

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Biológicas. inéditas



TESIS DOCTORAL

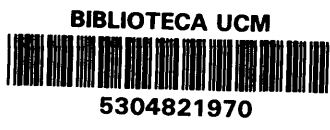
Herencia celular de la determinación en *Drosophila*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ginés Morata Pérez

Madrid, 2015

T 575.17
MOR
her



"HERENCIA CELULAR DE LA DETERMINACION
EN DROSOPHILA"

por

GINES MORATA PEREZ

Memoria presentada a la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas) de la Universidad de Madrid para aspirar al grado de Doctor.

Madrid, Mayo de 1973



R. 19.820

Director de la presente memoria:

Dr. D. Antonio García-Bellido y García de Diego,

Investigador Científico, Jefe de la Sección de
Genética del Desarrollo del Instituto de Gené-
tica y Antropología (C.S.I.C.)

Ponente de la misma:

Prof. Dr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Catedrático de
Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad
Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. García-Bellido, por la continua ayuda, sugerencias y estímulo durante la realización del presente trabajo.

Al Prof. Lacadena por la revisión crítica del manuscrito.

A las Srtas. Amelia Vadillo y Elena Martín por su ayuda en el mecanografiado.

El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Genética del Desarrollo del Instituto de Genética y Antropología (C.S.I.C.), durante el disfrute de una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador.

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	Págs.
A) Control genético del desarrollo	1
B) Mutantes morfogenéticos	5
C) Determinación celular..	8
D) Planteamiento experimental	19
 <u>MATERIAL Y METODOS</u>	 22
 <u>RESULTADOS</u>	
A) Las estructuras cuticulares de Drosophila	34
B) Análisis genético del sistema <u>bithorax</u>	52
C) Análisis celular del comporta- miento mutante	91
D) Respuesta celular al cambio de la información genética	110

.../...

DISCUSION

1) La función del sistema
bithorax 164

2) La expresión genética en
los mutantes del sistema bithorax 171

3) Respuesta celular al cambio
en la información genética.. ... 175

4) Herencia celular de la
determinación 179

RESUMEN Y CONCLUSIONES 185

REFERENCIAS 190

FOTOGRAFIAS 206

I N T R O D U C C I O N

A) CONTROL GENETICO DEL DESARROLLO.

En la mayor parte de los organismos pluricelulares, el individuo adulto se origina a partir de una única célula huevo. Las sucesivas divisiones de esta célula dan lugar a una variedad de células y tejidos que manifiestan muy diversos tipos de diferenciación funcional y morfológica.

Todo el sistema informacional que se conoce en los seres vivos radica en la disposición secuencial de los mononucleótidos de los ácidos nucleicos y por consiguiente toda la información liberada en los procesos de desarrollo tiene su origen en el DNA.

Las alteraciones hereditarias de este DNA, mutaciones, afectan de una forma u otra los procesos de desarrollo. El análisis de este efecto ha sido el sistema clásico de estudio de la Genética del Desarrollo.

Las mutaciones pueden impedir el desarrollo o gran parte de él (mutaciones letales), o bien las viables producen uno o varios síndromes característicos que definen fenotípicamente la mutación.

El análisis de las mutaciones letales en *Drosophila* (Haddorn y Chen 1.952, Rizki 1.952, Oster 1.952, ver revisión en Whright 1.970) ha permitido concluir que la dependencia del producto del gen normal sucede en una etapa específica que puede localizarse en cualquiera de los estadios de desarrollo, dependiendo del gen mutado. En el mismo sentido apunta el análisis de Suzuki y Duck (1.967), llevado a cabo con mutantes letales sensibles a la temperatura.

Este análisis del efecto de la condición mutante, permite concluir que los productos génicos normales funcionan en momentos específicos del desarrollo.

Además de esta especificidad de estadio, muchos productos génicos parecen ser requeridos específicamente en determinados órganos o tipos celulares. Así, se conocen en *Drosophila* varios mutantes que afectan únicamente la pigmentación del ojo como cinnaber, brown, vermilion, etc., otros mutantes afectan al fototropismo o al ritmo circadiano (Kanopka y Benzer 1.971) o afectan estructuras específicas de la cutícula, como los mutantes de la serie scute que impiden la formación de quetas pero no afectan a los tricomas, o múltiple wing hairs que afecta a los tricomas pero no a las quetas (para descripción de todos estos mutantes ver Lindsley y Grell 1.968).

Aún entre los mutantes letales, que en general muestran un síndrome muy generalizado que afecta a varias estructuras, un

análisis cuidadoso (Hadorn 1.961), muestra que en la mayor parte de los casos se puede llegar a una anomalía primaria específica de órgano y de la que derivan las restantes anomalías.

Otros mutantes, por el contrario, deben su acción generalizada a que afectan a procesos muy generales del metabolismo celular. Así, los mutantes bobbed de *Drosophila* producen un efecto generalizado de retraso en el desarrollo, quetas finas, ojos anormales, etc. y se ha demostrado (Ritossa y Spiegelman 1.965) - que representan una deficiencia parcial de DNA, lo que implica - un bajo ritmo de síntesis de proteínas que afecta a todas las células del organismo. En este grupo podrían incluirse aquellos mutantes que afectasen al ritmo de división celular, a la síntesis de enzimas del metabolismo general, etc.

Estos resultados indican que al menos una fracción de los productos génicos que ejercen su función durante el desarrollo son específicos de cada órgano y de cada tipo celular. Así - después, existe especificidad de acción génica a nivel de estadio - de desarrollo y a nivel de cada sistema particular. Esto implica que en cada sistema en desarrollo se utiliza una fracción específica de la información genética total y que esta información se libera en diferentes etapas por medio de la activación génica en diferentes momentos específicos.

Esta conclusión está apoyada además por el análisis molecular de productos génicos a lo largo del desarrollo. Así, por ejemplo, Denis 1.966 ha medido el porcentaje de genoma funcional

en el desarrollo de *Xenopus laevis* y ha encontrado que, como media, solamente el 10% del genoma está siendo transcrito en RNA y que cualitativamente son diferentes las clases de RNAs que van apareciendo en diferentes estadios. A los mismos resultados llega Whiteley et al. 1.966 en el erizo de mar, donde además se encuentran diferencias cualitativas entre los RNAs de diferentes tejidos. A un nivel más específico, Church y McCarthy 1.967 encuentran diferencias cualitativas en los RNAs presentes en diversos estadios de desarrollo del hígado del ratón.

Estos resultados indican que no solamente la función - sino también la síntesis de los productos génicos es específica de estadio y de cada sistema concreto.

B) MUTANTES MORFOGENETICOS.

Se conocen mutaciones cuyo efecto no parece residir en la síntesis de productos necesarios para el metabolismo y función celular, sino que interfieren con la organización y desarrollo de los diversos grupos celulares. La denominación de mutantes morfogenéticos incluye a una variedad de mutaciones que muestran un modo de acción muy diferente y cuya única característica en común parece ser el alterar determinados procesos de desarrollo. - Esta alteración puede dar lugar a una serie de anomalías que pueden afectar a uno o varios de los diversos patrones morfológicos del individuo.

En *Drosophila melanogaster* son conocidos varios mutantes de este tipo, cuyo modo de acción ha sido revisado recientemente (García-Bellido 1.972a). Entre ellos, tenemos mutantes que dan lugar a la supresión de determinadas estructuras de forma específica. Así, en mutantes como cut o Beadex faltan ciertas regiones del margen del ala o en Lobe o Kidney faltan determinados grupos de facetas en el ojo. Dentro de este mismo grupo, los diferentes alelos de scute (Dubinin 1.929) y achaete eliminan determinadas y específicos grupos de quetas y la falta total de scute y achaete (Santamaría, Morata y García-Bellido, en preparación) impiden la formación de quetas.

Otro grupo de mutantes morfo genéticos da lugar a la adición de nuevas estructuras como Hairy wing o hairy, que produ

cen la formación de extraquetas en determinadas regiones de la -
cabeza, notum y ala.

El tercer grupo de mutantes producen alteraciones en -
la organización del patrón morfológico de algunos elementos, al-
terando la orientación de los procesos cuticulares como prickle,
inturned o frizzle o produciendo una desorganización general en
algunos segmentos como dachs o comb gap.

Un último grupo incluye a los mutantes que producen -
una sustitución entre elementos o regiones enteras del cuerpo. -
Forman parte de este grupo los mutantes llamados homeióticos que
hacen aparecer en un segmento o subsegmento dado las estructuras
típicas de otro. Así, Antennapedia da lugar a la aparición de es-
tructuras de pata en la antena, proboscipedia hace aparecer estru-
turas de pata en la proboscis, Ophthalmoptera produce estructuras
de ala en el ojo, los mutantes de la serie bithorax producen di-
versas transformaciones entre las estructuras mesotorácicas y me-
tatorácicas y engrailed transforma en anteriores las estructuras
posteriores de los segmentos torácicos, dorsales y ventrales -
(García-Bellido y Santamaría 1.972). Para una descripción más de-
tallada de todos estos mutantes ver Lindsley y Grell 1.968. El -
modo primario de acción de estos mutantes es desconocido. Se su-
pone (Lewis 1.964) que la función del producto normal de los ge-
nes homeióticos consiste en reprimir en un segmento o subsegmen-
to dado determinados caminos de desarrollo. Así, el producto nor-
mal de Antennapedia impide que las estructuras presuntivas de an-
tena se desarrollen como las de pata o el producto normal de en-
grailed impide que la parte posterior de los segmentos torácicos

se desarrolle como anterior. Es decir, estos genes controlan caminos específicos de desarrollo de los diversos segmentos del cuerpo en *Drosophila*. Puesto que estos mutantes no crean nada nuevo sino simplemente repiten otras estructuras ya presentes en el organismo, es de suponer que los procesos que conducen a la formación de la estructura homeiótica son los mismos que actúan en la formación de la estructura que repiten.

Como veremos a continuación, en el proceso de desarrollo de la estructuras presuntivas (discos imaginales) de las diferenciaciones cuticulares de cada segmento, se van estableciendo una serie de estados de determinación que condicionan la diferenciación prospectiva de cada grupo celular y en su conjunto condicionan el desarrollo de cada disco imaginal. Algunos de estos mutantes morfogénéticos parecen interferir con la expresión de alguno de estos estados de determinación, como es el caso de engrailed, bithorax, scute, etc. Uno de los objetivos del presente trabajo consiste en analizar la relación existente entre la presencia de los productos de algunos de estos genes y el establecimiento de los sucesivos estados de determinación que definen el desarrollo de los discos imaginales en *Drosophila*.

C) DETERMINACION CELULAR.

1) Concepto.

El término determinación es puramente operacional. Se usa generalmente para describir los procesos de programación de una población de células por un camino específico de desarrollo al escoger una entre las varias posibilidades para las que el sistema es competente (Hadorn 1.965). La interpretación más común es que la determinación actúa restrictivamente, presumiblemente activando o reprimiendo ciertas bacterias de genes. No hay, sin embargo, evidencia experimental de lo que en términos moleculares significa la determinación.

Se supone que la adquisición de un estado de determinación tiene lugar a través de un acto o momento de determinación durante el cual en un grupo de células se establece de forma irreversible un camino específico de desarrollo. Sucesivos actos de determinación darían lugar a estados de determinación cada vez más restringidos.

Los discos imaginales de los Insectos muestran una clara distinción entre estructuras determinadas y diferenciadas. Se puede demostrar experimentalmente el estado de determinación aunque la diferenciación no sucede hasta la metamorfosis

y la expresión de este estado de determinación puede retrasarse indefinidamente mediante cultivo de discos o fragmentos de disco. Sólomente cuando se exponen las células a la hormona ecdisona, las células responden con la diferenciación final de un inventario de estructuras cuticulares predecible cualitativa y cuantitativamente.

En algunos aspectos, el término determinación es conceptualmente similar al de "epigenotipo", definido en base al mantenimiento de las características de diferenciación que muestran algunos tipos celulares de vertebrados después de cultivo "in vitro" (ver Cahn, 1.968 revisión). La diferencia estriba en que, - en este caso, lo que manifiesta herencia celular son las características de diferenciación, mientras que en el caso de las células imaginales de *Drosophila*, independientemente del particular estado de determinación que éstas posean, las características diferenciales solamente aparecen después de la metamorfosis inducida por la ecdisona.

Varios criterios operacionales se han utilizado para definir el estado de determinación celular experimentalmente en *Drosophila melanogaster*: 1) Restricción en la diferenciación prospectiva; un disco o fragmento se considera determinado si después de aislado diferencia las estructuras que corresponden a sus posibilidades prospectivas "in situ" o por el contrario, la extirpación de un disco o fragmento de disco resulta en la falta específica correspondiente. 2) Herencia celular; capacidad para re-

producir fielmente un estado de determinación durante muchas generaciones celulares. Puesto que lo que normalmente se cultiva es un disco o fragmento de disco, las conclusiones sobre determinación están limitadas al blastema en conjunto sin referencia a cada una de las células. 3) Análisis clonal; cuando un clon de células marcadas genéticamente comprende varios tipos celulares, se supone que las células antecesoras no estaban determinadas para ninguno de esos tipos celulares en el momento de la iniciación del clon. Estos criterios han sido utilizados en los experimentos que se relatan a continuación

2) Estado de determinación durante el desarrollo de los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.

En la exposición que sigue, vamos a analizar únicamente los datos existentes en *Drosophila melanogaster* debido a que es el material experimental utilizado en el presente trabajo y además del que se dispone -con gran diferencia- mayor información.

En los ginandromorfos producidos por eliminación de un cromosoma X en la primera o una de las primeras divisiones del cigoto, se distinguen, mediante la utilización de mutantes marcadores apropiados, una parte macho (X0) y una parte hembra (XX) y se ha demostrado (Sturtevant 1.929, García-Bellido y Merriam 1.969, Ripoll 1.972) que la línea de separación entre la zona macho y hembra puede pasar entre cualquier par de estructuras cuti

culares. Estos resultados indican que no existe una determinación en las primeras divisiones del cigoto antes de la formación del blastodermo.

Para analizar el estado de determinación de las células en el blastodermo, Chan y Gehring (1.971) realizaron un experimento en el cual disociaron células de la parte anterior y posterior del embrión en el estadio blastodérmico y las mezclaron separadamente con células, marcadas genéticamente, provenientes de embriones enteros. Estudiaron por este sistema las propiedades de reconocimiento específico y diferenciaciones prospectivas de las células de la parte anterior y posterior del blastodermo. Encuentran que las células de la parte anterior producen estructuras de cabeza y tórax, formando mosaico con las estructuras de cabeza y tórax provenientes del embrión entero. Las células de la parte posterior, producen tórax y segmentos abdominales y forman mosaicos con el tórax y segmentos abdominales provenientes del embrión entero. Estos resultados indican que al menos una determinación general para las estructuras epidérmicas anteriores y posteriores, se establecen en el blastodermo.

El análisis del mutante bicaudal (Bull 1.966) también sugiere una determinación inicial para cabeza, tórax y abdomen. Las hembras homocigóticas bicaudal ponen un porcentaje de huevos defectivos, que desarrollan unos embriones con abdómenes dispuestos en imagen especular, faltando las estructuras de notum y ca-

beza, e independientemente del genotipo paterno. Este efecto indica la presencia de factores determinativos en el citoplasma materno.

Los experimentos de fenocopias, sugieren una temprana determinación de los segmentos torácicos. Gloor 1.947 encuentra que con choques de eter se producen transformaciones de metatórax en mesotórax, del mismo tipo de las que producen los mutantes de la serie bithorax. La mayor frecuencia de fenocopias se da en el momento de la formación del blastodermo, sugiriendo una determinación de los diferentes segmentos en este estadio.

Dentro del disco imaginal de ala, los datos de Ripoll 1.972 sugieren que existe en el blastodermo un diferente linaje celular para la parte anterior y posterior del disco. Más recientemente (García-Bellido, Ripoll y Morata en prensa) se ha demostrado la existencia de esta restricción mediante análisis clonal.

Más tarde en el desarrollo del disco imaginal de ala, sucesivas etapas de determinación se han puesto de manifiesto mediante análisis clonal. En las primeras divisiones del disco, se determinan las células presuntivas de notum y de ala (Bryant - 1.970) y dentro del ala, las de la zona dorsal y ventral (García-Bellido y Merriam 1.971a), de tal forma que en los clones inducidos a estas edades no se diferencian sino estructuras de un tipo u otro, pero no de ambos. Estadios de determinación más específicos, se descubren a medida que avanza el desarrollo del disco.

Así, a partir de 40 horas antes de la formación del pupario están ya determinadas las células que van a dar quetas y tricomas (García-Bellido 1.971a) y esa determinación es ya irreversible - unas 24 horas antes de la formación del pupario (Santamaría, Morata y García-Bellido en preparación).

El estado de determinación del disco imaginal de ala al final del desarrollo, ha sido analizado en experimentos de implantación de fragmentos de disco por Hadorn y Buck 1.962. Cada fragmento del disco diferencia después de metamorfosis, regiones específicas del ala, lo que permite la construcción de un mapa morfogénico de la localización de las diferentes regiones presuntivas de las estructuras imaginales.

La capacidad de reconocimiento celular después de disociación también se considera como una prueba experimental de la determinación celular. Nothiger 1.964 demostró que las células de los discos imaginales de ala y genital después de disociación y reagregación manifiestan diferentes afinidades, de forma que las células de ala se segregan de las de disco genital formando estructuras de ala y genitalia separadas, nunca en mosaico. Diferentes fragmentos del disco de ala y pata también muestran reconocimiento específico (García-Bellido 1.966a). Así, los diferentes fragmentos distales y proximales, anteriores y posteriores - del disco de ala manifiestan afinidades celulares específicas de fragmento.

Todos estos experimentos sugieren que al final del desarrollo de los discos imaginales de *Drosophila* se ha alcanzado un alto grado de determinación y los experimentos de disociación indican que este estado de determinación está presente en cada una de las células.

3) Estabilidad del estado de determinación.

La estabilidad del estado de determinación de las células imaginales se puede probar experimentalmente en cultivo "in vivo". Los discos intactos crecen en cultivo hasta alcanzar el tamaño del disco maduro y paran entonces su crecimiento (García-Bellido 1.965). Sin embargo, después de fragmentación, hay regeneración y este proceso puede continuar indefinidamente (Hadorn 1.963). En este sistema, Hadorn 1.966 ha demostrado que las células imaginales pueden mantener su capacidad de diferenciación - después de varios años de cultivo. Las estructuras diferenciadas después de pasar por metamorfosis son las típicas de las células del disco imaginal del que provienen, indicando que existe una herencia celular de la determinación. Así, normalmente las células de disco de ala diferencian estructuras de ala, las células del disco de pata diferencian estructuras de pata, etc.

Sin embargo, Hadorn 1.963, observó que a veces aparecían después de cultivo inesperados cambios en la diferenciación de algunos grupos celulares. Encontraba, por ejemplo, que célu-

las provenientes del disco genital daban lugar no sólo a estructuras de genitalia, sino que también aparecían estructuras de antena y pata que en el desarrollo normal se diferencian a partir de otros discos. El proceso se llamó transdeterminación (Hadorn 1.965) sugiriendo un cambio de la determinación de algunas de - las células del blastema. Las células transdeterminadas seguían manteniendo su nuevo estado de determinación y manifiestan las - afinidades celulares típicas del fragmento transdeterminado (García-Bellido 1.966b).

El mecanismo que conduce a la transdeterminación permanece inexplicado, aunque se sabe que las divisiones celulares parecen ser un prerequisite para la transdeterminación. (Wildermuth 1.968). El análisis clonal mediante mosaicos genéticos - (Gehring 1.967) revela que la transdeterminación no es un proceso clonal, sino que puede ocurrir en un grupo de células simultáneamente.

4) Relación entre determinación e información genética.

Una relación clara entre determinación e información - genética no existe hasta el momento. Sin embargo, existen en Drosophila una serie de datos que indican que la expresión de un estado de determinación está condicionado por la presencia de productos genéticos específicos.

En este contexto, son relevantes los mutantes homei6-
ticos, descritos previamente. La falta de los productos normales
de estos genes se revela ya en un cambio de las propiedades de -
las células del segmento afectado previamente a la diferenciación
final. Así, las células disociadas del disco imaginal de antena
en el mutante Antennapedia se segregan de células del disco de -
antena normal y se reúnen y forman mosaico con las del disco de
pata normal, (García-Bellido 1.968b). Lo mismo sucede en el caso
de engrailed (García-Bellido y Santamaría 1.972) y con los mutan
tes de la serie bithorax (García-Bellido y Lewis en preparación).
Por otro lado, el análisis clonal del ala en el mutante engrailed
muestra que el comportamiento a lo largo del desarrollo del dis-
co mutante de las células de la parte posterior, es similar al -
de las células de la parte anterior y diferente del comportamien
to de las de la parte posterior de un disco normal . Aparentemen
te, la falta del producto génico de engrailed da lugar a que las
células de la parte posterior de los segmentos torácicos adqwie-
ran las propiedades de las células de la parte anterior, proceso
que resulta en la diferenciación final de estructuras típicamen-
te anteriores.

La función del gen engrailed es requerida a lo largo -
de la mayor parte del desarrollo del disco, de tal forma que el
cambio mediante recombinación mit6tica de la condición normal a
la mutante da lugar en las células afectadas a la expresión del
fenotipo mutante independientemente del estadio de desarrollo en
que el cambio genético se produce, excepto si esta misma sustituye

ción se produce muy al final del desarrollo, en que el cambio genético no resulta en cambio fenotípico en las células. Esta falta de respuesta de las células al cambio genético, a partir de un momento dado en el desarrollo, ha sido descrito recientemente en *Drosophila* (García-Bellido y Merriam 1.971c) y el fenómeno introducido en la literatura con el nombre de "perdurabilidad" e indica el momento a partir del cual un producto génico no es necesario en el desarrollo.

Otros productos génicos parecen ser también necesarios para la adquisición de otras propiedades celulares. Así por ejemplo, la falta de los productos génicos de scute y achaete impide totalmente la diferenciación de las quetas sin afectar a la viabilidad celular ni la formación de tricomas (Santamaría, Morata y García-Bellido en preparación). El hecho de que estos productos génicos manifiesten también perdurabilidad indica que no son los responsables de la diferenciación de los productos estructurales de las quetas, ya que dejan de ser requeridos varias divisiones celulares antes de que comience la diferenciación de estas estructuras. Los productos génicos de scute y achaete son probablemente necesarios para los procesos que dan lugar a la determinación a formar quetas por una fracción de las células del disco.

Así pues, parece ser que varios productos génicos son requeridos para la adquisición de los diferentes estados de determinación. La falta, debida a mutación, de cualquiera de estos

productos, da lugar a la aparición en las células de otras propiedades, diferentes a las normales, que definen otro camino de desarrollo y producen un diferente estado de determinación.

D) PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

En la exposición anterior, hemos visto que hay una serie de mutantes en *Drosophila melanogaster* -mutantes homei \acute{o} ticos- que interfieren con los procesos de determinación celular, dando lugar a la aparición en las células de un segmento dado, de las propiedades y características diferenciales típicas de otros segmentos. Entre ellos, los mutantes de la serie bithorax dan lugar a una serie de transformaciones homei \acute{o} ticas entre los segmentos mesotorácico, metatorácico y primero abdominal (ver descripción en Material y Métodos) y por consiguiente sus productos génicos normales son necesarios para el normal desarrollo de cada uno - de estos segmentos (Lewis 1.963, 1.964, 1.967). Las características morfológicas y los parámetros fundamentales del crecimiento de los segmentos afectados se describen en el primer apartado. - (Sección A).

Un aspecto del presente trabajo, es el análisis del papel del sistema bithorax en el control genético del desarrollo - de estos segmentos. El problema experimental que se plantea es, por consiguiente, las características funcionales de los genes - que controlan este desarrollo. En el segundo apartado (Sección - B), se analiza la función de los diversos genes de la serie bi-thorax a través del comportamiento mutante de cada uno de ellos y de las interacciones entre los diversos mutantes.

En el tercer apartado (Sección C), se ha analizado mediante análisis clonal, el comportamiento de las células de los segmentos que presentan transformación homei6tica en algunas combinaciones mutantes como $bx^3 pbx/bx^- pbx^-$ en la cual todas las células manifiestan la transformación homei6tica (esto es, el genotipo $bx^3 pbx/bx^- pbx^-$ presenta una expresividad total) o Cbx/t , que presenta una expresividad parcial, donde solamente una fracci6n de las células del segmento afectado manifiestan la transformaci6n. El análisis del comportamiento mutante permitirá concluir sobre los mecanismos celulares que operan en la transformaci6n homei6tica.

En el cuarto apartado (Sección D), se analiza, a nivel celular, la relaci6n entre determinaci6n e informaci6n genética. Hasta qué punto el mantenimiento de un estado de determinaci6n dado está condicionado por la presencia de determinados productos génicos en cada una de las células. Para ello, se han utilizado mutaciones del sistema bithorax que producen transformaciones homei6ticas de forma recesiva, de manera que la combinaci6n heterocig6tica es normal. Sin embargo, mediante recombinaci6n mit6tica inducida por rayos X se pueden obtener clones (marcados genéticamente) homocig6ticos para el mutante y analizar si el cambio en la informaci6n genética resulta en un cambio en la determinaci6n de la célula afectada. La recombinaci6n mit6tica se puede inducir en todos los estadios de desarrollo.

Estos experimentos nos permitirán analizar la respuesta de las células al cambio genético en diferentes momentos del

desarrollo (diferentes estados de determinación); hasta qué punto la constitución genética de las células, previa al cambio genético, condiciona el desarrollo de sus descendientes en las cuales esta constitución genética ha sido cambiada y cómo una célula aislada es capaz de expresar su nueva constitución genética - en un sistema que manifiesta una información genética diferente.

MATERIAL Y METODOS

1) Mutantes del sistema bithorax.

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes mutantes:

bx³ (bithorax) 3-58,8 Homozigótico viable, recesivo. Origen espontáneo. Es el alelo más extremo conocido en el locus bithorax. Transforma la parte anterior de las estructuras metatorácicas en la parte anterior de las mesotorácicas, produciendo un segundo notum (todo el notum deriva de la parte anterior del disco) en el metanotum y las estructuras anteriores del ala en la parte anterior del halterio. Aparentemente mutación puntual, sin aberración cromosómica visible en los cromosomas politénicos de las glándulas salivares.

Cbx (Contrabithorax) 3-58,8 Homozigótico viable, dominante, localizado a la derecha de bx. Originado por rayos X. Produce una transformación variable de mesotórax en metatorax. En los casos de mejor expresión desapa-

recen las estructuras mesotorácicas que son sustituidas por las metatorácicas, apareciendo moscas con cuatro halterios en lugar de dos. Aparentemente mutación puntual.

