proporción esperada para genes independientes: 1:1:1:1.

Cruza progenitora



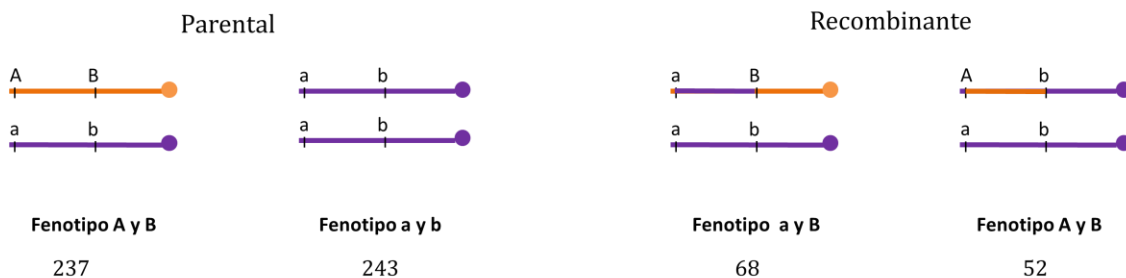
Cruza de prueba



Gametas del heterocigoto:



Progenie



AI.3 Mapeo de dos puntos para genes autosómicos. Los cromosomas encerrados en un círculo representan las gametas formadas por el organismo heterocigoto, las gametas del organismo homocigoto recesivo no se representan porque todas son portadoras de los genes a y b. En la descendencia de la cruce de prueba se representa la progenie resultante de la unión de los gametos del heterocigoto con los gametos del homocigoto recesivo.

Existe un claro sesgo numérico entre las categorías, con un exceso de las combinaciones asociadas a los organismos parentales con fenotipo dominante y recesivo para ambos genes (237 y 248, respectivamente) y un déficit de las categorías con nuevos arreglos o recombinantes ($Ab//ab$ y $aB//ab$, con 68 y 52 individuos, respectivamente), por lo tanto el gen *A* y el gen *B* se encuentran en el mismo cromosoma.

La distancia entre el gen *A* y el gen *B* se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{Distancia entre A-B} = \frac{68 + 52}{600} \times 100 = 20$$

Esto implica que en 20 de cada 100 cromosomas recuperados hubo entrecruzamiento cromosómico, entre los genes A y B, es decir, están separados por 20 unidades de mapa (Figura A1.4).

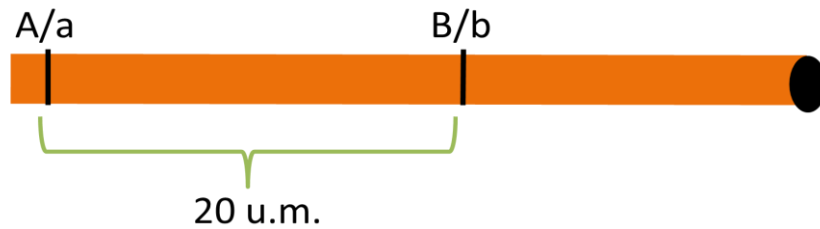


Figura A1.4. Esquema de la distancia entre los genes

Anexo I.4 Mapeo de tres genes.

Una vez que se han determinado las ocho categorías fenotípicas, hay que obtener la frecuencia de recombinación para cada región.

Tabla A1. Número de individuos para cada fenotipo del mapeo de tres genes.

Categoría	Fenotipo	# individuos
Parentales	A, C y B	396
Parentales	a, c y b	383
Recombinantes RI	a, C y B	88
Recombinantes RI	A, c y b	73
Recombinantes RI	a, c y B	28
Recombinantes RI	A, C y b	23
Dobles Recombinantes	A, c y B	4
Dobles Recombinantes	a, C y b	5
Total		1000

En este caso la región I corresponde a la región entre los genes A y C y la región II al espacio entre los genes C y B. Para calcular los entrecruzamientos en la región I se debe sumar el total de dobles recombinantes más el total de recombinantes para esta región.

$$\text{Frecuencia de recombinación entre A- C} = \frac{88+73+4+5}{1000} \times 100 = 17$$

De la misma manera, se debe sumar los dobles recombinantes, más los recombinantes sencillos para la región dos (Avers, 1984; Griffiths *et. al*, 2002; Griffiths *et. al*, 2003; Pierce, 2010).

$$\text{Frecuencia de recombinación entre C-B} = \frac{28+23+4+5}{1000} \times 100 = 6$$

Las frecuencias de recombinación obtenidas representan la distancia que hay entre los genes. La distancia entre A-C es 17um y entre C-B es 6um y la distancia entre el gen A y B es de 23 um (Figura 1.22).

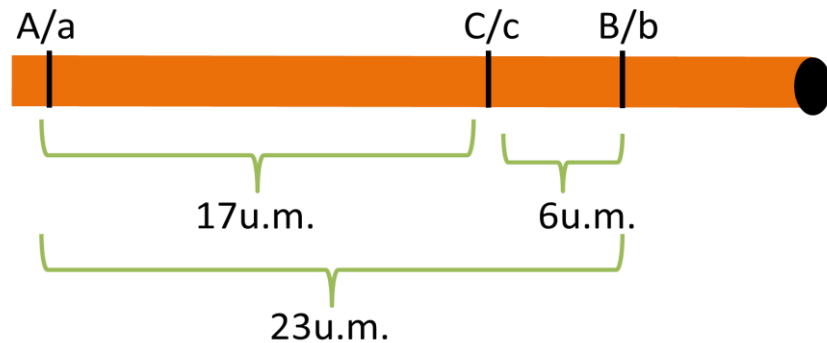


Figura A1.5. Esquema de la distancia entre los tres genes.