Ubx¹ (Ultrabithorax) 3-58,8 Homocigótico letal, localizado a la derecha de Cbx. Origen espontáneo. En heterocigóticos muestran una leve transformación del halterio en ala. Aparentemente mutación puntual.

Ubx¹³⁰ (Ultrabithorax) Homocigótica letal. Originada por rayos X. Asociada a la In (3LR) Ubx¹³⁰ = In (3LR); 74; 89 D-E 93 B; 96 A, con un punto de ruptura en la banda 89 D-E, donde está localizado el sistema bithorax. Fenotipo del heterocigótico idéntico al de Ubx¹/+.

bx^d (bithoraxoid) 3-58,8 localizado a la derecha de Ubx. Homocigótico viable, recesivo. Origen espontáneo. Transforma el primer segmento abdominal en metanotum. También la parte posterior del halterio, parcialmente transformado en parte posterior del ala. Aparentemente mutación puntual.

pbx (postbithorax) 3-58,8 localizado a la derecha de bx.

Homozigótico viable, recesivo. Originado por rayos X. Transforma la parte posterior del halterio en la parte posterior del ala. Aparentemente mutación puntual.

R(pbx) (Regulador de pbx) Originado por rayos X. Localización desconocida. Letal homocigótico. Dominante de baja penetrancia (4,4%). En los casos en que se expresa, presenta una transformación de la parte posterior del halterio en la parte posterior del ala, idéntica a pbx. Aparentemente asociado a una inversión en el brazo derecho del tercer cromosoma.

2) Reordenamientos cromosómicos.

Dp(3) bxd¹⁰⁰ = Dp(3:3) 66C; 89 B5-6-89 E2-3. Obtenida por recombinación proximal en el III L de la Tp(3)bxd¹⁰⁰, originada por rayos X.

Duplicación de las bandas comprendidas entre la 89 B5-6 hasta la 89 E2-3. Lleva el alelo normal de bx, Ubx y Cbx a la subdivisión 66C, en el 3L. Viable y fértil como duplicación.

En el presente trabajo, se han utilizado en experimentos de recombinación mitótica inducida en el III L.

T(1;3) 115 20F; 89 B10-C1; 89E7-11. Originada por rayos X.

Esta translocación lleva el fragmento del III cromosoma comprendido entre 89B10-C1 hasta 89E7-11 a la heterocromatina del cromosoma X, por lo tanto, proximal a 20F. Ha sido localizada por nosotros en el cromosoma X a 10% de recombinación mitótica del extremo izquierdo de la heterocromatina. El segmento translocado lleva todos los genes conocidos del sistema bithorax en forma no mutante. El segregante +; Df115/+ es heterocigótico deficiente para todos los genes del sistema bithorax y es viable aunque estéril tanto en machos como en hembras. En el presente trabajo se ha empleado como fuente de deficiencias para los diversos genes de la serie. Así, el término bx³/ Df115 equivale a bx³/ Df (bx), pbx/Df115 equivale a pbx/Df (pbx), etc.

También ha sido utilizada por nosotros para experimentos de recombinación mitótica en el primer cromosoma.

En la nomenclatura utilizada por nosotros, Df115 se refiere al aneuploide del tercer cromosoma de la translocación, y Dp115 a la duplicación en el cromosoma X.

Dp(1:3)sc^{J4} = Dp(1:3) A 1-B, 61 A

Duplicación de la punta del cromosoma X, ahora ligada al brazo izquierdo del tercer cromosoma. Lleva duplicados entre otros, los alelos normales de y y ac.

Se ha utilizado en este trabajo como marcador celular en combinación con un mutante y en el primer cromosoma. La recombinación mitótica en el III L dará lugar a células que pierden y⁺ de la Dpsc^{J4} y serán ahora y.

3) Mutantes marcadores celulares.

Para los experimentos de recombinación somática, se han utilizado una serie de mutantes marcadores celulares, cuyos parámetros son ya conocidos (García-Bellido 1972b).

y (yellow) 1-0,0 Produce un color amarillo de la cutícula y las quetas. Se utiliza como marcador de quetas.

Foto 1 a.

f^{36a} (forked) 1-56,7 Produce quetas retorcidas. Los tricomas también se alteran siendo más finos y de forma curvada. Foto 1b.

mwh (multiple wing hairs) 3-0,0 Marcador de tricomas, produce varios procesos por células en vez de uno solo.

Foto 1e.

jv (javelin) 3-19,2 Marca solamente las quetas, que toman forma de jabalina. Foto 1e.

Ki (Kinked) 3-47,6 Marcador dominante que afecta solamente a las quetas, que son más cortas y de contorno irregular. Foto 1d. Al ser dominante, todas las quetas son de fenotipo Ki y se detectarán aquellas células que sean Ki⁺.

Sb⁶³ (Stubble) 3-58,2 Marcador dominante de quetas, que son mucho más cortas y redondas que lo normal. Foto 1f. Como en el caso anterior, se detectarán los clones Sb⁺ en fondo Sb⁶³, al ser dominante la mutación.

4) Estirpes genéticas utilizadas.

En los experimentos que se exponen en este trabajo se han utilizado diversas estirpes genéticas, muchas de las cuales han sido sintetizadas por el autor. En total, se han utilizado 18 estirpes que se indican a continuación:

- 1) Df(1)sc⁸; Dpsc¹⁴ Tpbxd¹⁰⁰ red sbd² bx³/TM1
- 2) y; mwh jv red sbd² bx³/TM1
- 3) Dp115; Df115 e¹¹/TM1
- 4) y Dp115; Df115 e¹¹/TM1
- 5) Dp115; Ki Df115 e¹¹/TM1
- 6) y Dp115; Dpsc¹⁴ Dpbxd¹⁰⁰ red Df115 e¹¹/TM1
- 7) Ubx¹³⁰/TM1
- 8) yf³⁶; sbd² bx³ e¹¹/TM1
- 9) yf³⁶; mwh jv Ubx¹ e¹¹/TM1
- 10) y; mwh jv Ubx¹ e¹¹/TM1
- 11) sbd² bx³ pbx e¹¹/TM1
- 12) Sb⁶³/Ubx¹³⁰
- 13) mwh Sb⁶³/Ubx¹³⁰
- 14) bxd e¹¹
- 15) ru pbx^V e ca/T(2;3) ap Xa
- 16) Cbx
- 17) mwh e
- 18) f^{36a}; mwh Sb⁶³/Ubx¹³⁰

5) Técnica de inducción de recombinación mitótica por Rayos X.

Stern (1936), fue el primero en demostrar que la recombinación mitótica ocurre espontáneamente por intercambio de

cromáticas homólogas. La recombinación mitótica puede incrementarse mediante tratamientos experimentales como temperatura (Stern y Rentschelen, 1936; Kaplan, 1953) y radiaciones ionizantes (Patterson, 1929; Friessen, 1935; García-Bellido, 1972b).

En nuestros experimentos, se han utilizado los Rayos X como fuente de incremento de recombinación mitótica a dosis de 1.000 r.

En orden a reconocer los productos de la recombinación mitótica, se han acoplado diversos mutantes marcadores celulares de los ya descritos, con los mutantes morfogenéticos, de tal forma que se puedan reconocer los descendientes celulares de la que verifica la recombinación al manifestar diferencias cuticulares típicas del mutante marcador.

Para el estudio de los mutantes morfogenéticos del sistema bithorax, que es el objeto del presente trabajo, se han realizado dos tipos de recombinación mitótica: En un primer tipo se acopla el mutante morfogenético con mutantes marcadores celulares en forma heterocigótica y mediante rayos X se inducen clones de células homocigóticas al mismo tiempo para el mutante morfogenético y para los marcadores celulares, de tal forma que las células que manifiesten el fenotipo del marcador, serán además de genotipo mutante morfogenético. Este tipo de recombinación se expone en la fig. 1a.

Otro tipo de recombinación utilizada, consiste en inducir clones del mutante marcador en moscas homocigóticas para el mutante morfogenético o bien en moscas normales, cuando interesa estudiar el crecimiento de alguna estructura en particular. Este tipo de recombinación se expone en la fig. 1b.

Dada la variedad de formas de recombinación mitótica y marcadores celulares que se han utilizado en el presente trabajo, los esquemas de recombinación somática en forma simplificada, acompañan a cada uno de los experimentos realizados.

6) Irradiación.

Las irradiaciones han sido realizadas en un aparato de rayos X Philips MG 151 Be, en condiciones de trabajo de 100 Kv. 15 mA, con filtro de 2 mm de aluminio a 20 cm de distancia del cátodo, y a dosis de 300 r/m. Las irradiaciones han sido, salvo cuando se indica otra cosa, de un total de 1.000 r.

A estas dosis, hay muy poca o ninguna mortalidad celular y se detectan muy pocas anomalías que, en general, afectan la diferenciación de algunas quetas, produciendo fenocopias de yellow, strow o Minute cuando la irradiación se verifica muy tarde en el desarrollo del disco. En conjunto se puede afirmar que este bajo porcentaje de anomalías no interfiere en absoluto con los resultados.

7) Tratamiento de las larvas a irradiar.

Las larvas a irradiar se separan del medio de cultivo añadiendo una solución de Cl Na al 10% en agua destilada, en la cual las larvas flotan, separándolas después de la solución mediante un tamiz metálico y disponiéndolas a continuación en pequeñas cajas de plástico transparente a los rayos X, donde se verifica la irradiación.

La edad de las larvas en el momento de la irradiación se ha calculado según el tiempo que necesitan para llegar a la pupación. A medida que pupan, se van separando en series de 8 horas, datándose la edad en horas transcurridas entre la irradiación y la pupación. Esta es la razón de que en muchas de las gráficas de este trabajo la edad se representa en números negativos. En algunos experimentos, la edad de irradiación se ha calculado midiendo el tiempo transcurrido entre la puesta y la irradiación. En todos los casos, los cultivos se mantienen a temperaturas reguladas de 25^o C.

8) Estudio de los adultos.

Para el estudio microscópico, los adultos emergidos se disecan bajo una lupa binocular en alcohol de 70^o separando las estructuras cuticulares pertinentes. Para hacer desaparecer las partes blandas, se cuecen durante 10 minutos en KOH al

10% y a 100° C, lavandolas despues con agua destilada. Posteriormente se disponen sobre un portaobjetos bañado en propanol para impedir que entre aire e inmediatamente despues de eliminar el propanol se monta el cubreobjetos con una gota de euparal o similar.

Para el estudio microscópico, se han utilizado microscopios NIKON Modelo L-Ke. Las fotografías se han realizado con una máquina fotográfica adaptable al microscopio, marca Nikon Microplex EFM. La película utilizada ha sido Plus-X Kodak.

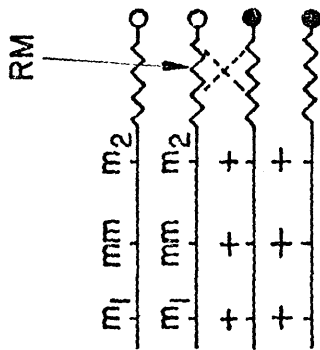
9) Medio de cultivo.

El medio de cultivo de Drosophila utilizado, es un medio standard a base de harina de maiz (50 grs./litro), levadura muerta (100 grs./litro), agar (11 grs./litro) y azúcar (75 grs./litro), disueltos en agua.

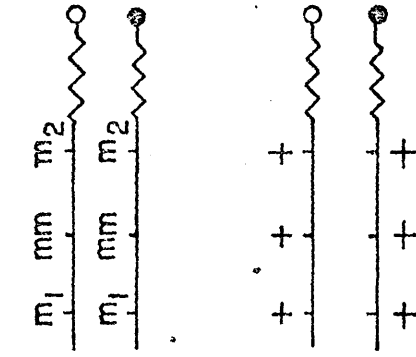
Para prevenir contaminaciones de hongos y levaduras, se añade ácido propiónico al medio en una proporción de 5 cc. por litro de medio de cultivo.

Fig. 1

Tipo a)



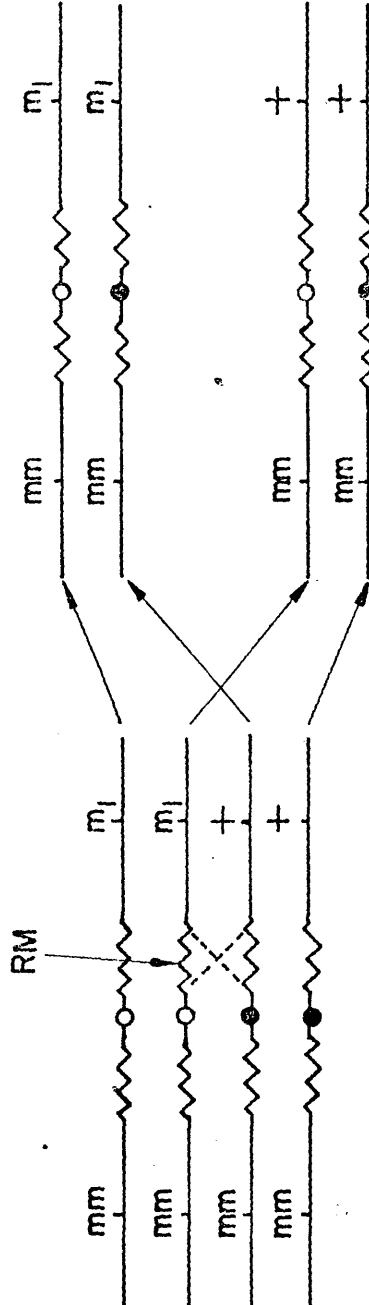
Célula heterocigótica para los mutantes marcadores y morfo genético (en período G2)



Célula homocigótica para los mutantes marcadores y morfo genético (e. período G1)

Célula hermana de la anterior, no marcada (en período G1)

Tipo b)



Célula homocigótica para el mutante morfo genético y heterocigótica para el mutante marcador (en período G2)

Célula homocigótica para el mutante marcador y morfo genético (en período G1)

Célula hermana de la anterior, no marcada (en período G1)

m_1 = mutante marcador
 m_2 = "
 mm = mutante morfo genético

RESULTADOS

A) LAS ESTRUCTURAS CUTICULARES DE DROSOPHILA.

1) Discos imaginales. Caracterización y origen.

El ciclo vital de *Drosophila* presenta tres fases separadas y muy diferentes en su desarrollo. Una fase embrionaria, una fase larvaria (que comprende tres estadios) y una fase imaginal. Estas dos últimas fases se consideran como formas polimórficas más que consecutivas de un proceso normal de desarrollo (Wigglesworth, 1954). Esta interpretación está apoyada por varios hechos: a) los tejidos larvarios constan de células perfectamente diferenciadas; b) las estructuras larvarias (con pocas excepciones) no dan lugar a las imaginales, sino que éstas aparecen a partir de células no diferenciadas hasta la metamorfosis después de la histólisis de la mayor parte de los tejidos larvarios; c) la extirpación de los órganos imaginales no producen ninguna anomalía en el crecimiento y viabilidad larvarios (Zalokar, 1943); d) se conocen mutantes que permiten una perfecta viabilidad larvari y son letales en el estado imaginal (Shearn et al., 1971).

Durante la fase larvaria, las células presuntivas de las estructuras imaginales permanecen en un estado aparentemente embrionario formando los discos imaginales, cuyas células formarán, pasada la metamorfosis, todas las estructuras cuticulares del adulto. Las células de los discos imaginales derivan de una invaginación del ectodermo embrionario. La detección por técnicas histológicas los hace visibles al final del desarrollo embrionario o al principio del primer estadio larvario (Auerbach, 1936),

La dinámica de crecimiento de los discos durante el desarrollo larvario es característica de cada disco. El disco mesotorácico dorsal (disco de ala) crece de forma exponencial durante todo el desarrollo larvario (García-Bellido, 1968; Bryant, 1970; García-Bellido y Merriam, 1971 a). Igual sucede con los mesotorácicos y metatorácicos ventrales (discos de pata, Bryant y Schneriderman, 1969). Sin embargo, las células de los discos imaginales abdominales dorsales no crecen durante la fase larvaria y sólo lo hacen al empezar la pupación (García-Bellido y Merriam, 1971 b).

La metamorfosis comienza debido a estímulos hormonales y las células de los discos se diferencian en las co-

rrespondientes estructuras imaginales, estando el adulto formado por la contribución específica en mosaico de cada disco.

2) Descripción y características de las estructuras cuticulares mesotorácicas y metatorácicas.

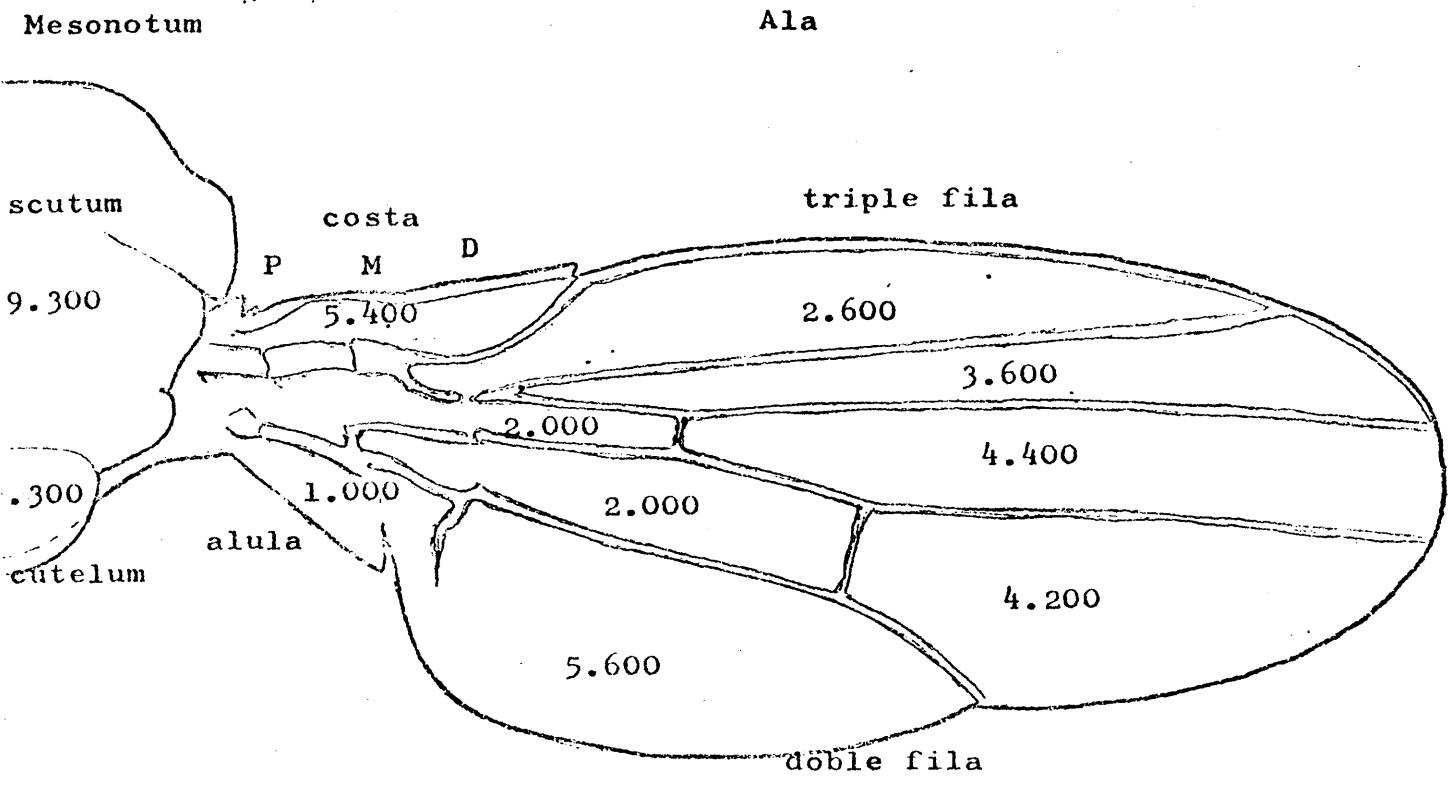
Vamos a referirnos a las estructuras diferenciadas por el disco mesotorácico dorsal, que diferencia el notum y el ala y al disco metatorácico dorsal, que diferencia el metanotum y el halterio, ya que es el análisis de la información genética liberada en estos discos el motivo del presente trabajo.

Las estructuras diferenciadas por el disco mesotorácico dorsal, se expresan esquemáticamente en la figura 2a. El número de elementos de cada región se expresa en la misma figura. Observaciones histológicas (Dobzhansky, 1929; Waddington, 1940) han mostrado que tanto los tricomas como las quetas son simples derivados celulares, de forma que cada proceso cuticular equivale a una célula.

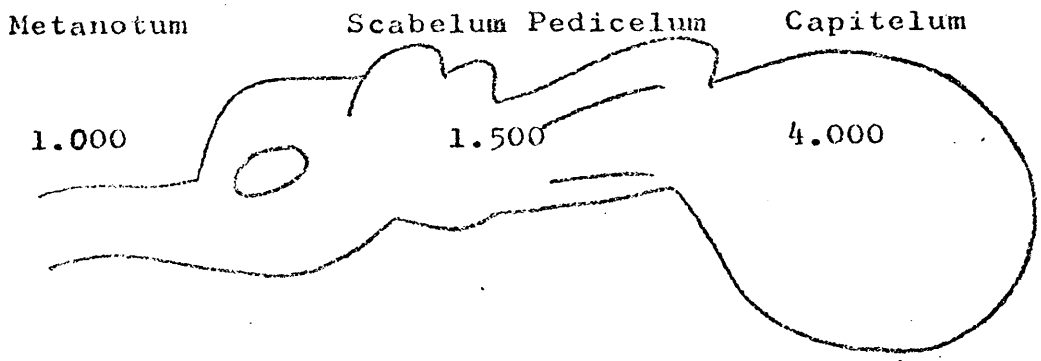
La disposición y el tipo de diferenciaciones muestra diferencias entre regiones, así, el notum presenta unas 100 quetas distribuidas por toda su superficie, mientras el

Fig. 2.- Número de células en las diferentes regiones mesotorácicas y metatorácicas.

a)



b)



ala sólo presenta quetas en el borde. Asimismo, los tricomas del notum están empaquetados más densamente que los del ala.

Las quetas constan de dos elementos, ambos simples derivados celulares, tormógeno y tricógeno. Las quetas del ala forman en la parte anterior una estructura llamada triple fila, formada por tres filas de quetas, dos de origen dorsal y una de origen ventral. La forma y disposición de las quetas en cada una de estas filas es típica y permite distinguirlas aún como elementos aislados. Las quetas de la parte anterior-proximal del ala, llamada costa, son también típicas y distinguibles como elementos aislados. Se distingue entre costa proximal, media y distal. Las quetas de la zona proximal se distinguen de las de la media y distal por la presencia de una bractea, derivado celular epidérmico situado en la base de las quetas. Las quetas de la parte posterior del ala se distinguen por no poseer tormógeno, lo que las hace claramente distinguibles de las de la parte anterior .

El número total de elementos cuticulares del mesotórax dorsal equivale a unos 50.000 en total. El número de células del disco maduro, obtenido en preparaciones micros-

cópicas de discos aislados y teñidos con orceína, da un valor de unas 54.000 células (García-Bellido y Merriam, 1971a), indicando que todas las células del disco dan lugar a elementos cuticulares.

Las estructuras metatorácicas dorsales, metanotum y halterio, muestran una disposición morfológica muy diferente (figura 2b). Han sido cuidadosamente descritas y estudiadas por Loosli (1959). El metanotum está desprovisto de tricomas en su mayor parte, diferenciando sólo cutícula. EL halterio muestra tres regiones claramente delimitadas; el escabelum, el pedicelum y el capitelum.

Es característico de todas estas estructuras, que no diferencian quetas, salvo dos filas de quetas muy pequeñas en número de seis a doce, una en la zona dorsal y otra en la ventral del capitelum. Los tricomas del capitelum son más pequeños y están mucho más empaquetados que los del ala, y los del pedicelum y escabelum lo están aún más que los del capitelum.

El número de elementos cuticulares de cada región está representado en la figura 2b. El número de elementos del capitelum, pedicelum y escabelum es de unos 5.500. El

número de células cuticulares del metanotum planteaba problemas debido a que en la mayor parte no diferencia tricomas sino sólo cutícula. Debido a ésto, este número se ha calculado comparando las frecuencias de recombinación mitótica de esta zona con la encontrada en el escabelum, pedicelum y capitulum. La frecuencia de recombinación del metanotum es aproximadamente igual a la del pedicelum, lo que indica que ambos deben tener el mismo número de células, esto es, unas 1.000. Así, el número total de células cuticulares metatorácicas debe ser aproximadamente 6.500.

Preparaciones microscópicas de células de discos metatorácicos del final del tercer estadio larvario, arrojan un total de 5.000 - 6.000 células, sugiriendo que como en el caso del disco mesotorácico, todas o la gran mayoría de las células se diferencian en estructuras cuticulares.

3) Crecimiento de los discos imaginales mesotorácico y metatorácico.

a) Crecimiento del disco mesotorácico dorsal.

La dinámica de crecimiento de este disco ha sido estudiada recientemente por varios autores (García-Bellido,

1968; Bryant, 1970; García-Bellido y Merriam, 1971a) induciendo mediante rayos X clones marcados genéticamente con los mutantes marcadores y, mwh, y ju en todos los estadios de desarrollo del disco. Las divisiones celulares comienzan a mitad del primer periodo larvario y a partir de este momento el número de células crece de forma exponencial a un ritmo de división de 8,5 horas por ciclo, hasta unas 18 horas después de la pupación en que se realizan las últimas divisiones. El tamaño de los clones iniciados a diversas edades resulta ser aproximadamente igual en todas las regiones del mismo, indicando que el ritmo de división es el mismo para todas las células, independientemente de la región donde se encuentren. El número de células al comienzo del desarrollo viene a ser unas 50 (García-Bellido y Merriam, 1971a; Ripoll, 1972) y el número final de células es de 54.000, lo que indica que son el resultado de un total de 10 divisiones celulares (n° de divisiones = $\frac{\log.54.000 - \log.50}{\log. 2} = 10,1$)

$$\log. 2$$

b) Crecimiento del disco metabóricico dorsal.

1.- Dinámica de crecimiento.

El análisis del crecimiento de este disco mediante recombinación mitótica no había sido realizado hasta el mo-

mento. Mediante disección (Auerbach 1.936) se puede reconocer desde la segunda mitad del segundo período larvario y va aumentando de tamaño hasta llegar a la pupación.

Debido a que las estructuras cuticulares metatorácicas carecen en su mayor parte de quetas, solo se puede llevar a cabo el análisis clonal mediante recombinación mitótica utilizando mutantes marcadores de tricomas como mwh. Además, en algunas regiones como el metanotum gran parte de la cutícula no diferencia tricomas y en otras como el escabelum y pedicelum están muy empaquetados y es difícil reconocer aún los marcadores de tricomas. Por estas razones, solo se han utilizado los datos obtenidos en el capitulum, suponiendo que como en el caso del disco mesotorácico, todas las regiones del metatorácico crecen con el mismo ritmo de división celular.

Se irradiaron larvas de todas las edades de la constitución genética mwh/+, separándolas por edades a medida que llegaban a la pupación. Una vez emergidos los adultos, se montaron para su estudio microscópico y se analizó la frecuencia y tamaño de los clones mwh encontrados en el capitulum. El esquema de recombinación se expo-

ne en la figura 3a. La frecuencia y el tamaño de los clones (medido en número de células) encontrados en las diferentes edades se exponen en la tabla 1 y en la figura 4.

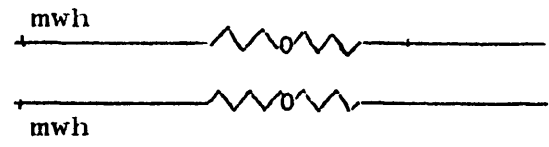
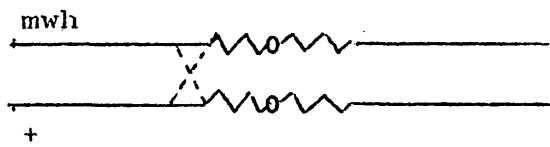
Si la sensibilidad celular es constante, la frecuencia de clones será proporcional al número de células del disco en el momento de la irradiación y la curva de frecuencias nos indica la forma de crecer del mismo. Asimismo el tamaño de los clones será inversamente proporcional al número de células presentes y la curva de tamaños será recíproca a la de frecuencias. La forma de ambas curvas es muy similar a la descrita para el disco imaginal de ala por García-Bellido y Merriam 1.971a, indicando que las células del capitelum (y presumiblemente todo el disco metatorácico) crecen de forma exponencial durante todo el desarrollo larvario. Asimismo la pendiente de la curva de tamaños del capitelum es muy similar a la encontrada por García-Bellido y Merriam en el disco mesotorácico, indicando que el ritmo de división celular es el mismo o muy parecido en ambos discos.

2.- Número de células al principio y al final del desarrollo del disco metatorácico.

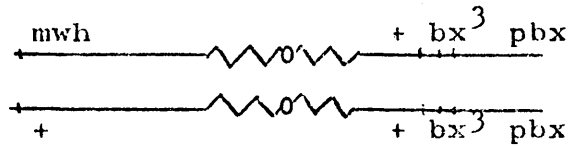
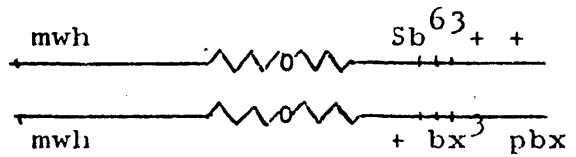
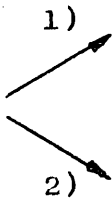
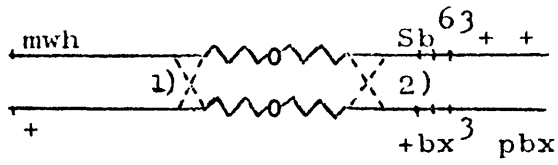
El número de células primitivas de los diversos

Fig. 3

Exp. a



Exp. b

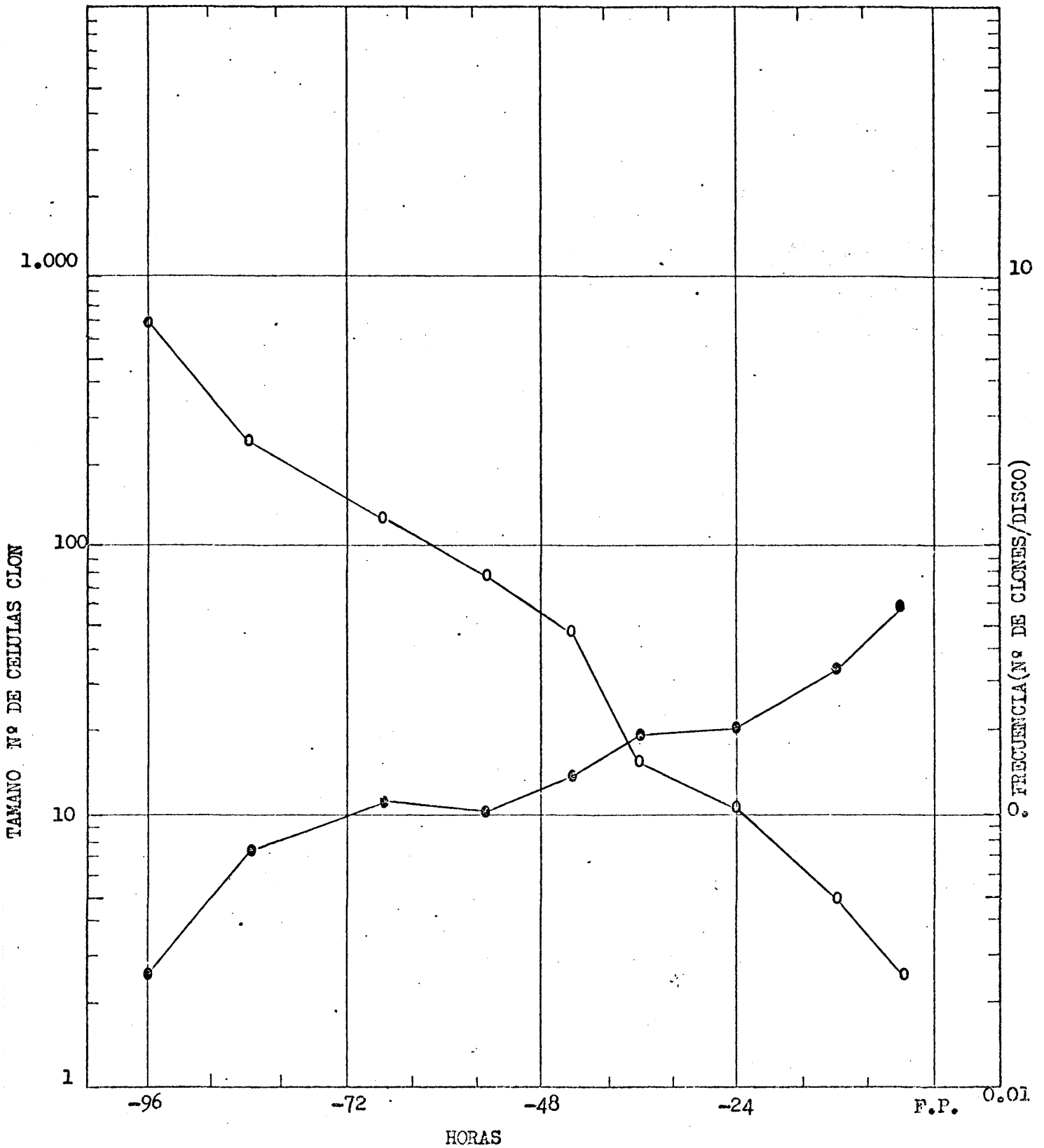


T A B L A 1

Tamaño y frecuencia de clones mwh iniciados a diferentes momentos del desarrollo en el capitulum de moscas de constitución genética mwh e/+, después de irradiación. F.P. comienzo de la pupación.

horas hasta la F.P. des de la irra- diación	nº discos	Frecuencia nº clones/disco	Tamaño nº de células/clon
0-8	52	0,62	2,5
8-16	46	0,36	4,5
16-32	64	0,21	10,8
32-40	48	0,22	13,0
40-48	60	0,13	45,3
48-64	52	0,10	75,6
64-72	56	0,11	122
72-96	54	0,075	250
96-120	120	0,025	700

Fig.4



Representación semilogarítmica de la frecuencia y tamaño de los clones *mwh* a lo largo del desarrollo en el capítulum de moscas de constitución genética *mwh e/t*. ● frecuencia. ○ tamaño. F.P. comienzo de la pupación.

discos imaginales, ha sido calculado mediante la técnica de ginandromorfos (Stern 1.940, García-Bellido y Merriam 1.969, Ripoll 1.972) y también mediante el cálculo del tamaño de los clones inducidos en los primeros estadios de desarrollo del disco (Bryant 1.970, García-Bellido y Merriam 1.971a).

En el caso del disco mesotorácico, el número de células presuntivas del disco en el bastodermo (Ripoll 1.972) es igual al encontrado por García-Bellido y Merriam en el primer estadio larvario, que es de 50 y sugiriendo que las células del disco imaginal mesotorácico no se dividen durante todo el período embrionario hasta entrado el primer estadio.

En el caso del disco metatorácico, el análisis de ginandromorfos no se puede llevar a cabo debido a que los marcadores conocidos en el cromosoma X no son detectables en estas estructuras. Debido a esto, su cálculo se ha realizado mediante el siguiente método: Suponemos que la frecuencia de la recombinación mitótica inducida por rayos X es proporcional al número de células en el momento de la irradiación. Como el número de células al

comienzo del desarrollo larvario del disco mesotorácico es conocido e igual a 50, la relación de frecuencia de clones en ambos discos a esta edad, nos permitirá calcular el número de células primitivas del disco metatorácico.

Para ello se diseñó un experimento en el que se irradiaron grupos de larvas del primer estadio larvario y de constitución genética mwh Sb⁶³/bx³ pbx. En este experimento, (ver figura 3b) dos tipos de recombinación mitótica son posibles: una recombinación en el brazo izquierdo del cromosoma III, lleva a la producción de clones mwh homocigóticos, detectables en todas las estructuras mesotorácicas y en parte de las metatorácicas (capitulum). Por otro lado, una recombinación en el brazo derecho del cromosoma III, lleva a la aparición de clones marcados con Sb⁺, detectables en parte de las estructuras mesotorácicas (mesonotum) y que en principio no serían detectables en el metatorax ya que Sb⁺ solamente marca las quetas. Sin embargo, en este experimento, la condición Sb⁺ va ligada a la homocigosis para los mutantes bx³ y pbx que transforman la parte anterior y posterior del metatorax en parte anterior y posterior de mesotorax respectivamente. Como la manifestación de estos mutantes es

autónoma celular (ver Sección D) y además están localizados muy cerca de Sb⁺, todos los clones Sb⁺ producirán estructuras mesotorácicas en el metatorax que serán grandes y perfectamente detectables. Como además la frecuencia de recombinación mitótica para mwh es la misma que para Sb⁺ (García-Bellido 1.972b), la relación de frecuencias de mwh en el mesotorax y de Sb⁺ en el metatorax inducidas en el primer estadio larvario, nos permitirá calcular el número de células metatorácicas en este estadio.

Los resultados se exponen en la tabla 2. El total de clones mwh en el mesotorax resulta ser 45 y el número de clones Sb⁺ en el metatorax es de 11. La relación de frecuencias $\frac{11}{510}$ será igual a la relación

$$\frac{45}{510}$$

$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células del metatorax}}{\text{n}^\circ \text{ de células del mesotorax}}$, de donde n° de células del

$$\text{metatorax} = \frac{11 \times 50}{45} = 12,2, \text{ es decir el disco imaginal}$$

metatorácico contiene aproximadamente 12 células al comienzo de su desarrollo. Además, la frecuencia de aparición de clones en las diferentes estructuras metatorácicas será proporcional al número de células presuntivas de cada región. De los 11 clones Sb⁺ encontrados en el metatorax, 3 (27,3%) se encontraron en el metanotum,

T A B L A 2

Número de clones Sb⁺ y mwh aparecidos en el metatorax y mesotorax de moscas de constitución genética mwh Sb⁶³/bx³ pbx después de irradiación (1.000 r) al comienzo del primer período larvario.

Tipo de clon	nº de discos	<u>M E S O T O R A X</u>		<u>M E T A T O R A X</u>			total
		mesonotum	ala	metanotum	escabelum pedicelum	capitelum	
Sb ⁺	510	10	-	3	2	6	11
mwh	510	10	35	-	11	-	45

2 (18,2%) en el escabelum y pedicelum y 6 (54,5%) en el capitulum, lo cual indica que el metanotum tiene unas 3-4 células, el pedicelum y escabelum 2-3 y el capitulum tiene 6 del total de 12 presentes al comienzo del desarrollo del disco.

Como ya ha sido indicado, el número de células del final del desarrollo ha sido medido contando el número de células del disco maduro, mediante preparaciones obtenidas en aplastados de discos teñidos con orfeina. Se encontró un total de 5.000-6.000 células.

Según lo anterior, el disco metatorácico pasa de tener 12 células en el primer estadio larvario a tener 5.000-6.000 al iniciarse la pupación. Para ello son necesarias (suponiendo que todas las células se dividan al mismo ritmo) 9 divisiones celulares (n° de divisiones = $\frac{\log. 5.500 - \log. 12}{\log. 2} = 8,9$) en todo el desarrollo larvario que dura 96 horas a 25°C. Como en la primera mitad (12 horas) del primer estadio larvario no hay divisiones celulares (García-Bellido y Merriam 1.971a), el ritmo de división celular sería $84/8,9 = 9,4$ horas por cada ciclo de división, valor similar al obtenido en el disco mesotorácico (8,5 horas).

B) ANALISIS GENETICO DEL SISTEMA BITHORAX

1) Características generales.

En *Drosophila* han sido descritos numerosos ejemplos de series pseudoalélicas. En principio se definen como pertenecientes a una serie pseudoalélica a mutantes que afectan a un carácter determinado, que no complementan o que lo hacen incompletamente, pero que son separables por recombinación meiótica. Son clásicas las series white, donde se han identificado cinco loci (Lewis, 1952; Green, 1959, 1963), la serie lozenge (Oliver, 1940; Green y Green, 1949), la serie Nocth (Welshon, 1958; Welshon y von Halle, 1962), etc.

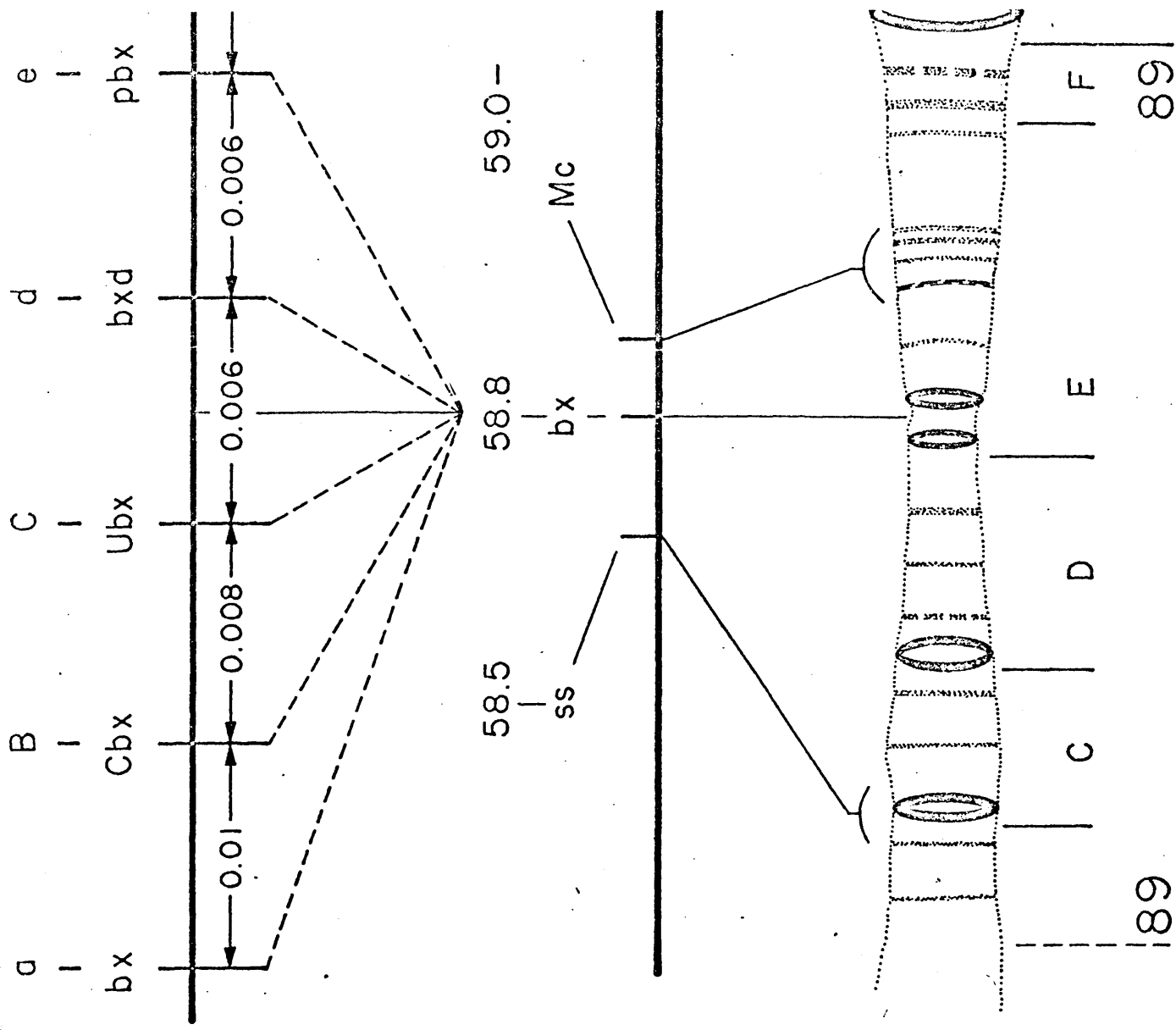
Desde el punto de vista funcional, la significación de estas series pseudoalélicas no está totalmente esclarecida, aunque es indudable que reúnen genes que funcionan de una forma coordinada. Lewis (1967), sugiere que algunas han podido originarse filogenéticamente a partir de pequeñas duplicaciones en tandem del material genético, diferenciándose por mutación posterior en grupos de genes estrechamente ligados, relacionados funcionalmente, pero no

idénticos. Esta interpretación está apoyada en el caso del sistema bithorax por el hecho de que la localización citogenética del sistema es en el duplete formado por las bandas 89E 2-3, sugiriendo una duplicación. .

La serie pseudoalélica bithorax ha sido estudiada desde el punto de vista genético por Lewis (1963, 1964, 1967). Está localizada en el brazo derecho del tercer cromosoma de *Drosophila* a 58,8 unidades de recombinación del extremo del brazo izquierdo y su locación citogenética es en el duplete formado por la banda 89E 2-3 según el mapa de Bridges (1935).

Hasta el momento se conocen mutantes en 5 loci de la serie. La disposición de los diferentes loci y la distancia de recombinación entre ellos se expresa en la figura 5, tomada de Lewis (1964). Las distancias de recombinación meiótica son muy bajas, del orden de 0,005 a 0,01, indicando una gran proximidad entre los diferentes genes.

Lewis (1964, 1967), revisando toda la información disponible del sistema bithorax, ha propuesto un esquema de funcionamiento basado en el modelo de los operones bacterianos (Jacob y Monod, 1961a,b). Según el esquema de Lewis habría tres genes estructurales que serían bithorax (bx),



bithoraxoid (bx^d) y postbithorax (pbx). La función de bx⁺ y pbx⁺ sería la de permitir el desarrollo característico del segmento metatorácico en sus segmentos anterior y posterior, bloqueando el sistema génico de mesotórax. Así, una mutación en bx⁺ o en pbx⁺ lleva a la aparición en el mesotórax de las estructuras mesotorácicas anteriores y posteriores respectivamente (foto 2a, b, c). El gen bithoraxoid tendría una función similar impidiendo la transformación del primer segmento abdominal en metatórax.

Las mutaciones del tipo Ubx son dominantes y presentan en heterozigosis una leve transformación del tipo de bx y pbx (foto 2d); son letales homocigóticas y representarían mutaciones tipo cero del operador (0^0) impidiendo o inhibiendo la transcripción de los genes estructurales en cis.

La única mutación conocida en Cbx⁺, dominante, de penetrancia total y expresividad variable (foto 2e) produce una transformación del mesotórax anterior y posterior en metatórax. La interpretación de Lewis es que representa una mutación de tipo constitutivo del operador (0^c) que derreprime a los estructurales en cis en el mesotórax, donde su función normalmente estaría bloqueada. Esta derreprisión de los estructurales en cis explica (como en el caso

de los mutantes O^c del operon de la lactosa) el carácter dominante de la mutación. Esta interpretación está apoyada además por el hecho de que mutaciones en cis de bx³ con Cbx y de Ubx¹ con Cbx, esto es, bx³ Cbx/++ o Cbx Ubx¹/++ no presentan fenotipo Cbx, indicando que cuando los estructurales en cis con Cbx no pueden funcionar por ser mutantes o por estar impedida su función por otra mutación, la mutación Cbx deja de tener efecto ya que no puede haber síntesis constitutiva de productos normales.

Recientemente, Lewis (comunicación personal) ha encontrado un mutante dominante de baja penetrancia llamado Regulador de pbx (R(pbx)) que no mapea junto a los mutantes del sistema bithorax y que parece comportarse como un regulador de tipo positivo del gen postbithorax. Este mutante ha sido estudiado en detalle por nosotros debido al considerable interés teórico que representaría la mutación de un gen regulador en un organismo eucariote.

Así pues, parece ser que tenemos las formas alélicas de los genes que componen el esquema funcional del operon, un posible regulador (R(pbx)), un operador constitutivo (Cbx), un operador cero (Ubx) y varios estructura-

les (bx, bx_d y pbx).

El sistema bithorax presenta además la característica de que determinados reordenamientos cromosómicos con puntos de ruptura en el sistema o próximos a él, alteran la expresión de algunos mutantes de la serie, produciendo un fenotipo más extremo. Este fenómeno, que sugiere la necesidad de un apareamiento normal de los cromosomas para la correcta expresión génica ha sido llamado por Lewis (1.955) "efecto trans" y hasta el momento solamente se ha descrito en el sistema bithorax.

Tomando como base los trabajos de Lewis 1.963, 1.964, 1.967 y su esquema funcional del sistema bithorax nosotros hemos intentado definir como paso previo al estudio de su comportamiento celular, las características de varias de las mutaciones de la serie y estudiar diversas interacciones entre ellas.

2) Análisis genético de algunos mutantes en los loci bx, bx_d y pbx.

Se conocen en la actualidad tres alelos en el locus bx todos recesivos y viables en homocigosis. Mues-

tran una transformación de la parte anterior de las estructuras metatorácicas en la parte anterior de las estructuras mesotorácicas como ya ha sido descrito. En el presente trabajo se ha estudiado el alelo bx³ que es el que presenta una transformación más completa.

Para la valoración de la mutación, se ha utilizado el sistema de Muller (1.932) que consiste en comparar el fenotipo del mutante homocigótico con el que presentan el mismo mutante enfrentado a la deficiencia del gen. Este sistema permite clasificar los mutantes en amorfos, cuando producen el mismo fenotipo que la deficiencia, lo cual indica que equivalen a la falta total de función del gen, hipomorfos cuando el fenotipo del homocigótico mutante es del mismo tipo pero de menor expresión que el producido por la deficiencia, lo cual indica que el mutante produce cierta cantidad, no suficiente, de producto normal, antimorfos y neomorfos cuando el fenotipo mutante no responde a la falta sino que manifiesta cambios cualitativos, diferentes del producto normal.

Como parámetros de la expresividad del mutante, se ha escogido el número de quetas del mesonotum producto de la transformación del metanotum y el número de quetas

de la triple fila media, producto de la transformación del halterio anterior y se expresa en porcentaje del mesonotum y triple fila media del mesotorax. Del mismo modo se ha valorado la expresividad de la combinación bx³/Df115, siendo la Df115 la total deficiencia del sistema bithorax. (ver Material y Métodos).

Los resultados se exponen en la tabla 3. Como se puede observar, la expresividad de bx³/bx³ y bx³/Df115 es muy parecida, indicando un carácter casi totalmente amorfo del mutante. No obstante, la expresividad de bx³/bx³ es algo menor en el notum (73,2%) que la de bx³/Df115 (84,5%) mientras que es idéntica en la triple fila media, sugiriendo que la expresividad muestra diferencias en las distintas regiones del metatorax.

Las combinaciones de bx³ en trans con los mutantes pbx y bx³, esto es bx³ +/+ pbx y bx³ +/+ bx³ no muestran fenotipo mutante dado el carácter recesivo de todas estas mutaciones. Sin embargo, la combinación bx³/Df115 muestra un leve fenotipo pbx, de expresividad aproximada del 10%, sugiriendo un efecto polar de bx³ sobre pbx⁺. Para comprobar este efecto polar, se sinteti-

Expresividad de las transformaciones homeioticas producidas por los mutantes bx³
pbx y bx³. TFM triple fila media. DF doble fila.

Genotipo	no de discos	Expresividad en el notum	Expresividad en la TFM	Expresividad en el alula	Expresividad en la DF	Expresividad 1º segmento abdominal
bx ³ /bx ³	16	73,2	75,9	-	-	-
bx ³ /Df115	24	84,5	76,2	-	-	-
pbx/pbx	20	-	-	84,0	46,0	-
pbx/Df115	18	-	-	90,2	78,5	-
bx ³ /bx ³	20	-	-	16,0	13,0	100
bx ³ /Df115	20	-	-	56,1	15,2	100
bx ³ /pbx	20	-	-	35,1	13,2	-

zó la combinación Dpbxd¹⁰⁰ Df115/bx³ en la cual se cubre el fenotipo bx³ con la presencia de un bx⁺ localizado en la Dpbxd¹⁰⁰, pero no su posible efecto polar sobre pbx⁺ ya que la Dpbxd¹⁰⁰ no lleva el alelo normal de pbx. En la foto 3 se muestra el fenotipo de estas moscas donde se puede observar la transformación de la parte posterior del halterio, demostrando el efecto polar de bx³ sobre pbx⁺.

En el locus postbithorax solo se conoce una mutación, pbx, que transforma la parte posterior de las estructuras metatorácicas en la parte posterior de las mesotorácicas. La expresividad del homocigótico pbx/pbx y de la combinación pbx/Df115 se ha estudiado evaluando el número de quetas de la parte posterior del ala (doble fila) y comparándolas con el alula y la doble fila mesotorácica normal (tabla 3). El análisis de esta tabla muestra que mientras pbx/pbx presenta una expresividad en el alula muy parecida a pbx/Df115 (84,0 y 90,2 respectivamente), la expresividad es mucho menor (46,0 y 78,5) en la parte posterior del ala indicando que la expresividad es variable dependiendo del genotipo y la región transformada. En conjunto, la expresividad de la combinación pbx/pbx es

menor que la de pbx/Df115 lo cual indica que la mutación pbx es hipomorfica.

La única mutación conocida en el locus bx muestra una transformación del primer segmento abdominal en metatorax con una expresividad del 100%, igual a la de la combinación bx/Df115 (tabla 3). Esta mutación presenta además la característica de manifestar efecto polar sobre el gen inmediato a la derecha que es postbithorax, de forma que las moscas de genotipo bx pbx⁺/bx pbx⁺ son de fenotipo bx y pbx. Este efecto polar se demuestra además por el hecho de que la combinación bx pbx⁺/+ pbx muestra fenotipo pbx pero no bx lo que indica que el alelo normal pbx⁺ en cis con el mutante bx está inhibido en su función.

La valoración cuantitativa del efecto polar de bx se expone en la tabla 3. La expresividad en el ala de la inactivación polar de pbx⁺ en las moscas bx/bx es del 16% y del 13% en la doble fila, valores más bajos que los que se encuentran en la combinación pbx/pbx (84,0 y 46,0 respectivamente) e indicando que este efecto polar es más hipomórfico que el mutante pbx. Esto está apoyado además por el hecho de que la expresividad de la transfor-

mación es mayor en la combinación bx_d/pbx (35,1 en el alula y 13,2 en la doble fila) y mayor aún en la combinación bx_d/Df115 (56,1 en el alula y 15,2 en la doble fila).

3) Análisis genético de algunos mutantes en el locus Ultrabithorax.

Se conocen hasta el momento 5 mutantes en este locus. En heterocigosis manifiestan una transformación muy leve de las estructuras metatorácicas en mesotorax. Todos son homocigóticos letales. En el presente trabajo se han utilizado los alelos Ubx¹ y Ubx¹³⁰.

La mutación Ubx¹ manifiesta fenotipo mutante cuando se enfrenta con bx³, bx_d o pbx indicando que está impedida la normal función de los alelos bx⁺, bx_d⁺ y pbx⁺ situados en cis con la mutación Ubx¹. Es interesante hacer notar que bx⁺ está localizado a la izquierda de Ubx y bx_d⁺ y pbx⁺ a la derecha, indicando que la mutación Ubx¹ afecta a la función de los genes colocados a ambos lados de su posición, es decir, manifiesta efecto polar en dos sentidos.

El análisis cuantitativo de este efecto de Ubx¹

sobre bx³ bx³ y pbx se expone en la tabla 4. La expresividad de la combinación bx³/Ubx¹ es menor que la del homocigótico bx³/bx³ en el notum, mientras es muy similar en la triple fila (comparar con tabla 3) indicando de nuevo que la expresividad distingue entre las diferentes regiones. La combinación pbx/Ubx¹ muestra una expresividad en el alula similar al homocigótico pbx/pbx mientras que en la doble fila es mayor (comparar con tabla 3) manifestando en conjunto una mayor transformación que pbx/pbx, indicando que el efecto polar de Ubx¹ sobre el alelo pbx⁺ localizado a su derecha produce una inhibición de este alelo mayor que la mutación pbx.

La combinación bx³/Ubx¹ muestra una expresividad del 100% en el primer segmento abdominal y además una transformación parcial del metatorax posterior en mesotorax posterior es decir un fenotipo pbx. Este fenotipo está producido por la combinación de dos efectos polares, la inhibición debida al efecto polar de bx³ sobre pbx⁺ y a la debida al efecto polar de Ubx¹ sobre pbx⁺. La expresividad en el alula es del 56,5% y en la doble fila es del 14,3% mayor que la que aparece en el homocigótico bx³/bx³ y menor que el homocigótico pbx/pbx.

Expresividad de las transformaciones homeioticas producidas por las combinaciones de Ubx¹ y Ubx¹³⁰ en trans con los mutantes bx³, pbx y bx^d. TFM triple fila media. DF doble fila.

Genotipo	nº de discos	Expresividad en el notum	Expresividad en la TFM	Expresividad en el alula	Expresividad en la DF	Expresividad 1º segmento abdominal
Ubx ¹ /+	20	1	5	-	-	-
Ubx ¹ /bx ³	20	30,0	68,2	-	-	-
Ubx ¹ /pbx	20	1	5	79,2	72,2	-
Ubx ¹ /bx ^d	20	1	5	56,5	14,3	100
Ubx ¹³⁰ /+	20	1	5	-	-	-
Ubx ¹³⁰ /bx ³	20	86,0	73,3	-	-	-
Ubx ¹³⁰ /pbx	20	1	5	94,6	83,7	-
Ubx ¹³⁰ /bx ^d	20	1	5	53,2	13,3	100

El otro alelo mutante del gen Ultrabithorax estudiado por nosotros es Ubx¹³⁰. Es también letal homocigótico y presenta en heterocigosis una transformación similar a la de Ubx¹. Tiene además las mismas características en cuanto a su efecto polar que Ubx¹ con la diferencia que los fenotipos de sus combinaciones con bx³ pbx y bx^d son más extremos, produciendo los mismos valores de expresividad que la Df115 (tabla 4, comparar con tabla 3) lo cual indica que Ubx¹³⁰ representa la falta de función total del sistema bithorax.

Este fenotipo más extremo se puede interpretar como debido a un mayor efecto polar de Ubx¹³⁰. Sin embargo, esta mutación va ligada a una serie de inversiones en el tercer cromosoma, una de las cuales presenta un punto de ruptura en la región 89E, precisamente donde está localizado el sistema bithorax y sugiriendo que el fenotipo más extremo de las combinaciones que llevan el mutante Ubx¹³⁰ puede ser debido al fenómeno de "efecto trans" descrito por Lewis (1.955).

4) Análisis genético del mutante Cbx.

Solo se conoce en la actualidad una forma mutan-

te en el locus Contrabithorax, es el mutante Cbx. Su fenotipo, que manifiesta expresividad parcial, consiste en una transformación de las estructuras mesotorácicas (esto es, notum y ala) en las metatorácicas (metanotum y halterio). La expresividad celular en este mutante se discutirá más adelante (Sección C).

La interpretación, como ya se ha visto, es que es una mutación constitutiva del operador de un sistema similar al operon bacteriano. Su condición de mutación O^c produce síntesis constitutiva de productos normales de los genes estructurales, de tal forma que estos funcionan en un sistema como el mesotorácico, donde normalmente están reprimidos, produciendo el fenotipo derivado de su función, esto es la supresión del desarrollo típico de segmento mesotorácico y su transformación en metatorax.

Los experimentos realizados por nosotros en cuanto a análisis genético del mutante han ido encaminados a: 1) comprobar el carácter de O^c , y 2) analizar las condiciones de función de los genes estructurales en cis con el mutante.

La condición dominante de un operador constitu-

tivo (Jacob y Monod, 1.961a) deriva del hecho de que la condición mutante produce una función, que en circunstancias normales está reprimida, ya que no es capaz de reconocer al represor. Así pues, el fenotipo del mutante permanecerá invariado independientemente del número de dosis normales presentes. Para comprobar esto en el caso de Cbx, se realizaron una serie de experimentos utilizando combinaciones genéticas con 1, 2 y 3 dosis de Cbx⁺ y 1 dosis de Cbx y analizando el fenotipo de cada una de ellas. Los resultados se exponen en la tabla 5. El fenotipo se valoró según el porcentaje de células del disco de ala que se diferencian como halterio y resulta ser en todos los casos idéntico al del heterocigótico Cbx/Cbx⁺, excepto en el caso del homocigótico Cbx/Cbx, que expresa más fuertemente el carácter Cbx, como era de esperar, ya que en este caso la síntesis constitutiva afecta a los dos cromosomas. El hecho de que las dosis extra de Cbx⁺ no afecten al fenotipo, indica que éste solamente se debe a la actividad del cromosoma que lleva la mutación. Este resultado indica también que los alelos normales de Contrabithorax no producen ninguna función en el mesotórax.

T A B L A 5

Expresividad de la transformación producida por Cbx en presencia de diferentes dosis de Cbx⁺.

Relación dosis Cbx/Cbx ⁺	G e n o t i p o	Expresividad de la transformación en %
2/0	Cbx/Cbx	56,4
1/1	Cbx/Cbx ⁺	39,2
1/2	Dp115;Cbx/Cbx ⁺	41,2
1/3	Dp115;Dpbxd ¹⁰⁰ Cbx ⁺ /Cbx	35,8

Varias combinaciones genéticas se diseñaron para analizar el comportamiento de los genes estructurales en presencia del mutante Cbx. Estos experimentos se basaron en la observación de que a pesar de estar dereprimido el sistema en el mesotorax debido a la mutación Cbx, el fenotipo muy raramente muestra una expresividad total (ver Sección C), lo que hacía suponer que a pesar de estar dereprimido en el mesotorax, pudiera existir cierta hipofunción en los estructurales, relacionada con Cbx.

Se sintetizaron las combinaciones génicas expuestas en la tabla 6. Las combinaciones Cbx/bx³ y Cbx/pbx muestran fenotipos Cbx y ningún otro tipo de transformación, indicando que la síntesis de producto normal de bx⁺, bx^d y pbx⁺ en cis con Cbx es suficiente para mantener este fenotipo normal. Sin embargo, las combinaciones Cbx/Ubx¹, Cbx/Ubx¹³⁰ o Cbx/Df115, manifiestan además del fenotipo Cbx una transformación parcial del metatorax hacia el mesotorax siendo más fuerte en Ubx¹³⁰ o Df115 que en Ubx; debido a la fuerte inhibición que producen ambas mutaciones sobre bx⁺, pbx⁺ y bx^d.

Estos resultados indican cierta hipofunción en el cromosoma Cbx de los genes que controlan la diferenciación de la parte anterior y posterior del halterio, esto es de bx⁺ y pbx⁺.

T A B L A 6

Transformaciones producidas en el mesotorax y metatorax de moscas con diferentes combinaciones genéticas en trans con Cbx.

Genotipo	Transformación Meso → Metatorax	Transformación Meta → Mesotorax	
		Anterior	Posterior
Cbx/bx ³	+	-	-
Cbx/pbx	+	-	-
Cbx/Ubx ¹	+	+	+
Cbx/Ubx ¹³⁰	+	+	+
Cbx/Df115	+	+	+
Cbx/Dpbxd ¹⁰⁰ Df115	+	-	+

El hecho de que esta inhibición sea a ambos lados de Cbx y que además solo se detecten con mutaciones Ubx, o bien en presencia de la deficiencia total (Df115), sugiere que esta inhibición se debe más probablemente a un efecto sobre el alelo Ubx⁺ en cis con Cbx que sobre bx⁺ o pbx⁺. Esta interpretación está apoyada además por el hecho de que las moscas de genotipo Dpbx¹⁰⁰ Df115/Cbx no muestran transformación en la parte anterior del halterio y sí en la parte posterior. Como en este caso, la Dpbxd¹⁰⁰ lleva los alelos bx⁺, Cbx⁺ y Ubx⁺ es claro que la presencia de bx⁺ en la duplicación suprime la transformación anterior. Sin embargo, la presencia de Cbx⁺ y Ubx⁺ no salva la transformación posterior, indicando que esta se debe a un efecto polar sobre el alelo pbx⁺. Esto es, Cbx presenta efecto polar en dos sentidos, del mismo tipo del que presentan las mutaciones en Ubx⁺.

Así, la expresividad parcial del fenotipo Cbx parece ser debida a una hipofunción del Ubx⁺ en cis, que a su vez altera la función de bx⁺ y pbx⁺.

5) Características y análisis genético del mutante R(pbx).

El mutante R(pbx) es dominante, letal homocigótico,

de penetrancia parcial y expresividad variable.

La mayor expresión del genotipo produce un fenotipo idéntico al del mutante pbx. La producción de este fenotipo idéntico al de pbx por una mutación localizada en un locus diferente, es difícil de explicar. Lewis (comunicación personal) supone que puede representar un gen que regule la función de pbx⁺, sería un gen regulador (la notación del mutante R(pbx) alude a esta posibilidad). Otra posibilidad sería simplemente un efecto pleiotropico de R(pbx) sobre pbx⁺. En este caso es, de todas formas, difícil de explicar la especificidad de este efecto.

Los experimentos que se han diseñado en el presente trabajo han ido encaminados a 1) caracterizar el mutante y 2) analizar su relación con el sistema bithorax.

Al iniciar este trabajo, ya se sabía (Lewis comunicación personal) que el mutante está localizado en el brazo derecho del tercer cromosoma y aparentemente relacionado con una inversión en el mismo brazo. La presencia de esta inversión ha sido confirmada por nosotros en experimentos en los que se ha analizado el porcentaje de recombinación meiotica entre "Kinked" (Ki, 47,6 localizado en el brazo derecho del tercer cromosoma)

y "ebony" (e, 70,7 también en el brazo derecho del tercer cromosoma). El porcentaje de recombinación de estos dos mutantes, puestos en trans con R(pbx), resulta ser del 2,5%, cuando lo esperado sería $70,7 - 47,6 = 23,1$ %. Este resultado y el hecho de que no aparezca ningún recombinante que lleve en cis R(pbx) y e o Ki, indica la presencia de una inversión en brazo derecho del tercer cromosoma y además que R(pbx) está posiblemente localizado en el segmento invertido. Por esta razón no se puede dar su localización exacta.

En cuanto a la caracterización fenotípica, muestra en la línea balanceada en que se mantiene el mutante una frecuencia de transformación del 8,9 % por mosca. En el 90% de los casos, la transformación pbx sólo afecta a uno de los dos halterios, por lo cual la penetrancia por disco (frecuencia de manifestación por disco) es 4,4%. Este valor no se altera a diferentes temperaturas ni cambiando de medio genotipo (tabla 7), sugiriendo que depende exclusivamente de las características de la mutación.

En otra serie de experimentos, se estudiaron los valores de penetrancia de R(pbx) en diversas combinaciones genéticas con mutantes del sistema bithorax. El objetivo primor-

T A B L A 7

Penetrancia de R(pbx) en diferentes condiciones ambientales y genotípicas.

Genotipo	nº de discos	Temperatura °C	Penetrancia en % por disco
R(pbx)/Xa	332	17	4,2
R(pbx)/Xa	986	25	4,4
R(pbx)/Xa	418	29	4,4
R(pbx)/TM1	270	25	4,8
R(pbx)/Sb ⁶³	212	25	4,7
R(pbx)/TM1 ⁹	322	25	4,6

dial era demostrar la relación del mutante R(pbx) con la serie bithorax y en caso afirmativo, identificar que locus era el que funcionalmente estaba relacionado con él. En todos los casos realizados, se recogieron en la F₁ dos tipos de individuos, unos que llevaban R(pbx) con el mutante de la serie bithorax y otros que llevaban R(pbx) sobre el cromosoma normal. La penetrancia de esta última combinación se utilizó de control. Los resultados se exponen en la tabla 8.

En la primera parte de esta tabla, se expone la penetrancia de R(pbx) en combinaciones genéticas con 1, 2 y 3 dosis de pbx⁺. Mientras los resultados con 1 y 2 dosis son muy parecidos, la penetrancia con 3 dosis es cero, indicando, que la dosis extra de pbx⁺ es capaz de salvar el fenotipo mutante. Estos resultados indican que la función de R(pbx) está relacionada con el sistema bithorax.

En la segunda parte de la tabla, se muestra la penetrancia de R(pbx) en combinaciones con varios mutantes del sistema bithorax. La penetrancia en presencia de pbx no es significativamente diferente de la del control, mientras que es cero en combinación con Cbx. Este resultado es interesante desde que hemos visto en el apartado anterior que Cbx muestra

Penetrancia de R(pbx) en diversas combinaciones genéticas.

Genotipo	dosis de pbx ⁺	nº de discos	Penetrancia %	Penetrancia control %	nº de discos control
R(pbx)/Df115	1	216	5,6	4,6	322
R(pbx)/+	2	270	4,8	—	—
Dp115;R(pbx)/+	3	434	0,0	4,6	322
R(pbx)/pbx	1	142	5,0	3,5	140
R(pbx)/Cb ^x	2	284	0,0	4,8	270
R(pbx)/Ub ^{x1}	2	482	6,6	3,0	208
R(pbx)/Ub ^{x130}	2	192	10,4	4,7	212
Dp115/+;R(pbx)/Df115	2	420	0,5	4,6	322

insuficiencia en la función de pbx⁺ y no habiendo por lo tanto exceso de función de pbx⁺ e indica que R(pbx) necesita la presencia del alelo normal de Cbx para manifestarse, lo cual sugiere una relación entre ambos genes. La penetrancia en presencia de Ubx¹ o Ubx¹³⁰ es superior a la de los controles, aunque la diferencia no es muy notoria. Si es, sin embargo, muy significativa la baja penetrancia de las moscas de constitución Dp115/+; R(pbx)/Df115, la única diferencia es que en esta constitución genética, una de las dosis de pbx⁺ está presente en el fragmento traslocado (Dp115) al primer cromosoma. Como además, por el análisis de recombinación meiótica hemos visto que R(pbx) está relacionado con una inversión en el brazo derecho del tercer cromosoma, es posible que el fenotipo de R(pbx) se deba a un insuficiente apareamiento en la región del sistema bithorax. Esta falta de apareamiento daría lugar a un fenómeno de "efectos trans" del tipo descrito por Lewis 1.955. En aquellas combinaciones en que halla una dosis de pbx⁺ que no esté involucrada en los reordenamientos debidos a la inversión, como sería el pequeño fragmento traslocado al primer cromosoma en las moscas Dp115/+; R(pbx)/Df115, la función normal de esta dosis de pbx⁺ salvaría el fenotipo mutante de R(pbx).

6) La deficiencia del sistema bithorax.

En el presente trabajo, se ha dispuesto de una trans-

locación del tercer cromosoma al primero que lleva todos los genes conocidos del sistema bithorax. Se la conoce como T(1:3) 115. El hecho de que los alelos normales estén en el primer cromosoma, permite la ventaja operacional de conseguir una aneuploidia para el sistema bithorax por cualquier cruce que se haga con la T(1:3) 115 vía macho y cruzado por hembras de cualquier tipo que no llevan duplicaciones para el sistema bithorax. Como translocación simple es letal probablemente debido al punto de ruptura de la izquierda, ya que la presencia simultánea de la Dp bxd¹⁰⁰, que cubre el punto de ruptura de la izquierda, salva la letalidad.

La deficiencia para el segmento traslocado al primer cromosoma es letal, así como lo es también la deficiencia para toda la parte distal de la deficiencia que no está cubierta por la Dp bxd¹⁰⁰. Así pues, no se puede analizar el fenotipo de individuos homocigóticos para la deficiencia de la serie bithorax. Asimismo es letal sobre los mutantes letales homocigóticos del sistema (Ubx¹ y Ubx¹³⁰) y muestra fenotipo mutante con los viables. Tanto la letalidad como el fenotipo mutante, se salva por la presencia del fragmento traslocado al primer cromosoma. La T(1:3) 115 es una translocación pequeña cuyo punto de ruptura de la izquierda en el tercer cromosoma está entre la banda 89B10

y la 89C1 y el de la derecha se desconoce pero es proximal a Microcephalus (situado en el intervalo 89E7-11).

El análisis de recombinación meiotica revela que el fragmento traslocado al cromosoma X está localizado en cualquier punto de la heterocromatina, ya que no recombina con marcadores colocados a la derecha del centromero como la Dpsc^{v1} (y^+) y la distancia de recombinación con respecto de f³⁶ es la misma que la de "bobbed", localizado en la heterocromatina. El análisis de recombinación mitótica revela también que está localizado en la heterocromatina a un 10% del extremo izquierdo de este y a 90% del centromero.

Comportamiento de la Df115 en células somáticas.-

Como hemos visto, el desarrollo de varios segmentos de *Drosophila melanogaster* está controlado por el sistema bithorax. Existe la posibilidad, además, que este control afecte a varios otros segmentos por medio de productos génicos conocidos en forma mutante.

Una forma de estudiar la función de todo el sistema bithorax es estudiar su deficiencia y los tipos de estructuras cuticulares cuyo desarrollo, está alterado en estas condiciones. Como ya hemos visto la T(1;3) 115 permite obtener un prin-

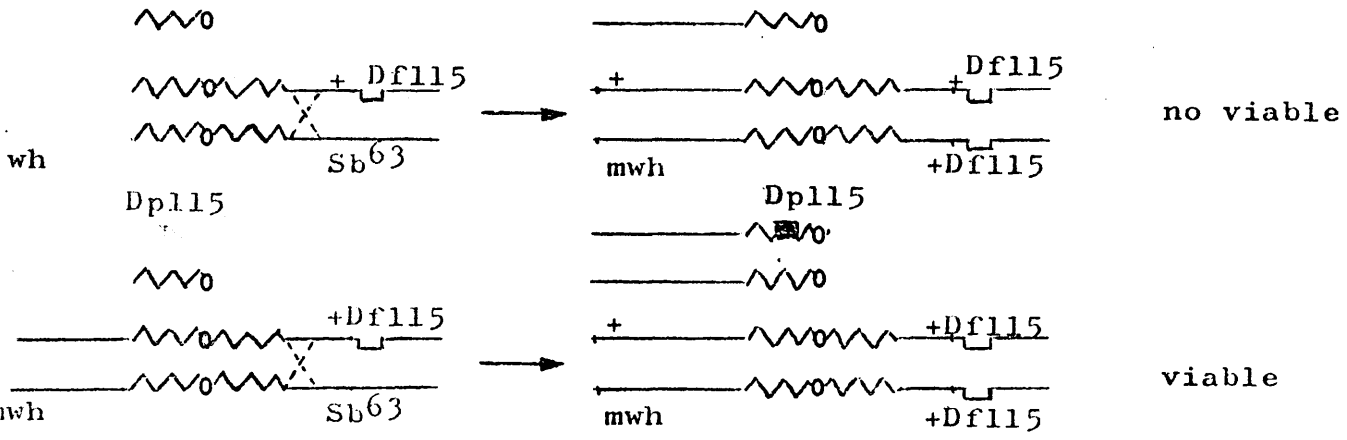
cipio individuos deficientes para el sistema bithorax, pero estos individuos son letales. Sin embargo, la letalidad en individuos no presupone necesariamente letalidad celular (Demerec 1.936, Ripoll y García-Bellido 1.973) y mediante los rayos X se pueden inducir clones de células homocigóticas para la Df115 en individuos viables heterocigóticos y estudiar la manifestación de la deficiencia del sistema bithorax en células aisladas en el caso de que estas células sean viables.

Así pues, se irradió la F_1 del cruce 1 indicado en la figura 6. El mutante marcador Sb⁶³, dominante, se dispone en trans con la Df115, de tal forma que los clones homocigóticos para la Df115, lo serán para Sb⁺, detectable en quetas. Como control interno de la irradiación, se estudió la frecuencia de recombinación del brazo III izquierdo mediante el mutante marcador mwh.

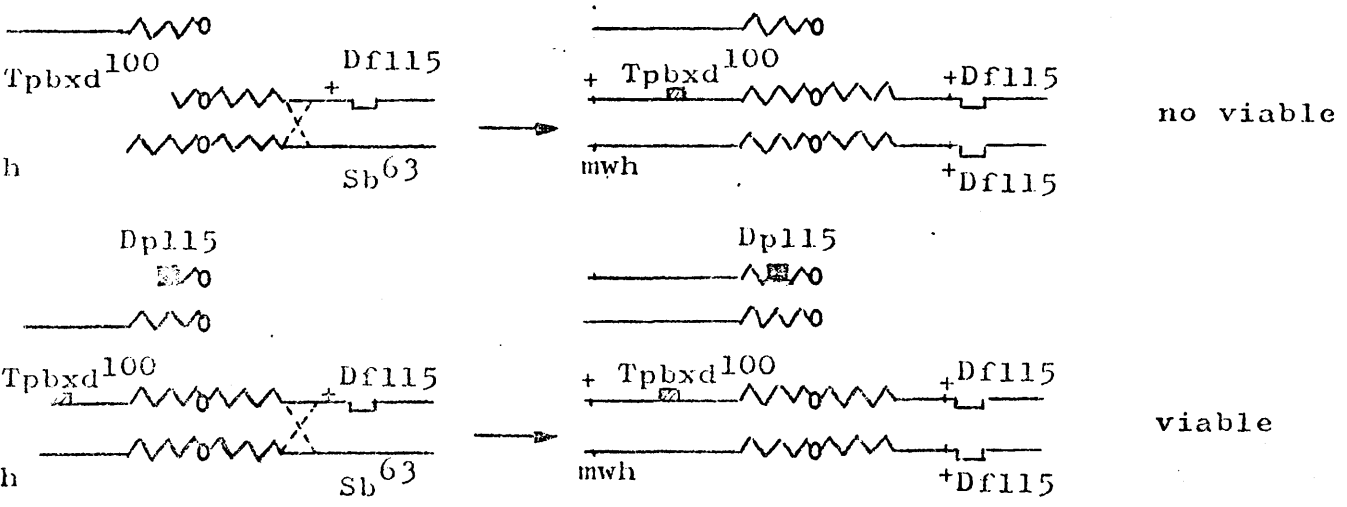
Se analizaron los clones encontrados en los segmentos torácicos y abdominales de los machos de la F_1 mwh Sb⁶³/Df115 y de las hembras hermanas Df115/+; mwh Sb⁶³/Df115. En el primer caso, una recombinación proximal a Sb⁶³, producirá un clon de células Sb⁺ que serán homocigóticas para la Df115. En las hembras, el mismo tipo de recombinaciones producirán un clon

Fig. 6

Cruce 1



Cruce 2



Sb⁺ pero donde la Df115 está cubierta por la Dp115 translocada al primer cromosoma y por lo tanto estas células no serán deficientes.

Ningún clon Sb⁺ fué encontrado en los machos mwh Sb⁶³/Df115 en ninguno de los segmentos torácicos o abdominales mientras que se encontró la frecuencia normal de recombinación para mwh, (indicando que se había producido recombinación mitótica). Los resultados para los segmentos abdominales dorsales (terguitos) se exponen en la tabla 9 donde además se muestra que en las hembras Dp115/+; mwh/Sb⁶³/Df115 si se detectan clones Sb⁺ con una frecuencia de 0,23 para abdomen siendo la frecuencia de mwh muy parecida para machos que para hembras (0,39 en machos, 0,43 en hembras). Estos resultados indican que la Df115 es letal celular, al menos en clones iniciados durante el desarrollo larvario.

Sin embargo, la Df115 comprende otros genes además de los del sistema bithorax, ya que suponiendo su punto de ruptura de la izquierda 89C1, el sistema bithorax está localizado en 89E2 y entre ambos puntos quedan al menos 6 bandas y la falta de alguno de los genes comprendidos en estas bandas podrían ser el responsable de la letalidad celular.

T A B L A 9

Valores de recombinación mitótica detectados en los terguitos de machos $mwh\ Sb^{63}/Df115$ y de hembras $Dp115/+; mwh\ Sb^{63}/Df115$. FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde irradiación	Número de abdomenes macho		Frecuencia		Número de abdomenes hembra		Frecuencia	
	mwh	Sb^{+}	mwh	Sb^{+}	mwh	Sb^{+}	mwh	Sb^{+}
0-24	21	0	0,14	0,0	18	0	0,16	0,11
24-48	18	0	0,37	0,0	35	0	0,54	0,26
48-72	30	0	0,46	0,0	21	0	0,47	0,28
72-96	12	0	0,66	0,0	-	0	-	-
Total	81	0	0,39	0,0	74	0	0,43	0,23

Para analizar experimentalmente esta posibilidad, se realizó un experimento en el cual se irradiaron larvas de constitución genética Dpbxd¹⁰⁰ Df115/mwh Sb⁶³ y Dp115/+; Dpbxd¹⁰⁰ Df115/mwh Sb⁶³ cruce 2, figura 6. En este experimento toda la región de la Df115 comprendida entre 89C1 y el locus de Ubx⁺ estaría cubierta por la Dpbxd¹⁰⁰ y cubriría por lo tanto cualquier posible letal celular en esta zona.

Así, los clones Sb⁺ indicarán la presencia de células deficientes para los genes distales a Ubx de la Df115. Como control de la irradiación, se estudiarán los clones mwh que no van asociados a la Df115. Los resultados para los segmentos abdominales se exponen en la tabla 10. Ningún clon Sb⁺ se encontró en ninguna de las estructuras cuticulares de los machos Dpbxd¹⁰⁰ Df115/mwh Sb⁶³, indicando la presencia de un carácter letal celular distal al locus Ubx. La frecuencia de recombinación mitótica es sin embargo normal para mwh en estos mismos individuos (0,50 clones/abd). Por otro lado, las hembras hermanas Dp115/+; Dpbxd¹⁰⁰ Df115/mwh Sb⁶³ muestran una frecuencia de recombinación mitótica para Sb⁺ normal (0,36 clones/abd), indicando que el factor letal está cubierto por la Dp115, aunque no por la Dpbxd¹⁰⁰. Así pues, este factor letal celular nos impide estudiar el comportamiento de la deficiencia del

T A B L A 10

Valores de recombinación mitótica detectados para mwh y Sb⁺ en los tergutitos de machos mwh Sb⁶³/
Dpbd¹⁰⁰ Df115/+; mwh Sb⁶³/Dpbd¹⁰⁰ Df115. FP comienzo de la pupación.

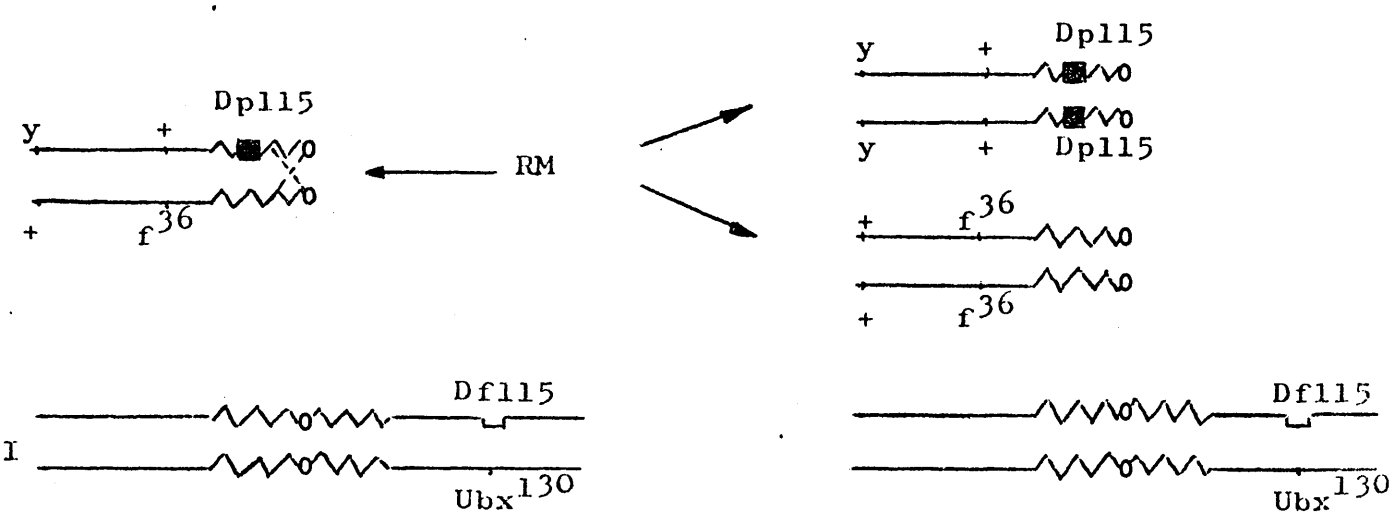
Horas hasta FP desde irradiación	Número de		Frecuencia		Número de		Frecuencia	
	abdomenes macho	abdomenes hembra	mwh	Sb ⁺	abdomenes macho	abdomenes hembra	mwh	Sb ⁺
0-24	17	27	0,42	0,0	27	0,77	0,48	0,23
24-48	13	13	0,53	0,0	13	0,46	0,23	0,28
48-72	16	14	0,44	0,0	14	0,50	0,28	-
72-96	12	-	0,66	0,0	-	-	-	-
Total	58	54	0,50	0,0	54	0,63	0,36	-

sistema bithorax.

Sin embargo, por lo que hemos visto, existe una mutación, Ubx¹³⁰, que se comporta en todos los experimentos realizados produciendo un fenotipo idéntico al de la deficiencia total del sistema (Df115). Toda vez que aparentemente no hay pérdida de material genético, esta mutación representa la deficiencia funcional (no física como en el caso de la Df115) de todos los genes conocidos del sistema bithorax y posiblemente pueda actuar también sobre todos o alguno de los no conocidos en forma mutante.

Para analizar esta hipótesis, se diseñó un experimento en el cual se irradiaron larvas de todos los estadios de constitución genética y Dp115/f³⁶; Df115/Ubx¹³⁰ (figura 7). En estas larvas, una recombinación mitótica en el cromosoma X proximal a la Dp115, dará lugar a dos tipos de células cuyos descendientes son identificables en la cutícula. Uno de ellos será de constitución genética f³⁶; Df115/Ubx¹³⁰ marcada con el mutante f³⁶ representa células genéticamente deficientes para el sistema bithorax. La célula hermana será de constitución y Dp115/y Dp115; Df115/Ubx¹³⁰, perfectamente euploide, llevando dos dosis normales del sistema bithorax y marcada con el mutante y. Este segundo tipo de clones ha sido utilizado como con-

ig. 7



Localización de los clones f^{36} Df115/Ubx ¹³⁰ .	Tipo de estructuras cuticulares diferenciadas
Mesotorax	Mesotorax
Metatorax	Mesotorax
1er. seg. abd.	Mesotorax
2º " "	2º seg. abd.
3º " "	3º " "
4º " "	4º " "
5º " "	5º " "
6º " "	6º " "
7º " "	7º " "

trol del comportamiento de los del primer tipo.

El comportamiento de los clones f³⁶ en las estructuras cuticulares meso, metatorácicas y abdominales revela que las células de constitución genética Df115/Ubx¹³⁰ (combinación letal en individuos) son perfectamente viables de forma que el tamaño de los clones f³⁶ es el mismo que el tamaño del clon hermano de constitución genética y Dp115 Df115/Ubx¹³⁰ (viable en individuos).

El comportamiento de las células, sin embargo, revela la deficiencia genética del sistema bithorax. Así, los clones inducidos en el metatorax anterior se diferencian en mesotorax posterior, los inducidos en el metatorax posterior se diferencian en mesotorax posterior, mientras que los inducidos en el mesotorax se diferencian como clones mesotorácicos normales (figura 7).

Estos resultados indican que la función del sistema bithorax es necesaria para el normal desarrollo del metatorax mientras esta información no es aparentemente necesaria en el mesotorax. Este resultado era de esperar desde que sabemos que la constitución genética Df115/Ubx¹³⁰ es mutante para el gen bithorax (que controla el desarrollo del metatorax posterior) y

para el gen postbithorax (que controla el desarrollo del metatorax posterior).

Los resultados obtenidos en el abdomen muestran que la falta de función del sistema no afecta la diferenciación de los clones inducidos en ningún segmento abdominal excepto el primero. En este segmento se ha encontrado una frecuencia normal de clones y y ningún caso de clones f³⁶; Df115/Ubx¹³⁰. Como veremos más adelante (Sección D) este resultado muy probablemente indica una transformación de primer segmento abdominal en mesotorax.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la combinación Df115/Ubx¹³⁰ equivale a la falta de función de los genes bithorax, postbithorax y bithoraxoid, sin que aparentemente se detecte la falta de ningún otro producto génico que controle el desarrollo de otros segmentos como aparece indicar el descubrimiento de Lewis 1.968 del mutante Ultraabdominal (que transforma el 2º segmento abdominal en 1º). No se puede desechar sin embargo la posibilidad de que el efecto polar de Ubx¹³⁰ solamente afecte hasta el gen postbithorax.

C) ANÁLISIS CELULAR DEL COMPORTAMIENTO MUTANTE

1) Crecimiento del disco de ala metatorácico en los mutantes bx³ y pbx.

Como ya hemos visto, el disco metatorácico normal tiene una deínamica de crecimiento muy parecida al disco mesotorácico. La diferencia principal estriba en que el número de células es menor, empezando en 12 células al comienzo del desarrollo, para acabar en 5.000-6.000 al llegar la pupación. El disco mesotorácico comienza el desarrollo con unas 50 células y posee 50.000 en la pupación.

En el caso de los mutantes bx³ y pbx, la doble combinación mutante da lugar a la transformación del segmento metatorácico en el mesotórax, de tal forma que estas moscas poseen dos tóraces y 4 alas y no poseen metanotum ni halterio. Los tipos de diferenciaciones cuticulares y la morfología que presenta este segundo mesotórax son idénticos a los del mesotórax normal (foto 4).

Para analizar experimentalmente las propiedades de las células de este disco mesotorácico producido en el metatórax por los mutantes bx³ y pbx, se diseñó un experimento

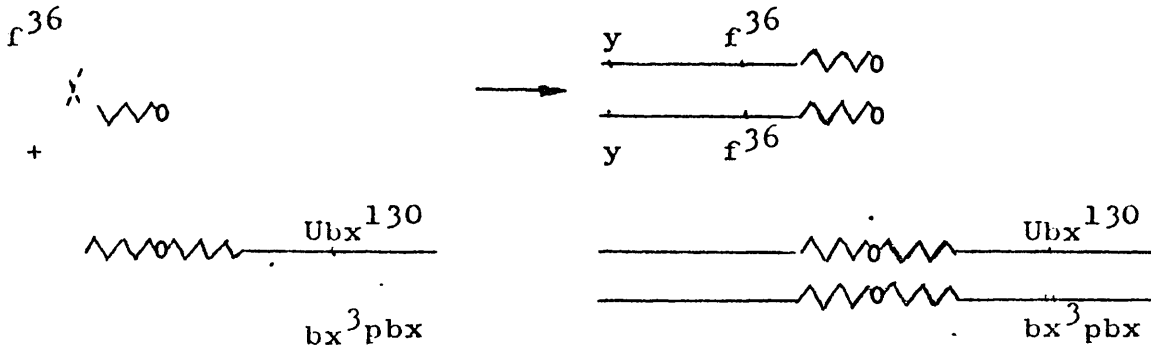
en el cual se estudió mediante análisis clonal el crecimiento del disco y el comportamiento de los clones inducidos a diferentes edades. Con objeto de obtener la máxima expresividad de la transformación, se utilizó la combinación genética bx³ pbx/Ubx¹³⁰ (ver Sección B). Como mutantes marcadores se han utilizado y y f³⁶, detectables en quetas y tricomas. El esquema de recombinación mitótica se expone en la figura 8a.

Como control del comportamiento de los clones en el mesotórax transformado, se han estudiado también los inducidos en el mesotórax normal. Debido a que la detectabilidad del mutante f³⁶ es baja en los tricomas del ala, la frecuencia se ha calculado a partir del número de clones que afectan a las quetas del notum. El tamaño de los clones se ha medido en el ala de ambos segmentos. Los resultados se exponen en la tabla 11.

El tamaño de los clones en los diversos momentos del desarrollo es muy similar para ambos segmentos y lo mismo sucede al comparar los valores de frecuencia. Estos resultados indican que la dinámica de crecimiento de ambos segmentos (mesotórax normal y metatórax transformado) es la misma y puesto que las frecuencias de recombinación mitótica son iguales, indican que el número de células de ambos dis-

Fig. 8

Exp. a



Exp. b

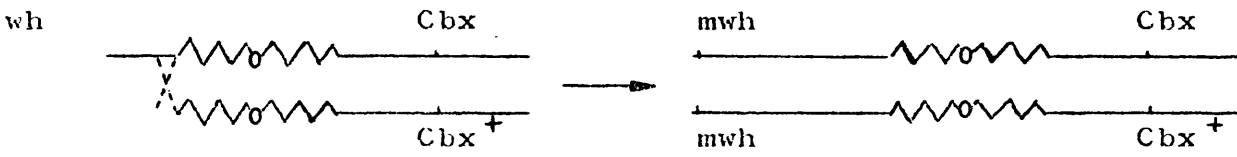


TABLA 11

Frecuencia y tamaño de los clones yf^{36} inducidos en el mesotórax normal y el transformado de moscas de constitución genética $yf^{36}/+; bx^3 pbx/Ubx^{130}$. F.P. comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde irradiación	Nº de discos	Frecuencia notum normal	Frecuencia notum transformado	Tamaño ala normal	Tamaño ala transform.
0 - 24	12	3,7	3,4	6,5	54,5
24 - 48	22	1,5	1,4	27,7	24,0
48 - 72	20	0,8	0,9	102,3	83,5
72 - 96	26	0,2	0,2	250,0	280,0
96 - 120	282	0,035	0,032	1.200,0	1.000,0

cos es el mismo en todos los estadios de desarrollo. Se ha prestado una atención especial a la frecuencia de recombinación mitótica al comienzo del desarrollo larvario (96-120 horas antes de la formación del pupario) realizándose varios experimentos adicionales con objeto de calcular esta frecuencia con la mayor precisión.

Este cálculo es importante porque sabemos que el disco metatorácico tiene al comienzo de su desarrollo aproximadamente 12 células (ver Sección A), mientras el mesotorácico tiene aproximadamente 50, y el hecho de que el disco metatorácico de bx³ y pbx tenga al comienzo del desarrollo el mismo número de células que el mesotorácico normal indica que la constitución genética mutante ha ejercido su función antes del comienzo del desarrollo del disco. Como aparentemente en el mesotórax no se da ninguna división en las células presuntivas del disco entre el blastodermo y el comienzo del desarrollo del propio disco (Bryant, 1970; García-Bellido y Merriam, 1971a; Nöthiger, 1972 revisión), estos resultados indicarían que la constitución genética mutante ejerce su efecto ya en el blastodermo, o, lo que es lo mismo, que los alelos normales de bx³ y pbx comienzan su función en el blastodermo o antes. De todas formas, queda la posi-

bilidad de que a diferencia del disco mesotorácico, en el metatorácico puedan darse varias divisiones celulares entre el blastodermo y el primer estadio larvario, esto es, comienza el desarrollo antes.

Los clones aparecidos en los dos segmentos revelan un idéntico comportamiento, manifestando una serie de características típicas del disco mesotorácico (Bryant, 1970; García-Bellido y Merriam, 1971a). Así por ejemplo, la forma de los clones en la superficie del ala tiende a ser alargada en el eje próximo-distal, mientras que en el notum los clones son más o menos isodiamétricos. En la superficie del ala, los clones nunca cruzan la línea de separación dorsal-ventral etc. Como presumiblemente, estas propiedades de las células mesotorácicas se deben a una información genética específica, estos resultados indican que la falta de función de los genes bithorax y postbithorax da lugar a la función en el metotórax del equipo génico específico que funciona en el mesotórax.

2) Análisis celular del mutante Cbx.

a) Expresividad celular del genotipo Cbx.

Como ya hemos indicado, la mutación en Cbx⁺ produ-

ce probablemente una derrepresión de la función de los genes bx⁺ y pbx⁺ en el segmento mesotorácico, produciendo una transformación de este segmento en metatórax que muestra expresividad parcial.

En los casos de mayor expresividad, las moscas homocigóticas Cbx/Cbx poseen dos segmentos metatorácicos y ninguno mesotorácico (foto 2e), sin embargo en la mayoría de los casos esta transformación no es total y se encuentran en el mesotórax células que diferencian estructuras metatorácicas (foto 5).

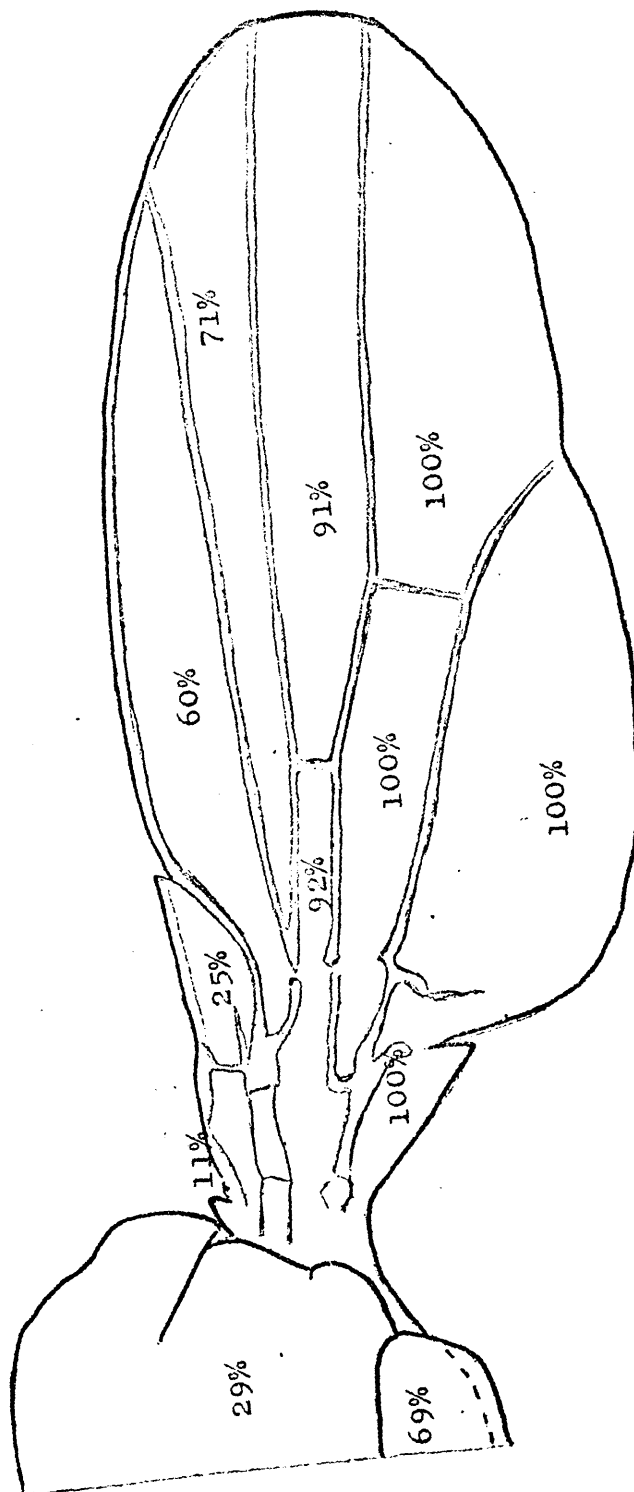
Así pues, en el disco mesotorácico Cbx, las células producen durante la metamorfosis dos tipos de diferenciaciones cuticulares distintas a pesar de ser genéticamente idénticas y coexistir en el mismo sistema de desarrollo. Los mutantes de expresividad variable plantean el problema de qué tipo de mecanismo llevan a las células por una constitución genética única a manifestar unas veces el fenotipo mutante y otras veces el fenotipo normal. En el caso de Cbx el problema es aún más interesante dado que el fenotipo mutante lleva asociada una transformación morfogénica de mesotórax en metatórax y en la morfogénesis de cada una de es-

tas estructuras presumiblemente actúan gran cantidad de diferentes genes, así, en este caso, el desarrollo en uno u otro sentido implica la inducción o inhibición de un grupo de genes simultáneamente. En la figura 9 se expone la expresividad que muestran las diferentes regiones del mesotorax en moscas homocigóticas Cbx/Cbx. Los resultados se han obtenido a partir de una muestra de 100 discos. Como se ve, la expresividad es variable dependiendo de la región considerada. Muestra un 100% en toda la parte posterior del ala que engloba las regiones E, E', D y D': En la parte anterior del ala, muestra una expresividad menor que varía desde el 92% en la zona C al 11% en la placa humeral, dando una media de 58,3% en todas las estructuras de la parte anterior. En la región torácica, el escutellum manifiesta una expresividad del 69% y el notum del 29%.

La delimitación de las zonas diferenciadas en halterio y ala muestra en general una clara distinción apareciendo células diferenciadas en halterio o en ala sin que existan soluciones intermedias y en la mayoría de los casos afecta de la misma forma a la zona dorsal y ventral del ala.

Las células diferenciadas como halterio pueden

Fig. 9 Frecuencia de transformacion metatoracica en las diferentes regiones mesotoracicas del mutante Cbx.

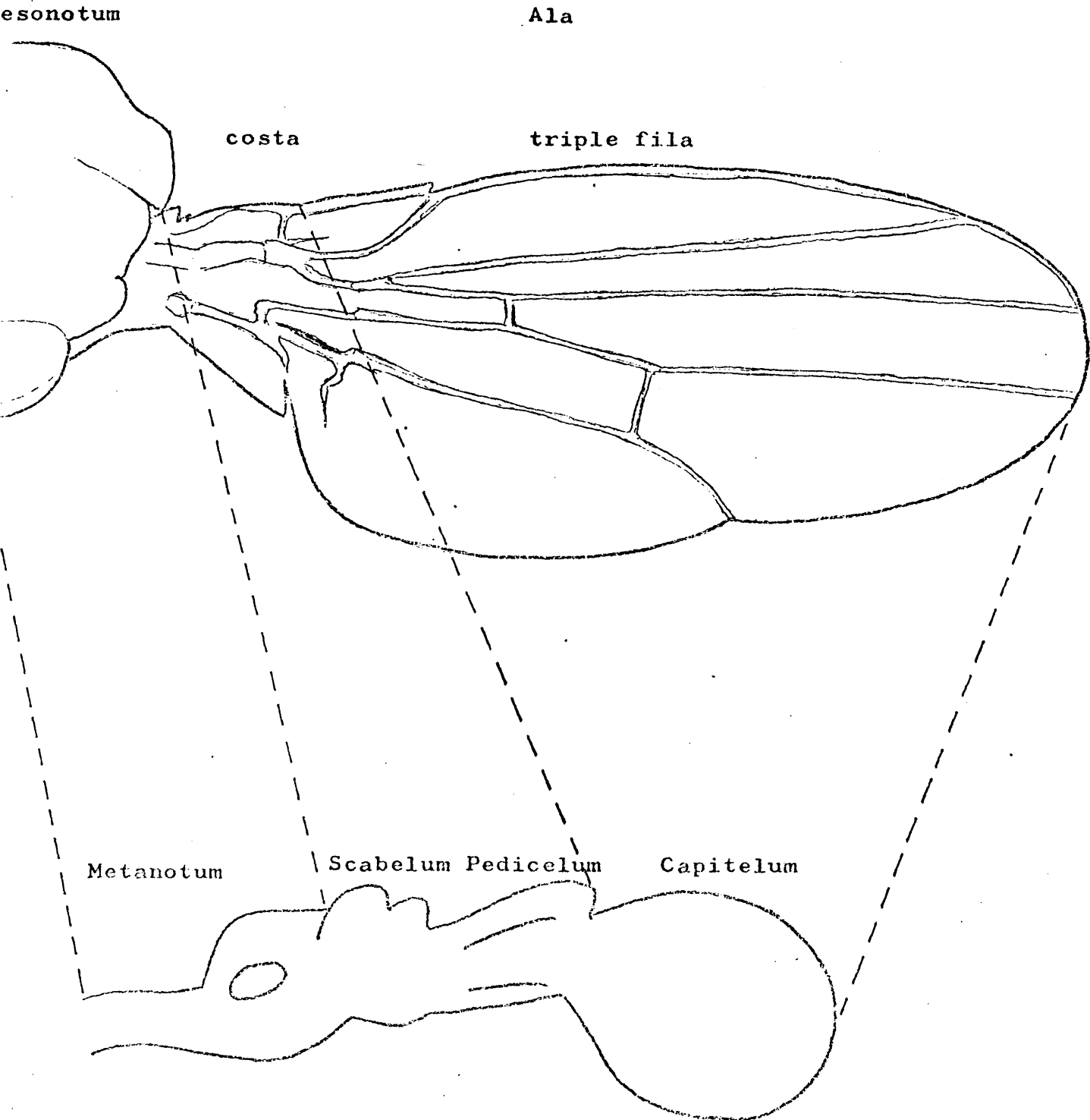


aparecer en un solo grupo o bien en diferentes grupos dispersos, que pueden ser muy pequeños de un tamaño de 10-20 células. En los casos en que el territorio de halterio es grande, se forman todas las estructuras típicas de este como ejemplo las filas de microquetas que aparecen en la parte dorsal y ventral.

Es interesante señalar que en muchos casos se detectan células diferenciadas en estructuras típicas de ala como son las quetas, completamente rodeadas por tricomas de halterio y en algunos casos las únicas estructuras de alas que aparecen son las quetas estando el resto transformado en halterio, sugiriendo que los procesos que dan lugar a la determinación de las quetas son de alguna forma diferentes a los que dan lugar a la determinación de los tricomas. Sobre este punto se insistirá en la Sección D.

En las regiones del mesotorax que no muestran una expresividad total, como la parte anterior del ala y el notum, se puede establecer una correspondencia, entre los tipos de estructuras metatorácicas y la región del mesotorax donde estas se localizan. Los resultados, se exponen en la figura 10. Así, las estructuras del metatorax proximal (metanotum) aparecen en el notum y escute-

ig.10.- Relaciones de homología entre las regiones mesotorácicas y metatorácicas según las transformaciones producidas por el mutante Cbx.



lum, el escabelum y pedicelum en la costa proximal y media y el capitulum en la costa distally triple fila, de forma que aparece una homología entre el tipo de transformación y su localización en la cutícula según un eje proximo-distal. De esta forma, las zonas más proximales del mesotorax se transforman en las más proximales del metatorax, las regiones medias mesotorácicas se transforman en las regiones medias metatorácicas y las proximales mesotorácicas en las proximales metatorácicas. Esta correspondencia proximo-distal ha sido observada también en el caso de otros mutantes homeioticos de *Drosophila* como Nasobemia (Gehring 1.966b) y Antennapedia (Gloor y Kobel 1.966). Es interesante hacer notar que esta correspondencia entre mesotorax y metatorax es la misma que se obtiene en los mutantes recesivos de la serie, cuando la transformación es al contrario que en Cbx, del metatorax hacia mesotorax (ver Sección D).

b) Análisis clonal de la expresión génica en Cbx.

Recientemente (Postlhewait y Schneiderman 1.969, 1.971), en base a los experimentos realizados con el mutante Antennapedia de Rappaport (Ant^R), que produce di-

versos grados de transformación de antena en pata, se ha sugerido que la expresividad génica tiene una manifestación clonal. Esto es, en un momento específico del desarrollo un grupo de células quedan determinadas a producir estructuras de un tipo u otro y esta determinación se mantiene en toda la descendencia celular. Esto implica que a partir de este momento específico de determinación habría dos linajes celulares separados, las células manifestando el carácter mutante y que manifiestan la transformación homeiotica y las células que manifiestan en carácter normal y que no producen transformación. Por lo tanto cualquier clon, genéticamente marcado, aparecido después de este momento, solamente podría diferenciar estructuras de un tipo u otro, pero no de ambas. En el caso analizado por Postlhewait y Schneiderman esto parece suceder así, ya que encuentran que a partir de las 72 horas de desarrollo (que sería el momento de determinación) no hay clones que engloben conjuntamente estructuras de antena y pata. Aparentemente este suceso de determinación está relacionado con un cambio en el ritmo de división del disco mutante.

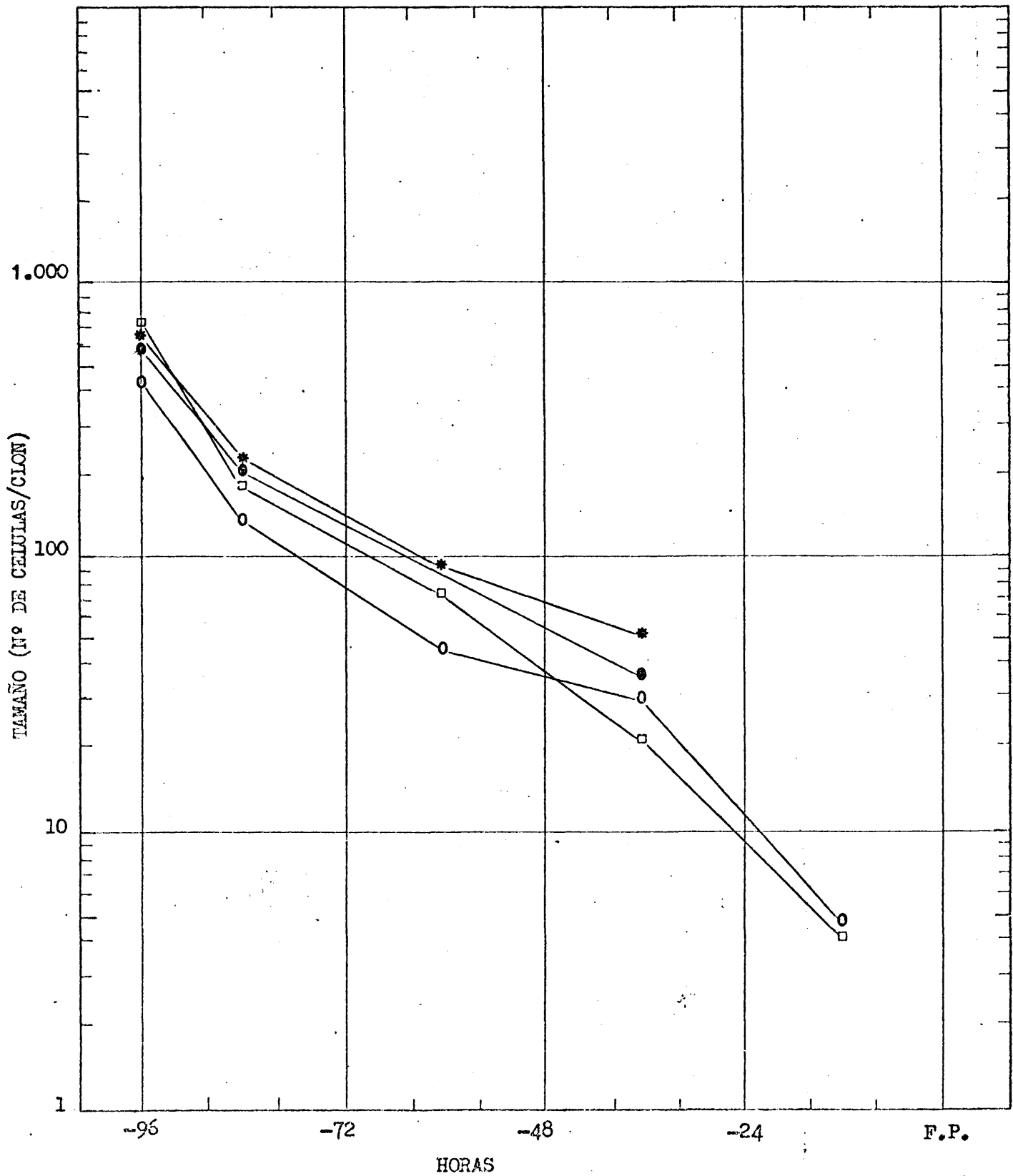
Los experimentos realizados por nosotros con el

T A B L A 12

Tamaño de los clones mwh iniciados a diferentes edades de desarrollo en moscas de constitución genética mwh e/Cbx. FP comienzo de la pupación

Edad hasta FP e la pupación	Diferencia ala	Mesotorax Diferencia halterio	Diferencia ala y halterio	Metatorax
0-24	4,0,	4,3	—	
4-48	19,0	28,7	51,6	33,4
8-72	68,6	40,0	85,0	
2-96	163	127	204	200
6-120	680	400	630	580

Fig. 11.



Representación semilogarítmica del tamaño de los clones *mwh* iniciados a lo largo del desarrollo en moscas de constitución genética *Cbx/mwh e*.

Clones que aparecen en el metotorax: □ diferencian estructuras mesotorácicas o diferencian estructuras metatorácicas, * diferencian estructuras mesotorácicas metatorácicas. El símbolo ○ representa clones iniciados en el metotorax. F.P. coincide con la fecundación.

mutante Cbx son fundamentalmente del mismo tipo de los realizados por Postlhewait y Schneiderman. Se han irradiado a diferentes edades larvas de constitución genética mwh/Cbx (figura 8b) y se han analizado los clones aparecidos en el disco mesotorácico. Como control se han estudiado los aparecidos en el disco metatorácico. El tamaño de los clones en los discos mesotorácico y metatorácico Cbx en diferentes estadios de desarrollo se exponen en la tabla 12 y en la figura 11. Debido a que en otras regiones hay dificultades en la detección de mwh, solamente se han utilizado los datos referentes al ala y al capitelum. Para la construcción de la tabla, se han agrupado los clones encontrados en varias clases: 1) clones aparecidos en el ala y que solamente diferencian estructuras de ala, 2) clones aparecidos en el ala y que solamente diferencian en estructuras de halterio, 3) clones aparecidos en el ala y que diferencian estructuras de halterio y ala y 4) clones aparecidos en el capitelum metatorácico donde no hay transformación.

Como se desprende de la tabla 12 y de la figura 11, el tamaño medio de los clones mwh de las diferentes clases es muy similar, indicando que el ritmo de di-

visión es el mismo para todas las células del disco mesotorácico y para las del metatorácico. No parece existir una correlación entre ritmo de división y tipo de diferenciación cuticular.

Por otra parte y a diferencia de lo encontrado por Posthlewait y Schneiderman 1.969, 1.971, en el caso de Cbx se han encontrado clones que engloban estructuras de halterio y ala en todos los estadios de desarrollo, excepto a partir de 24 horas antes de la pupación, edad en que los clones son muy pequeños, con una media de 4 células por clon y donde es difícil definirse por el tipo de diferenciación de tan pocas células.

Estos resultados indican que en el caso de Cbx no existe un momento específico de determinación para producir mesotorax o metatorax así como no parece ser que exista en ningún momento del desarrollo un cambio en el ritmo de división.

Por otro lado y a pesar de que el ritmo de división no manifiesta diferencias en las regiones diferenciadas en halterio o ala, existía la posibilidad que el ritmo de división en cada grupo celular podría afectar la

diferenciación de las células en un sentido u otro.

Para analizar esta hipótesis, se ha comparado en número de células diferenciadas en halterio o en ala en aquellos clones que engloban ambas estructuras. Los resultados se expresan en la tabla 13. Como se puede observar, la relación de número de células de ala/ número de células de halterio en cada uno de estos clones puede ser mucho mayor que 1 (hasta 15/1) o, por el contrario, muchos menor (1/13), indicando que no parece ser que el ritmo de división de cada clon en particular afecte el proceso de determinación de las células en un sentido u otro. Así pues, contrariamente a lo que sucede en el caso de Antennapedia, la diferenciación final de las células mesotorácicas del disco mutante Cbx está influenciada por otros factores diferentes al linaje celular o al ritmo de división.

T A B L A 13

Tamaño relativo de las zonas de halterio y ala en los clones mwh aparecidos en las moscas de constitución genética mwh e/Cbx y que engloban los dos tipos de estructuras. FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde irradiación	Nº de células del clon	Diferenciadas		Relación ala/halterio
		en ala	en halterio	
24-48	40	30	10	3/1
	24	6	18	1/3
	12	6	6	1/1
	100	60	40	3/2
	40	10	30	1/3
48-72	70	5	65	1/13
	100	25	75	1/3
72-96	160	150	10	15/1
	300	150	150	1/1
	100	30	70	3/7
	250	100	150	2/3
96-120	200	100	200	1/2
	300	280	20	14/1
	1.000	500	500	1/1
	1.000	300	700	3/7
	1.000	200	800	1/4
	200	100	100	1/1

D) RESPUESTA CELULAR AL CAMBIO EN LA INFORMACION GENETICA.

Los genes del sistema bithorax controlan el desarrollo de los segmentos meso, metatorácico y primero abdominal de *Drosophila*. La presencia de los alelos normales del sistema bithorax permite la normal determinación de las células presuntivas de las estructuras cuticulares de estos segmentos. En la Sección B, se han expuesto los resultados obtenidos por nosotros en cuanto a las características funcionales de los diferentes loci del sistema. En la Sección C, se ha estudiado el comportamiento celular de diferentes combinaciones mutantes que producen transformaciones en regiones específicas y que muestran expresividad total (bx^3 pbx/Ubx¹³⁰) o expresividad parcial (Cbx). En estas combinaciones zigóticas, sin embargo, el cambio en la constitución genética afecta a todas las células del segmento controlado por el gen mutado de forma que todo el blastema crece durante todo el desarrollo manifestando la condición mutante. En estas condiciones es difícil concluir sobre los factores que controlan el estado de determinación de cada una de las células aisladas, hasta que punto la información del blastema influye sobre el estado de determinación que manifiestan cada una de las célu-

las o bien si este estado se debe a la información genética presente en cada una de las células del blastema.

En el desarrollo normal, existe evidencia experimental (ver Introducción) de que aparecen sucesivamente una serie de sucesos de determinación que paulatinamente van definiendo las diferenciaciones prospectivas de las células. A lo largo de este proceso, aparecen primero una serie de restricciones que determinan las características más generales como la delimitación anterior-posterior, dorsal-ventral etc. y aparecerían después otras más restringidas que determinarían características más específicas de diferentes subregiones y elementos celulares como la delimitación costatriléfila, tricoma-queta, etc..

Así pues, en cada momento del desarrollo las células poseen un estado específico de determinación, que será más restringido a medida que se acerca a la definición final.

En los experimentos que se detallan en esta Sección, se va a analizar la respuesta de células aisladas a varios cambios genéticos que en combinaciones zigóticas dan lugar a un cambio en la determinación de varios segmentos. Se va a estudiar hasta qué punto la determinación de las células

está influida por el blastema y puesto que el cambio genético se puede inducir en varios estadios de desarrollo, hasta que punto el estado de determinación previo al cambio genético afecta su comportamiento posterior.

Para ello se han utilizado una serie de mutantes recesivos que producen en homocigosis varios tipos de transformaciones homeióticas. La técnica utilizada ha sido inducir mediante rayos-X recombinación mitótica que resulte en la aparición de células aisladas homocigóticas para el mutante, en moscas heterocigóticas que muestran fenotipo normal. La detección de estos clones celulares se realiza mediante el acoplamiento de mutantes marcadores que afectan la diferenciación de los procesos cuticulares.

- 1) Estudio clonal de la transformación producida por el mutante bx³.

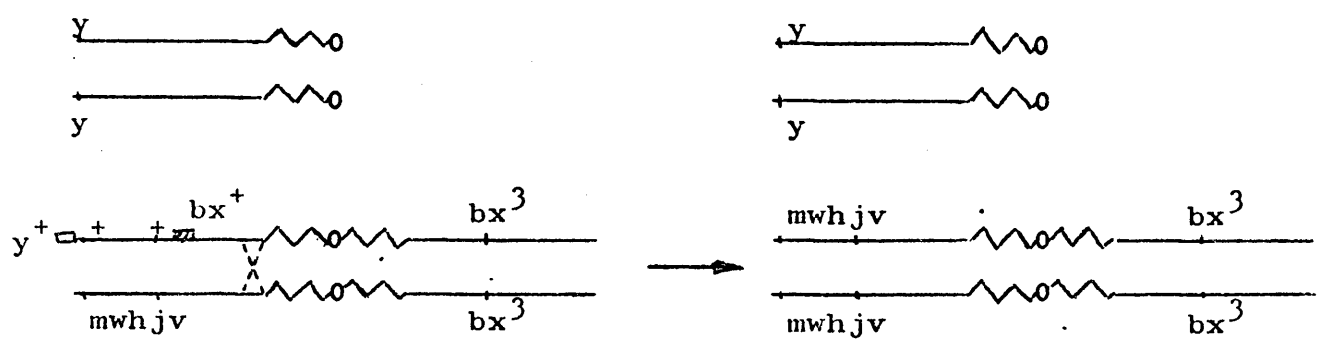
Como ya ha sido indicado, la mutación bx³ produce un cambio de la determinación de las estructuras metatorácicas anteriores transformándolas en las mesotorácicas anteriores, dando lugar a la aparición en las moscas homocigóticas de un segundo notum y parte anterior del ala en el metatorax (ver foto 2a y 4).

Debido al carácter recesivo de la mutación, las moscas heterocigóticas son normales y en ellas el desarrollo del disco metatorácico es normal. Si mediante rayos-X inducimos recombinación mitótica, alguna de las células de la parte anterior del metatorax se hará homocigótica para la mutación bx³ y debido a su nueva constitución genética debería manifestar un comportamiento subsiguiente típico de las células mesotorácicas anteriores, esto es, diferenciarse durante la metamorfosis dando estructuras típicas de notum y ala anterior. Los mismos clones inducidos en otros segmentos del organismo seguirán manifestando el comportamiento típico de las células de esos segmentos.

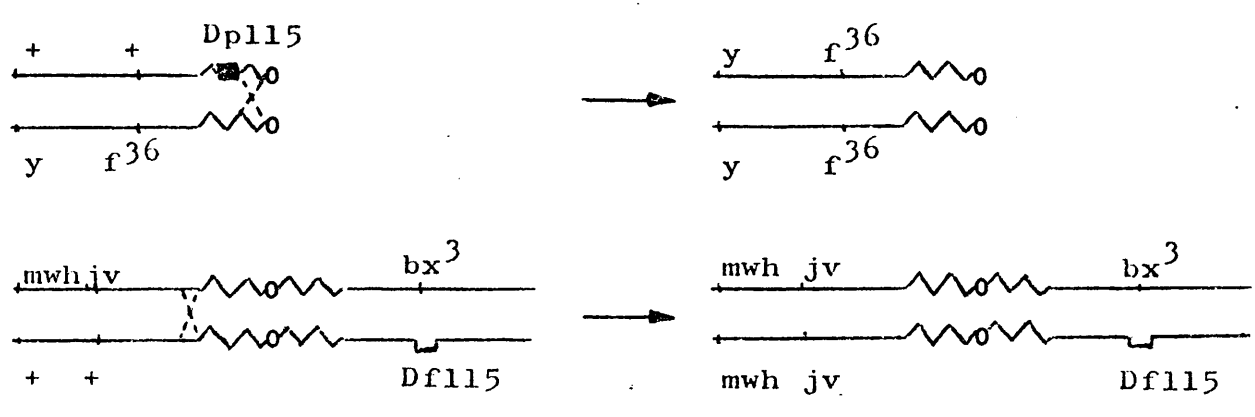
Este tipo de experimentos, se ha realizado mediante dos sistemas genéticos que se exponen en la figura 12. En el tipo a) se irradiaron larvas de diferentes edades de la constitución genética Df(1)sc⁸, y⁻; Dpsc^{J⁴}y⁺, Dpbxd¹⁰⁰bx⁺ red bx³/mwh iv red bx³. En estas larvas, la constitución genética bx³/bx³ en el brazo derecho del tercer cromosoma, está cubierta por el alelo normal de bithorax presente en la Dpbxd¹⁰⁰ y por lo tanto manifiestan fenotipo normal. Así mismo, la constitución y⁻ (y por lo tanto de fenotipo y) del primer cromosoma está cubierta por el alelo normal de yellow presente en

Fig. 12

a



b



la Dpsc^{J4}. Además se ha acoplado el cis con mwh, el marcador de quetas jv (ver descripción en Material y Métodos). Una recombinación mitótica entre la Dpbxd¹⁰⁰ y el centromero dará lugar a la aparición de células homocigóticas para bx³ y que estarán marcadas además por ser también homocigóticas para y, mwh y jv (figura 12). Una recombinación mitótica distal a la Dpbxd¹⁰⁰, llevaría a la aparición de clones marcados, con y y mwh que seguirían conservando el alelo normal de bithorax. Dada la situación relativa de la Dpbxd¹⁰⁰ y jv, la frecuencia esperada de clones y, mwh, jv; bx⁺ es menor del 1% del total de los inducidos en el brazo izquierdo del tercer cromosoma.

En el tipo b), la combinación mutante bx³/Df115 irá cubierta por la presencia de la Dp115 en el cromosoma X. Como mutantes marcadores se han utilizado y, f³⁶, mwh y jv. Una recombinación mitótica en el cromosoma X proximal a la Dp115 llevará a la aparición de clones que descubren la combinación mutante bx³/Df115 y que irán marcados además por ser y y f³⁶. Como en el caso anterior, la recombinación entre f³⁶ y la Dp115 dará lugar a clones y, f³⁶, bx⁺ pero dada la proximidad entre f³⁶ y la Dp115 esta frecuencia es menor del 15%. Como control de la irradiación en cada experimento, se

analizó la frecuencia de clones marcados mwh y jv que no producen transformación (figura 12b).

- a) Frecuencia de clones que inducen transformación hacia mesotorax a lo largo del desarrollo.

Larvas de la constitución genética del tipo a) fueron irradiadas separadas por edades al llegar a la pupación y los adultos emergidos estudiados microscópicamente para detectar clones en el metatorax marcados genéticamente y que mostraran transformación hacia mesotorax.

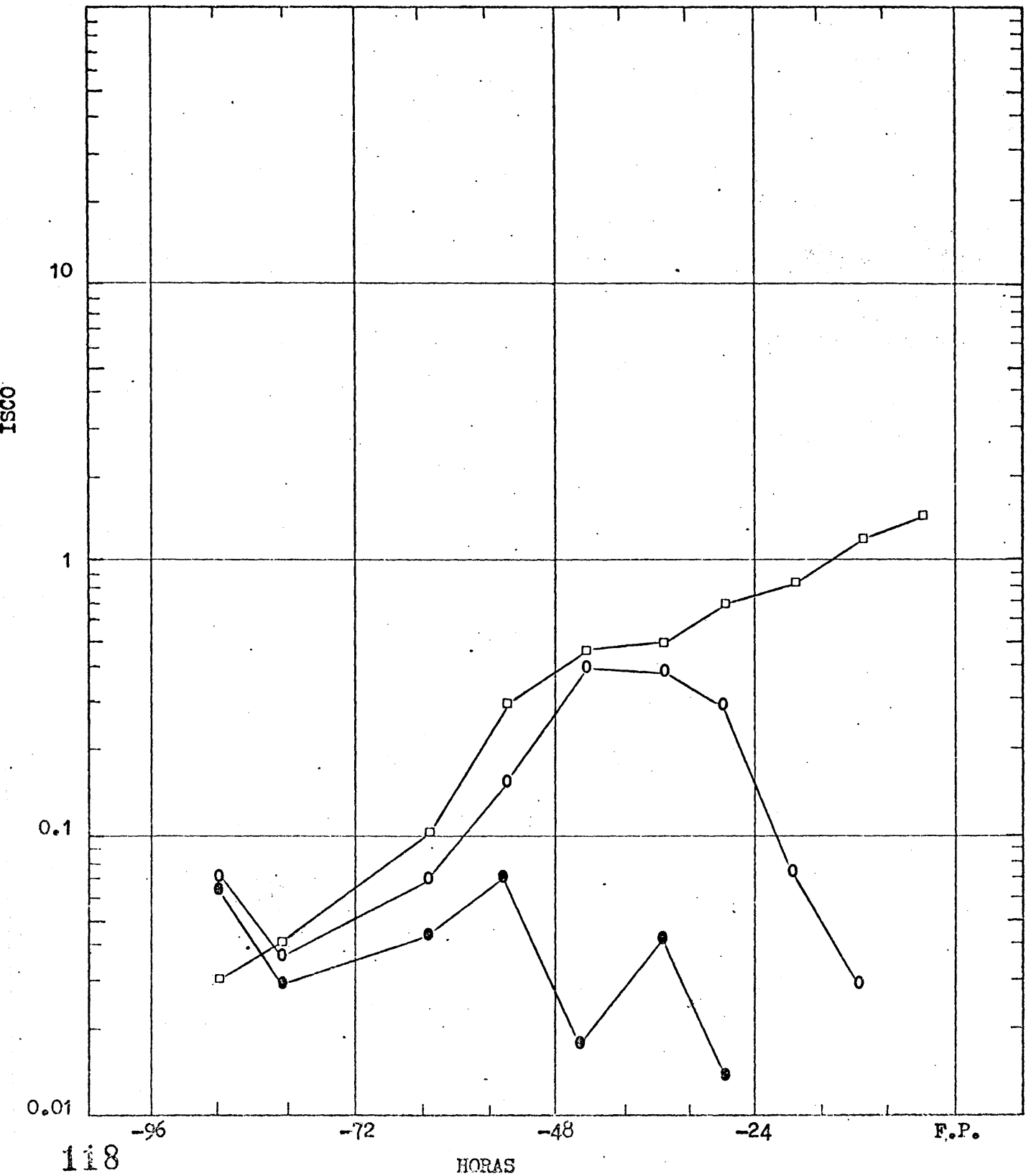
En primer lugar, había que demostrar que el genotipo bx³/bx³ es autónomo celular, esto es, que las células a las que se ha cambiado la constitución genética manifiestan su nuevo genotipo produciendo estructuras mesotorácicas. En efecto, en casi todas las edades estudiadas, se detectaron clones y, mwh, jv aparecidos en el metatorax en que todas y cada una de las células del clon manifiestan la transformación. Así pues, el carácter bx³/bx³ es autónomo celular (foto 6).

La frecuencia de clones detectados se exponen en la tabla 14 y en la figura 13. Como control, se expone también la frecuencia de clones y, mwh, jv en el notum mesotorácico.

Frecuencia de clones y: mwh jv aparecidos en el mesotorax y metatorax de moscas de constitución genética $Df(1)_{sc}^8 : Dpsc^{J4} Dpbd^{100}$ red bx^3 / mwh jv red bx^3 . FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Frecuencia de clones mesonotum	Frecuencia de clones metatorax	Frecuencia de clones en el metatorax que diferencian tricomas mesotoráxicos
0-8	52	1,53	0,00	0,00
8-16	88	1,23	0,03	0,00
16-24	94	0,85	0,08	0,00
24-32	82	0,68	0,28	0,01
32-40	70	0,53	0,38	0,04
40-50	74	0,48	0,40	0,14
50-60	128	0,25	0,16	0,07
60-72	156	0,10	0,07	0,04
72-84	110	0,04	0,04	0,03
84-96	66	0,03	0,075	0,075

Fig. 13.



Representación semilogarítmica de la frecuencia de clones $y; myh_{iv}$ iniciados a lo largo del desarrollo en moscas de constitución genética $y; Dpsc^{34} Dpbx^{100} rad abd^2 bx^3 / myh_{iv} red bx^3$.

○, total de clones aparecidos en el metatorax y que manifiestan transformación mesotorácica. ● clones del metatorax que manifiestan transformación entrícomas mesotorácicos. □ control; clones aparecidos en el mesotorax. F.P. comienzo de la pupación.

El análisis de la figura 13 muestra que la frecuencia de clones que presentan transformación, que es de 0,075 al comienzo del primer estadio larvario, va aumentando hasta llegar a un máximo entre las horas 40-50 antes de la formación del pupario (comienzo del tercer estadio larvario), para disminuir después siendo nula a las 8 horas antes de la formación del pupario.

Estos datos de frecuencias aparentemente no están de acuerdo con lo esperado, ya que hemos visto (Sección A) que el disco metatorácico crece de forma exponencial durante todo el desarrollo hasta la pupación, siendo en este momento cuando la frecuencia de recombinación mitótica es mayor. Sin embargo, si bien a partir de -40 horas la frecuencia de clones que presentan transformación va disminuyendo hasta hacerse nula a las -8 horas, se detecta una frecuencia normal de clones mwh en el capitulum, lo cual indican que está produciendo clones homocigóticos bx³/bx³, pero estos clones no presentan transformación.

Este resultado, como ya hemos visto, no se puede explicar en términos de falta de autonomía en la expresión de la transformación. Además, muchos de los clones que presentan transformación constan de una sola queta con dos únicas células,

el tormogeno y el tricogeno, que se diferencian de acuerdo con su nueva constitución genética, indicando que la transformación es perfectamente autónoma aún cuando se de en grupos celulares muy pequeños.

Este resultado solamente se puede explicar suponiendo que a partir de 8 horas antes de la formación del pupario se establece una rígida determinación en las células metatónicas de tal forma que cualquier cambio posterior en la información genética no tiene efecto sobre el estado de determinación. Este fenómeno ha sido observado también en el análisis de mutantes que controlan la formación de quetas (García-Bellido y Merriam 1.971c, Santamaría, Morata y García-Bellido en preparación) y en el análisis de la transformación homeotica producida por el mutante engrailed (García-Bellido y Santamaría 1.972) y ha sido introducido en la literatura con el nombre de "perdurabilidad".

El análisis de este fenómeno en la transformación inducida por el mutante bx³ revela que el grado de perdurabilidad no es el mismo en todos los tipos de transformación. En la figura 13 se expone junto con la gráfica que representa la frecuencia total de la transformación, la curva de frecuencias

de los clones que presentan transformación de los tricomas metatorácicos en mesotorácicos. La frecuencia de este tipo de clones es en casi todas las edades muy inferior a la total, siendo además nula a las 32 horas antes de la formación del pupario. Esto indica que un gran porcentaje de clones que presentan transformación y en las horas cercanas a la pupación todos, están formados exclusivamente por quetas, indicando que la transformación en tricomas mesotorácicos muestra un grado de perdurabilidad de mayor duración que la transformación en quetas metatorácicas.

b) Tamaño de los clones que muestran transformación.

El tamaño de estos clones ha sido valorado en número de células y en número de quetas y los resultados se exponen en la tabla 15 y en la figura 14. Como control, se ha comparado con el tamaño de los clones inducidos en el mesotorax normal, según García-Bellido y Merriam 1.971a.

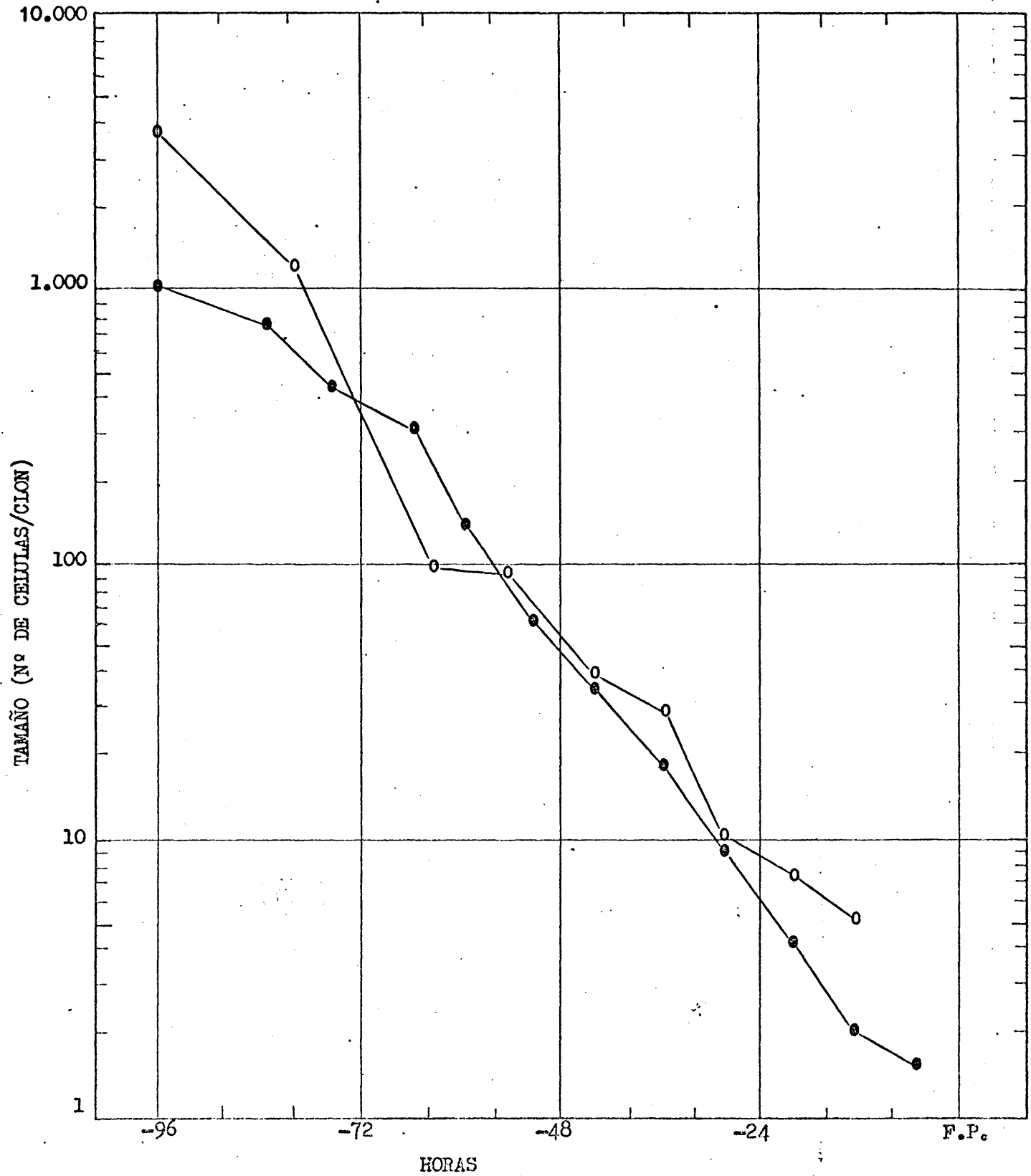
El análisis de la figura 14 muestra que el tamaño de los clones surgidos en el metatorax que manifiestan transformación hacia estructuras mesotorácicas es igual a los clones inducidos en el mesotorax a la misma edad. Esto es así en la mayor parte del desarrollo con la excepción de los clones in-

T A B L A 15

Tamaño de los clones homocigóticos para bx^3 inducidos en diferentes edades del desarrollo de moscas $Df(1)sc^8; Dpsc^J4; Dpbxd^{100}$ red bx^3/mwh jv red bx^3 . FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Nº de células/clon	Nº de quetas/clon
0-8	52	-	-
8-16	88	5,6	1,2
16-24	94	7,6	1,2
24-32	82	10,6	1,3
32-40	70	28,1	1,2
40-50	74	40,0	1,5
50-60	128	94,6	2,0
60-72	156	95,0	3,0
72-84	110	1.130	14,1
84-120	186	3.500	37,5

Fig. 14



Representación semilogarítmica del tamaño de los clones y¹mwh¹ jr iniciados a lo largo del desarrollo en moscas de constitución genética y¹; Dnsc¹4 Dobxd¹00 red shd² bx³/mwh¹ jr red bx³.

○, clones en el metatorax que manifiestan transformación mesotorácica; ●, clones en el mesotorax. F.P. comienzo de la pupación.

ducidos muy al principio o muy al final del desarrollo en edades posteriores a 16 horas antes de la pupación resulta ser cero ya que debido al fenómeno de perdurabilidad antes citado, las células homocigóticas $\underline{bx^3/bx^3}$ que aparecen en este estadio no manifiestan la transformación homeótica. Sin embargo, los inducidos al principio del desarrollo muestran un mayor tamaño que los correspondientes inducidos a la misma edad en el mesotorax. Así, la media de tamaños para los inducidos en el metatorax es de 3.500 células/clon a (96-120) horas mientras que los inducidos en el mesotorax la media es de 1.000 células/clon. En la tabla 16 se exponen los valores encontrados para los tamaños de los clones inducidos en el metatorax en un experimento dado. Mientras se detectan clones con tamaños de 500, 1.000, 2.000 células, comparables a los encontrados en el mesotorax, se detectan también clones de 5.000, 6.000 10.000 células, que son hasta 5 veces el tamaño del mayor clon encontrado en el mesotorax.

Estos resultados indican que si bien los clones que manifiestan transformación tienen un ritmo de crecimiento similar a los mesotorácicos, algunos de los inducidos muy temprano en el desarrollo manifiestan propiedades de regulación en el sentido de producir muchas más estructuras que las correspondientes a un clon mesotorácico aparecido a la misma edad.

TABLA 16

Tamaño de los clones bx³/bx³ inducidos al comienzo del primer estadio larvario y que muestran transformación hacia mesotórax.

n	nº de quetas	nº de células	estructuras transformadas.
1	70	10.000	notum
2	3	1.500	notum, costa y ala
3	46	1.500	ala
4	65	10.000	notum
5	40	1.000	ala
6	--	2.000	ala
7	40	5.000	notum
8	40	6.000	notum
9	--	500	ala
10	--	500	ala

c) Comportamiento de los clones que muestran transformación.

1.- Influencia de la información genética previa.

Antes de sufrir el cambio genético, las células del halterio heterocigótico para bx³ estaban desarrollándose como células metatorácicas. Presumiblemente, la respuesta al cambio genético está influenciada por la información previamente contenida en las células.

Entre las estructuras cuticulares derivadas del disco metatorácico dorsal se distinguen varias regiones claramente diferentes en cuanto a tipos de diferenciaciones y en la disposición morfológica de sus elementos. Como en el caso del disco metatorácico estas diversas regiones se originan a partir de distintas regiones del disco, indicando la presencia de una información diferencial específica de región y responsable de esta diversificación.

Así pues, la información genética previa de las células en la que se ha producido la recombinación está condicionada por su situación dentro del blastema metatorácico.

En la tabla 17, se exponen los tipos de diferenciaciones mesotorácicas que presentan los clones encontrados en las diversas regiones metatorácicas y la localización del clon

T A B L A 17

Tipos de diferenciación mesotorácica de los clones aparecidos en diversas regiones metatorácicas.

Región del metatorax	Número de clones	Tipo de diferenciación mesotorácica (en % del total de casos)		
		notum	costa	ala
Metanotum	33	100	-	-
Scabelum	3	-	100	-
Pedicelum	15	-	100	-
Capitelum	57	-	10,5	89,5

en la cutícula metatorácica. Todos los clones encontrados en el metanotum producen diferenciaciones típicas de mesonotum, los del pedicelum y escabelum producen diferenciaciones de costa y solamente un bajo porcentaje de los encontrados en el capitelum producen diferenciaciones de costa distal mientras que la mayor parte se diferencia en estructuras de ala anterior. Aún entre los encontrados en el capitelum y que diferencian ala anterior, el tipo de diferenciaciones está condicionado por la localización del clon; en los clones que presentan quetas, todos los encontrados en la parte ventral del capitelum diferencian quetas típicas de la parte ventral de la superficie del ala y los que en ningún caso un mismo clon presente diferenciaciones de la parte dorsal y ventral a la vez. Estos resultados indican que las posibilidades prospectivas de las células a las cuales se le ha cambiado experimentalmente la información genética están restringidas dependiendo de la información genética previa y además que existe una homología al menos a nivel de señales o informaciones específicas de región entre las diversas regiones del metatorax y del mesotorax. La localización de estas regiones homólogas en sus respectivos segmentos se establece según su posición en el eje próximo-distal de tal forma que habría una homología en señales entre las regiones más proximales (metanotum y mesonotum) intermedias

(escabelum, pedicelum y costa) y distales (capitelum y ala distal). Este tipo de relaciones entre las diversas regiones son idénticas a las encontradas por nosotros en el mutante Cbx,^c que producen una transformación inversa a la de bx³ (Sección C) y han sido descritas también en otras transformaciones homeo-
ticas (Gehring 1.966b).

Esta homología entre las regiones del meso y metatorax puede explicarse en términos de un mismo "prepattern" (Stern 1.954a, b) suponiendo que las propiedades específicas de los blastemas presuntivos de las regiones homólogas son idénticas y el único cambio sería el de la competencia de las células para producir (dependiendo de su condición genética bx⁺ o bx³) metatorax o mesotorax. Alternativamente, estos resultados se pueden explicar suponiendo una similitud en la información genética presente en las regiones homólogas del meso y metatorax de tal forma que las señales genéticas que conducen a la aparición de las estructuras del metanotum en el metatorax son idénticas a las que conducen a la formación del mesonotum en el mesotorax. Esta interpretación está apoyada además por el hecho de que las propiedades que manifiestan los clones mesotorácicos que aparecen en el metatorax presentan los mismos tipos de restricciones de los clones mesotorácicos inducidos en el mesotorax, sugiriendo la presencia de señales genéticas

comunes. Así por ejemplo, la restricción dorsal-ventral descrita en el ala normal se manifiesta también en capitelum y la delimitación notum-ala en el mesotórax se mantienen los clones inducidos en el metatórax. Esto está apoyado además de los clones inducidos en el metatórax al principio del desarrollo que como hemos visto manifiestan un crecimiento mayor que los correspondientes del mesotórax. Estos clones manifiestan de nuevo la presencia de restricciones ^{ya} que a pesar de su mayor crecimiento sólo producen en cada caso determinado tipo de estructura, dependiendo de la región donde aparece. En algunos casos, las células del clon dan lugar a la totalidad de las estructuras de una región en particular, sin que se observe ninguna estructura típica de esta región. Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la información genética presente en las células previamente al cambio experimental influye decisivamente en su comportamiento posterior.

2) Aparición de la nueva información genética.

Los clones inducidos manifiestan su nueva información produciendo estructuras mesotorácicas. Así, se han pro-

ducido clonalmente elementos cuticulares de todas las regiones mesotorácicas anteriores.

Una observación interesante es que muy frecuentemente, los clones inducidos en el metatórax se invaginan dentro del tejido metatorácico llegando en muchas ocasiones a separarse totalmente quedando un grupo de estructuras mesotorácicas dentro del metatorácico (foto 6). Lo contrario sucede también, de forma que el clon se evagina formando unas estructuras que tienden a separarse del halterio. Este tipo de comportamiento aparece cuando el clon presenta tricomas de ala y los clones que solamente presentan quetas no lo manifiestan. Este hecho de que los clones mesotorácicos tiendan a separarse del metatórax es significativo desde que se sabe (Nöthiger 1964) que las células imaginales presuntivas de los diferentes discos imaginales muestran afinidades celulares específicas. Además, (García-Bellido y Lewis, en preparación), las células del disco metatorácico bithorax muestran afinidad con las células de la parte anterior del ala y se separan de los del metatórax normal. Así, probablemente este comportamiento de los clones bx³ es debido a un cambio en las afinidades de las células del clon que manifiestan

así, aun antes de su diferenciación, su nueva constitución genética.

La presencia de la nueva información genética se pone de manifiesto también en el análisis de las estructuras cuticulares mesotorácicas diferenciadas por el clon. Las relaciones espaciales entre los diversos elementos del clon son del mismo tipo que las existentes entre los elementos de la región correspondiente del mesotórax, indicando que los procesos que operan en la formación de los distintos patrones morfológicos son el resultado de la información genética presente en cada una de las células del conjunto, independientemente de la información presente en el resto del blastema, que en este caso, sería para mostrar los patrones morfológicos metatorácicos.

2) Análisis clonal de la homocigosis del mutante Ubx¹.

a) Viabilidad de las células homocigóticas Ubx¹/Ubx¹

Como ya se ha visto, el análisis genético de Ubx¹ indica que este mutante produce la inhibición funcional de los alelos normales de bx, bx^d y pbx localizados en posición cis. Así pues, la condición homocigótica Ubx¹/Ubx¹ debería producir un fenotipo bx, bx^d y pbx. Sin embargo, la homocigosis de Ubx¹ es letal. No obstante, la letalidad en individuos no indica necesariamente letalidad celular y aproximadamente el 83% de los letales zigóticos de Drosophila melanogaster presentan una viabilidad celular normal (Ripoll y García-Bellido, 1973).

En nuestros experimentos, se ha analizado el comportamiento de las células Ubx¹/Ubx¹ mediante recombinación mitótica inducida en larvas de dos tipos genotípicos:

Genotipo a) y/+; Sb⁶³/mwh Ubx¹ : en este genotipo se detectan tres tipos diferentes de clones (figura 15a). Una recombinación en el cromosoma X producirá clones marcados con y homocigóticos, mientras que la inducida en el brazo izquierdo del tercer cromosoma producirá clones mwh y la inducida en el brazo derecho producirá clones marcados Sb⁺ que además

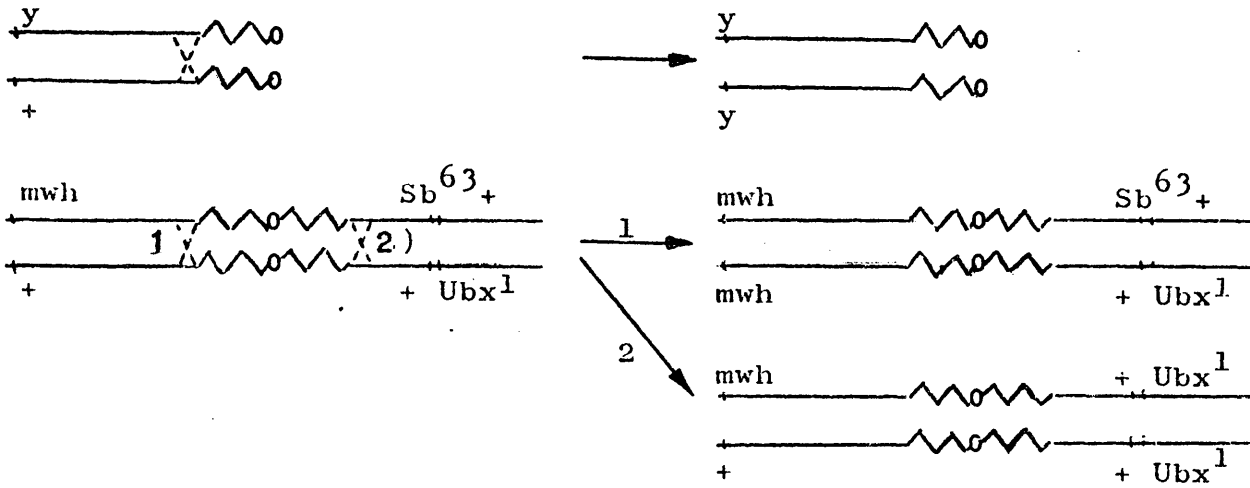
serán homocigóticos para Ubx¹. Los clones marcados con y o mwh se utilizan como control de la irradiación y de la viabilidad de las células Sb⁺.

Genotipo b) yf³⁶/Dp115; Df115/mwh Ubx¹: En este genotipo, se detectan dos clases de clones (figura 15b). Los inducidos en el primer cromosoma, que irán marcados con y y f³⁶, y de los que la mayoría habrán perdido la Dp115, siendo por lo tanto de constitución genética Ubx¹/Df115, (donde la Df115 representa la deficiencia de Ubx). Por otro lado, los inducidos en el brazo izquierdo del tercer cromosoma, producirán clones marcados con mwh y que no afectarán al genotipo Ubx¹/+.

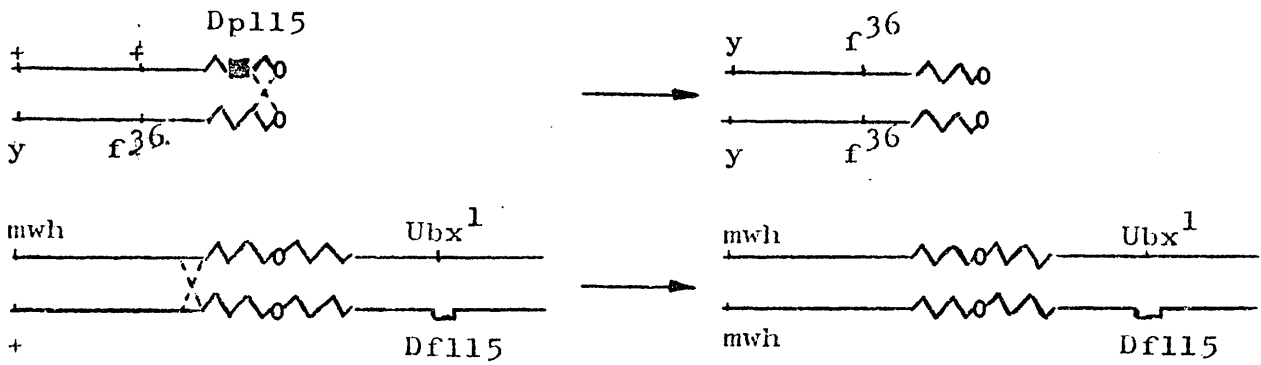
En la Tabla 18 se exponen los tamaños de los clones y y Sb⁺ encontrados en el mesotórax (donde Ubx¹ no producen transformación) de adultos del genotipo a). El tamaño de ambos tipos de clones, medidos en número de quetas, es muy parecido en todos los estadios, indicando que el mutante letal Ubx¹ manifiesta una viabilidad celular normal en el mesotórax. Lo mismo sucede en el abdomen, donde el tamaño medio de los clones y es 3,4 quetas/clon y el de los clones Sb⁺ es de 3,3 quetas/clon. Así pues, a pesar de su carácter letal cigótico, las células homocigóticas para Ubx¹ son perfectamente viables.

Fig. 15.

x . a



Exo. b



T A B L A 18

Tamaño de los clones y y Sb^+ aparecidos en el mesotorax de moscas de constitución genética $y/+; mwh Ubx^1/Sb^{63}$. FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Número de quetas y /clon	Número de quetas Sb^+ /clon
0-8	32	1,0	1,0
8-16	60	1,0	1,0
16-24	60	1,1	1,1
24-40	54	1,3	1,3
40-48	42	1,7	1,6
48-56	28	3,0	2,8
56-64	60	3,4	4,0
64-72	28	5,0	4,5
72-80	22	10,0	10,5
80-120	74	15,0	15,0

b) Análisis clonal de la transformación producida por Ubx¹ en las estructuras metatorácicas.

Como en el caso de la homocigosis clonal para bx³, los clones Ubx¹/Ubx¹ aparecidos en las estructuras metatorácicas producen diferenciaciones típicas de mesotórax (foto 7), con la diferencia de que en este caso, la transformación afecta también a los clones inducidos en la parte posterior del metatórax, región esta que no se afecta por la homocigosis de bx³.

La frecuencia de clones Sb⁺ inducidos en diferentes edades en larvas del genotipo a) se exponen en la tabla 19. Como control se exponen las frecuencias de Sb⁺ detectadas en el mesotórax de los mismos individuos (*figura 16*).

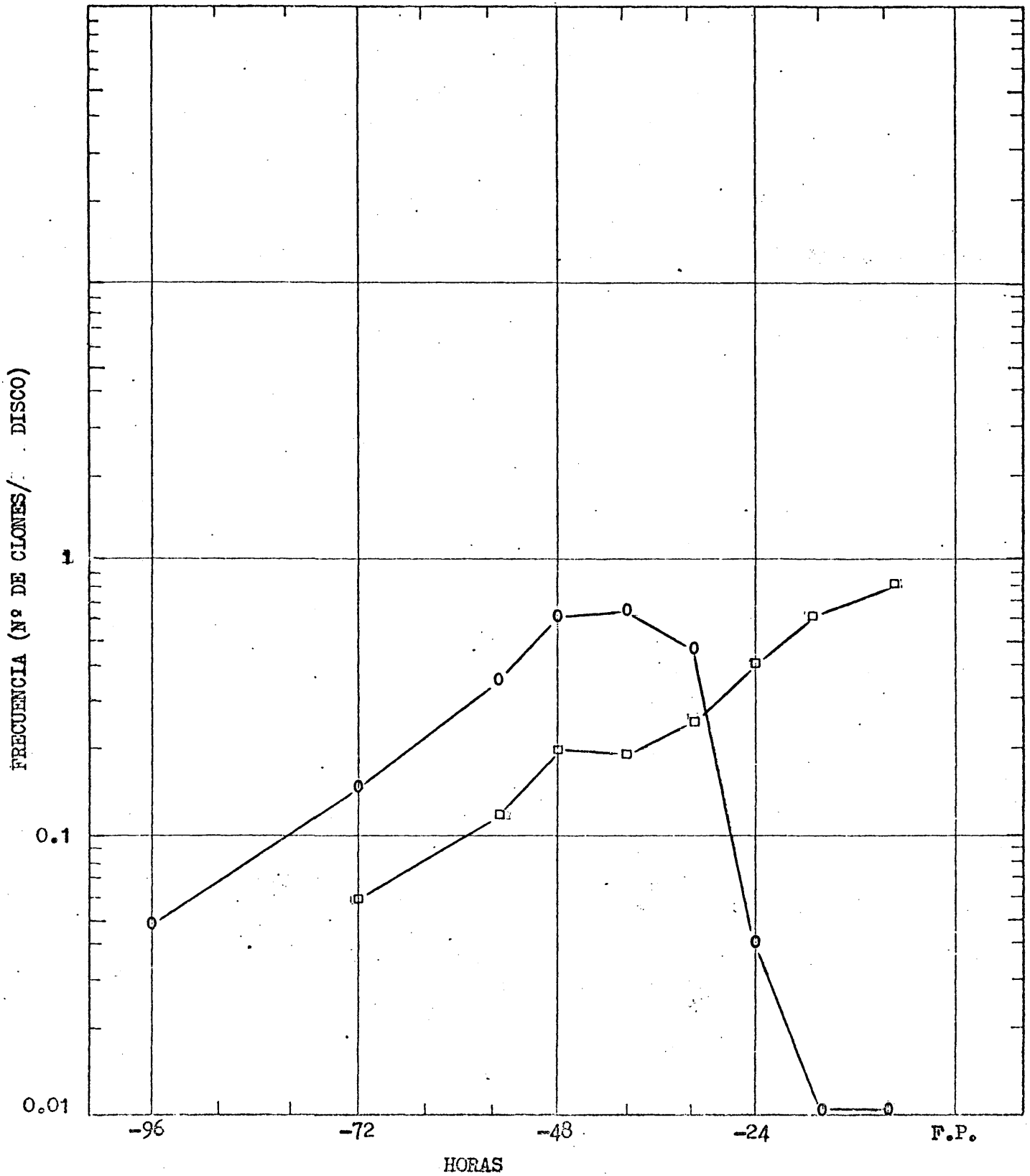
La curva de frecuencia es similar a la encontrada en los experimentos realizados con bx³. La frecuencia de clones Sb⁺ en el metatórax va aumentando durante gran parte del desarrollo hasta unas 40 horas antes de la formación del pupario, donde empieza a bajar, haciéndose nula aproximadamente 16 horas antes de la formación del pupario. Por otro lado, la frecuencia de clones Sb⁺ en el mesotórax y mwh en

T A B L A 19

Frecuencia de clones Sb[†] por disco, aparecidos a diferentes edades, en las estructuras mesotorácicas y metatorácicas de moscas de constitución genética y/+; mwh Ubx¹/Sb⁶³. FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Frecuencia Sb [†] Mesotorax	Frecuencia Sb [†] Metatorax
0-8	150	0,82	0,00
8-16	146	0,60	0,00
16-24	98	0,41	0,04
24-32	102	0,23	0,43
32-40	70	0,18	0,61
40-48	64	0,20	0,57
48-56	82	0,11	0,33
56-72	76	0,06	0,13
72-96	74	-	0,05

Fig. 16.



Representación semilogarítmica de la frecuencia de clones Sb^+ iniciados a lo largo del desarrollo de moscas de constitución genética $y/+; mwh Sb^{63}/Ubx^1$.
 O clones Sb^+ en el metatorax. El clones Sb^+ en el mesotorax. F.P. comienzo de la pupación.

el metatórax no manifiesta este comportamiento y sigue aumentando durante todo el desarrollo larvario indicando que el comportamiento anómalo de la curva de Sb⁺ en el metatórax se debe a la homocigosis de Ubx¹, apareciendo de nuevo el fenómeno de la perdurabilidad en los clones iniciados a partir de 32-40 horas antes de la formación del pupario. El mismo resultado se obtiene en los experimentos realizados en moscas de genotipo b). Estos resultados indican que el fenómeno de perdurabilidad no va ligado a una situación genética concreta sino que es característico de la transformación homeiótica.

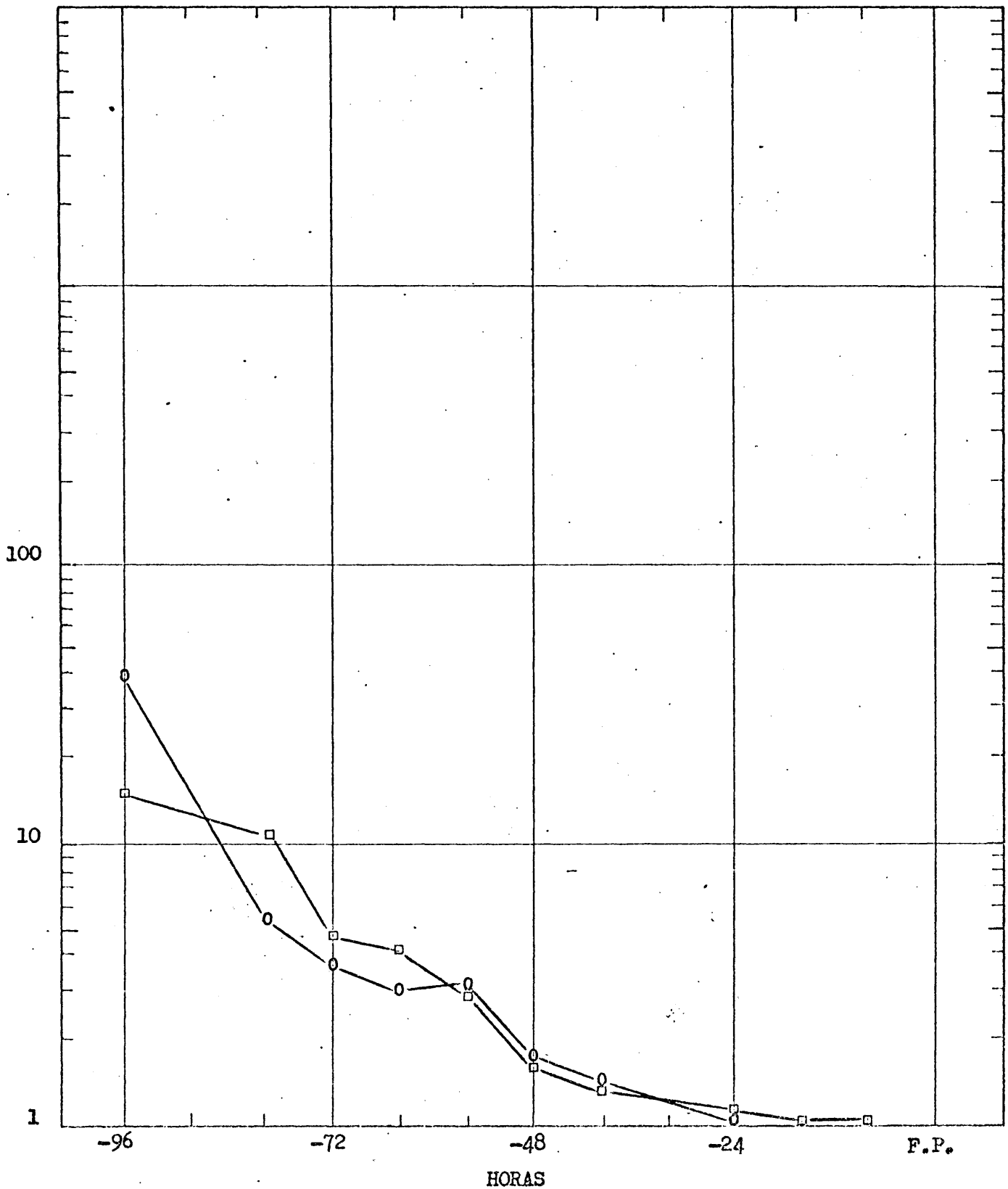
El tamaño de los clones Sb⁺ detectados en el metatórax de moscas irradiadas a diferentes edades larvarias, se expone en la tabla 20 y figura 17. Como control, se muestra también el tamaño medio de los clones Sb⁺ encontrados en el mesotórax. Las dos curvas de tamaños (medidas en número de quetas) son similares durante todo el periodo de desarrollo excepto en los clones inducidos al principio (de 80-120 horas antes de la formación del pupario) donde la media de los mesotorácicos es de 15,1 quetas/clon y la media de los metatorácicos es de 38,4 quetas/clon, es decir son aproximadamente 2,5 veces mayores. De nuevo este fenómeno es parecido a los encontrado en el caso de bx³; los clones iniciados al

T A B L A 20

Tamaño medio de los clones Sb^+ aparecidos en el mesotorax y metatorax de moscas de constitución genética $y/+;mwh Ubx^1/Sb^{63}$. FP comienzo de la puación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Número de quetas Sb^+ /clon. mesotorax	Número de quetas Sb^+ /clon. metatorax
0-8	32	1,0	-
8-16	60	1,0	-
16-24	60	1,1	1,0
24-40	54	1,3	1,3
40-48	42	1,6	1,6
48-56	28	2,8	3,1
56-64	60	4,0	3,0
64-72	28	4,5	3,5
72-80	22	10,5	5,5
80-120	74	15,0	38,4

Fig. 17



Representación semilogarítmica de la frecuencia de clones Sb^+ iniciados a lo largo del desarrollo de moscas de constitución genética $y/+;mwh Sb^{03}/Ubx$ o clones Sb^+ en el mesotorax. o clones en el metatorax. F.P. comienzo de la pupación.

principio del desarrollo en el metatórax son capaces de diferenciar mayor cantidad de estructuras mesotorácicas que las inducidas en la misma edad en el mesotórax.

También como en el caso de bx³, las diferentes estructuras mesotorácicas inducidas clonalmente, aparecen en regiones específicas del metatórax. Así, diferenciaciones de notum aparecen en el metanotum, las de la costa en el pedicelum anterior y parte proximal anterior del capitelum, y las de la triple fila aparecen en la parte distal anterior del capitelum. Entre las estructuras posteriores del halterio en la parte posterior del capitelum, se producen diferenciaciones de doble fila y la parte posterior del pedicelum se producen diferenciaciones de ala.

El comportamiento de los clones mesotorácicos inducidos en el metatórax, es similar a lo ya descrito para los inducidos en el mutante bx³. En muchas ocasiones, las estructuras de ala inducidas se invaginan, separándose de las estructuras del metatórax, probablemente debido a un cambio en la afinidad celular. Además, estas estructuras manifiestan un patrón morfológico mesotorácico típico, indicando de nuevo que este patrón se debe a las propiedades

presentes en cada una de las células que lo componen, ya que en este caso, como en el de bx³, la única información mesotorácica presente en las células del clon es la liberada por esas mismas células.

c) Análisis clonal de la transformación producida por Ubx¹ en el primer segmento abdominal.

Como ya hemos indicado en la sección de Análisis Genético, la combinación Ubx¹/Ubx¹ manifiesta fenotipo bx^d, esto es, transforma el primer segmento abdominal en metatórax. Como a su vez transforma el meta en mesotórax debido a la inhibición de bx⁺ y pbx⁺, los clones Ubx¹/Ubx¹ en el primer segmento abdominal deberían producir estructuras mesotorácicas. Sin embargo, tanto en las moscas de genotipo a) como b) no se ha encontrado ningún clon que manifieste esta transformación.

No obstante, si se compara el número de clones y f³⁶ detectados en moscas de genotipo b) en el primer segmento abdominal con los detectados en el segundo abdominal (tabla 21), se observará que aparecen muchos menos clones y f³⁶ en el primer segmento abdominal (3 en el primero y 20 en el segundo) mientras que el número de los mwh detec-

TABLA 21

Número de clones yf³⁶ y mwh detectados después de irradiación, en el primer y segundo segmento abdominal de moscas de constitución genética yf³⁶/Dp115; mwh Ubx¹/Df115. FP, comienzo de la pupación.

horas hasta FP desde la irradiación	número de abdómenes	1º abdominal		2º abdominal	
		yf ³⁶	mwh	yf ³⁶	mwh
0-24	15	1	1	6	2
24-48	30	1	4	6	4
48-72	16	1	2	8	1
Total	61	3	7	20	7

tados es idéntico en ambos segmentos, lo cual indica que la frecuencia de recombinación mitótica es la misma. Por otro lado, los clones y f³⁶ encontrados en el primer segmento manifiestan un tamaño y diferencian unas estructuras típicamente abdominales, indicando que probablemente no ha habido en ellos cambio genético.

Esta falta de detección de la mayor parte de los clones y f³⁶ inducidos se puede explicar por la diferente dinámica de crecimiento que muestran las estructuras torácicas y abdominales. Los histoblastos abdominales no comienzan las divisiones (García-Bellido y Merriam, 1971b) hasta llegar a la formación del pupario. A partir de aquí, realizan una serie de rápidas divisiones celulares a un ritmo aproximado de 3 horas por ciclo, verificándose las últimas divisiones aproximadamente 20-22 horas después de la formación del pupario. Esto implica que independientemente del momento del periodo larvario en que las células han sido irradiadas, el cambio genético sólo tendrá lugar durante la pupación después de la primera división.

Por otro lado, el ritmo de división de las células imaginales mesotorácicas es de 8,5 horas por ciclo (García-

Bellido y Merriam, 1971a). Esto quiere decir que un cambio genético que lleve a un histoblasto a transformarse en célula presuntiva mesotorácica hará que esta célula se divida en un ritmo de 8,5 horas por ciclo y como las divisiones de los histoblastos acaban a las 20-22 horas después de la formación del pupario, estas células podrán dividirse durante 17-19 horas, esto es, verificará dos divisiones celulares produciendo un máximo de 4 células cuticulares. Un clon de este tamaño es difícilmente detectable en las estructuras del terguito, y además hay evidencia experimental (Morata y Ripoll, en prensa) de que células aisladas con un ritmo de división más bajo no son capaces de desarrollarse en los discos imaginales. Estas son, probablemente, las razones de la falta de detección de los clones yf³⁶ en el primer segmento abdominal, e indica además que los clones inducidos homocigóticos para Ubx¹ están respondiendo autónomamente a su nueva constitución genética.

La pequeña fracción de clones yf³⁶ que se detectan al diferenciarse como estructuras de terguito, representan probablemente la fracción de recombinación mitótica inducida entre la posición de la Dp115 y el mutante f³⁶, que no pro-

duciría cambio genético ya que las células resultantes contienen la Dp115 y no son por lo tanto homocigóticas para Ubx¹

3) Análisis clonal de la transformación producida por el mutante bx_d.

La mutación en el locus de bx_d⁺ produce una transformación del primer segmento abdominal en metatórax. Debido al efecto polar que muestra esta mutación sobre pbx⁺, la parte posterior del segmento metatorácico a su vez se transforma en mesatórax, mostrando una transformación incompleta hacia parte posterior del ala. Así pues, la homocigosis de este mutante manifiesta transformación homeiótica en el primer segmento abdominal y en la parte posterior del mesatórax.

El estudio clonal de este mutante, se ha realizado irradiando larvas de constitución genética y/+, mwh Sb⁶³/bx_d. Los tipos de recombinación mitótica detectable son idénticos a los presentados en la figura 15a. Los clones Sb⁺ van acoplados a la condición homocigótica bx_d¹/bx_d¹. Como control, se estudian los clones marcados y o con mwh, que no van asociados al cambio genético producido por bx_d.

a) Transformación clonal en el primer segmento abdominal.

Los resultados obtenidos de la transformación clonal en el primer segmento abdominal se exponen en la tabla 22

T A B L A 22

Número de clones celulares homocigóticos para bxd que muestran transformación en el primer segmento abdominal. FP comienzo de la - pupación.

horas hasta FP desde la irradiación	número de abdomenes	1º abdominal y Sb ⁺	2º abdominal y Sb ⁺
0-24	54	6	7
24-48	116	13	10
48-72	47	9	7
72-96	11	-	1
Total	228	28	25

donde se muestra el número de clones y y Sb⁺ encontrados en el primer segmento abdominal. Como control, se exponen también los encontrados en el segundo segmento abdominal, el cual no se afecta por la homocigosis de bx_d.

De un total de 228 abdómenes estudiados, se han encontrado 28 clones y en el primer segmento y 25 en el segundo, indicando que la frecuencia de recombinación somática es la misma en ambos segmentos. Sin embargo, el número de clones Sb⁺ en el primer segmento es cero, mientras que en el segundo es de 14, indicando que como en el caso de Ubx¹, no se detectan los clones que producen transformación hacia metatórax en el primer segmento abdominal, debido como ya hemos visto, a la diferente dinámica de crecimiento de las células presuntivas de ambas estructuras.

b) Transformación en el segmento posterior metatorácico.

La transformación mesotorácica producida por bx_d en el segmento metatorácico posterior es debida (ver Análisis Genético) al efecto polar de esta mutación sobre el gen pbx, colocado a la derecha. Así, los clones inducidos bx_d/bx_d (Sb⁺) en la parte posterior del metatórax deben ma-

nifestar transformación hacia mesotórax posterior. En nuestros experimentos, (tabla 23) se ha encontrado una baja frecuencia de clones que inducen transformación en el metatórax posterior, sugiriendo que no todos los clones bx^1/bx^1 manifiestan este tipo de transformación. Esto es debido, probablemente, a que el efecto polar de bx sobre pbx^+ no impide totalmente la función de pbx^+ (ver Análisis Genético) sino que lo lleva a condiciones de hipomorfismo, de tal forma que la transformación es parcial y sólo la manifiestan una fracción de las células.

T A B L A 23

Número de clones celulares homocigóticos para bxd que muestran transformación en la parte posterior del metatatorax. FP comienzo de la pupación.

Horas hasta FP desde la irradiación	Número de discos	Número de clones que muestran transformación
0-24	108	—
24-48	232	4
48-72	94	1
72-96	22	—

4) Análisis clonal de la transformación producida por el mutante R(pbx).

Como ya hemos visto (ver análisis genético) la mutación R(pbx), es letal homocigótica, manifestando en heterocigosis un fenotipo idéntico al de pbx, aunque de expresividad variable y con una penetrancia por disco de 4,4%. Asimismo, va asociada a una inversión, con puntos de ruptura desconocidos, en el brazo derecho del tercer cromosoma.

En los experimentos que se detallan a continuación, se ha analizado el comportamiento celular de la homocigosis de R(pbx) mediante recombinación meiótica inducida por rayos-X con objeto de estudiar la penetrancia del carácter en células homocigóticas para R(pbx).

a) El fenotipo de R(pbx).

En los casos en que se manifiesta fenotípicamente, la mutación R(pbx) produce diversos grados de transformación de la parte posterior del halterio en parte posterior de ala (foto 8). Las estructuras transformadas en ala aparecen en regiones específicas del halterio. Así, el alula

aparece en la parte posterior del pedicelum y la parte posterior del ala aparece en la parte posterior del capitulum. En los casos de transformación parcial, la región del halterio transformada puede ser indistintamente el pedicelum y el capitulum sin que aparentemente exista ninguna correlación entre la aparición en una región u otra. Asimismo, las transformaciones son simétricas con respecto al eje dorsal-ventral del halterio.

b) Influencia de la irradiación sobre la penetrancia del carácter.

Se sabe (Villeé 1.946), que en algunos mutantes que manifiestan penetrancia parcial, esta aumenta después de la irradiación a diferentes dosis. Para comprobar este hecho en el caso de R(pbx), se realizaron una serie de experimentos en los cuáles se irradiaron larvas de diferentes edades de constitución genética R(pbx)/+, midiéndose los valores de penetrancia según la dosis y el estado de desarrollo de las larvas irradiadas. Los resultados para dosis de 1.000 y 2.000 R, se exponen en la tabla 24. Los valores de penetrancia muestran algunas oscilaciones pero en conjunto presentan valores muy similares de 4,0 para 1.000 R y 3,6 para 2.000 R, que son también muy parecidas al valor de 4,4% que se obtienen en moscas no irradiadas.

T A B L A 24

Influencia de la irradiación sobre la penetrancia de la mutación R(pbx).

Edad de la larva (en horas)	1.000 R		2.000 R	
	nº de discos	nº fenotipos R(pbx) Penetrancia %	nº de discos	nº fenotipos R(pbx) Penetrancia %
0-24	132	4 3,0	-	-
24-48	210	12 5,7	226	8 3,6
48-72	340	13 4,0	200	6 3,0
72-96	320	11 3,4	214	7 3,3
96-120	494	20 4,2	172	9 5,3
Total	1.496	60 4,0	812	30 3,6

Así pues, se puede concluir que en nuestro caso y a las dosis utilizadas, no hay alteración significativa en los valores de penetrancia.

c) Análisis clonal de la penetrancia en células homocigóticas para R(pbx).

Si bien el fenotipo de R(pbx) se manifiesta como dominante, la penetrancia es como hemos visto, un valor del 4,4% por disco. Era de esperar que este valor aumentara en células homocigóticas para el mutante.

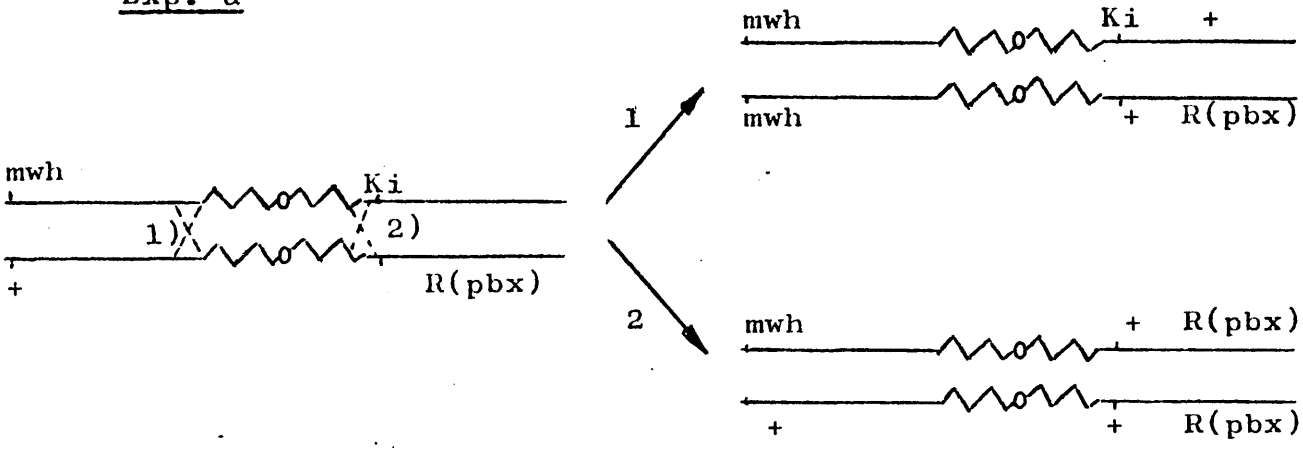
El análisis celular se ha realizado mediante la inducción por rayos-X de clones de células homocigóticas para R(pbx) en dos genotipos diferentes (figura 18).

a) Larvas de constitución genética y/+; mwh Ki/R(pbx).

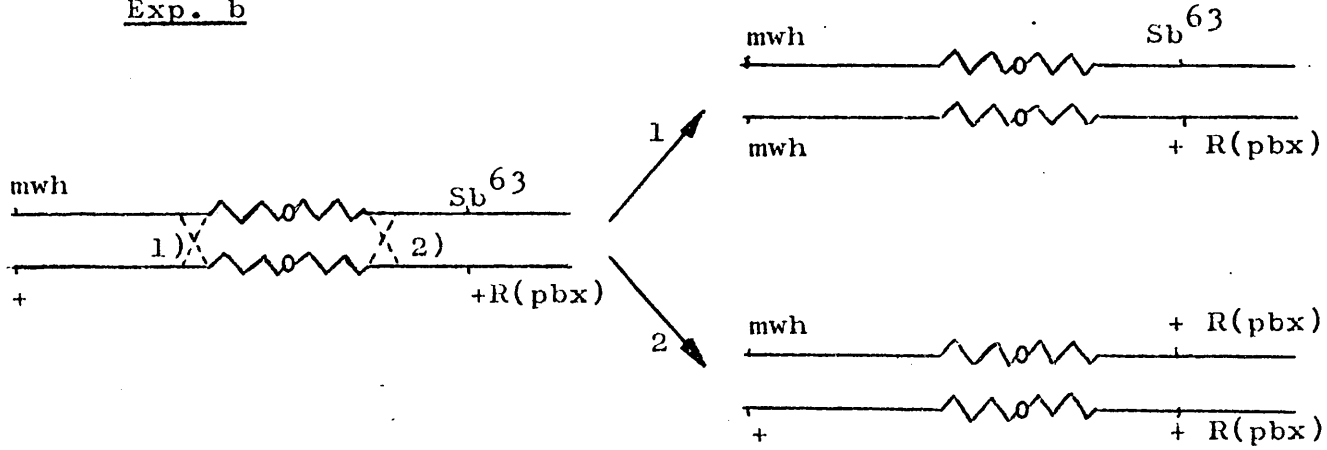
En este experimento, la homocigosis de R(pbx) va marcada con la homocigosis de Ki⁺. Es interesante hacer notar que como en el caso de Sb⁶³, las células homocigóticas Ki⁺ no son detectables en el metatorax excepto cuando el clon produzca alguna diferenciación mesotorácica. Al estar localizados Ki en el brazo derecho del tercer cromosoma muy próximo al centromero, muy posiblemente la recombinación mitótica proximal a Ki, lo será también para

Fig. 18

Exp. a



Exp. b



la inversión que contiene R(pbx), con lo cual se evitarán los efectos producidos por recombinación mitótica en el fragmento invertido que llevaría a la aparición de dicéntricos, aneuploidias, etc.. y en muchos casos letalidad celular. Como control interno del experimento, se analizan las frecuencias de clones y y mwh.

Se estudiaron las estructuras diferenciadas por 242 discos metatorácicos de esta constitución genética y no se encontró ningún clon Ki⁺ en el metatorax posterior, indicando que no se producía transformación hacia mesotorax. La posibilidad de que las células homocigóticas para R(pbx) sean letales, queda eliminada debido al hecho de que se detectan clones Ki⁺ en el mesotorax y en el abdomen. Los datos del abdomen se exponen en la tabla 25. Como comparación, se dan la frecuencia de recombinación para y encontrados en las mismas moscas. La frecuencia obtenida para Ki⁺ es de 0,21 y es la esperada para una dosis de 1.000 r (García-Bellido 1.972b). El tamaño de los clones Ki⁺ es además idéntico (medido en número de quetas) al de los y, indicando que la viabilidad celular de R(pbx) homocigótico es normal. Así pues, la falta de detección de clones Ki⁺ en el metatorax se debe muy probablemente a que los

T A B L A 25

Frecuencia y tamaño de los clones y y Ki⁺ aparecidos en los terguitos de moscas de constitución genética y/+; mwh Ki/R(pbx). FP comienzo de la pupación.

horas hasta FP desde la irradiación	número de abdómenes	Frecuencia/abdomen		Tamaño	
		y	Ki ⁺	y	Ki ⁺
0-24	38	0,80	0,19	3,1	2,4
24-48	17	1,10	0,19	2,8	2,3
48-72	17	1,50	0,30	3,2	3,4
72-96	27	1,31	0,15	3,8	3,7
96-120	23	1,06	0,21	4,5	4,8
Total	121	1,15	0,21	3,5	3,3

clones R(pbx)/R(pbx) muestran baja penetrancia celular del carácter de la transformación, comportándose como las células heterocigóticas, lo cual indicaría que la penetrancia es independiente del número de dosis mutante.

b) Larvas de constitución genética y/+; mwh Sb⁶³/R(pbx).

En este experimento, figura 17b, la homocigosis para el brazo derecho del tercer cromosoma y por lo tanto de R(pbx), irá marcada por la homocigosis de Sb⁺. Los clones Sb⁺ no son detectables en el metatorax a menos que muestre transformación mesotorácica. Como control interno del experimento, se analiza la frecuencia de clones y y mwh.

Al estar localizado el marcador Sb⁶³ aproximadamente a la mitad del brazo derecho del cromosoma tercero, existía la posibilidad en este experimento de que una fracción de los sucesos de recombinación mitótica tuvieran lugar en la zona invertida del cromosoma que lleva a R(pbx), produciendo alteraciones estructurales cromosómicas que llevarían a falta de viabilidad celular.

Como en el caso del experimento anterior, no se detectarán clones Sb⁺ en las estructuras mesotorácicas pos-

teriores. Sin embargo, se detectaron clones Sb⁺ en el mesotorax y en el abdomen. Los datos del abdomen se expresan en la tabla 26 donde se muestran las frecuencias y el tamaño de los clones y y Sb⁺. Las frecuencias encontradas son las normales para y y Sb⁺ a una dosis de 1.000 r (García-Bellido 1.972b) y los tamaños de los clones y y Sb⁺ son asimismo iguales. Estos resultados indican que se detectan todos los clones Sb⁺ inducidos y apoyan la conclusión alcanzada en el experimento anterior de que la penetrancia de R(pbx) tiene los mismos valores en forma heterocigótica que homocigótica. Además, indica que probablemente la inversión que existe en el cromosoma R(pbx) tiene los puntos de ruptura distales a Sb⁺, o bien que es muy pequeña y la fracción de recombinación mitótica inducida en la inversión no es detectable en nuestros experimentos.

T A B L A 26

Frecuencia y tamaño de los clones y y Sb⁺ aparecidos en moscas de constitución genética y/+; mwh Sb⁶³/R(pbx). FP comienzo de la pupación.

horas hasta FP desde la irradiación	número de abdómenes	Frecuencia/Abdomen		Tamaño	
		y	Sb ⁺	y	Sb ⁺
0-24	50	1,11	0,40	3,5	3,6
24-48	34	1,65	0,68	3,8	2,7
48-72	65	2,05	0,83	3,3	3,4
72-96	23	1,92	0,61	3,7	4,0
96-120	23	1,90	0,51	3,4	3,5
Total	195	1,71	0,61	3,5	3,6

DISCUSION

1) La función del sistema bithorax.

Los genes comprendidos en la serie pseudoalélica bithorax, controlan caminos específicos de desarrollo de los segmentos mesotorácico, metatorácico y primero abdominal de *Drosophila melanogaster*. Mutaciones en cualquiera de estos genes, resultan en la aparición en un segmento o subsegmento, de las estructuras típicas de otro.

La delimitación en subsegmentos es, en algunos casos, muy clara. Por ejemplo, la mutación bx³ conduce a la transformación de las células de la parte anterior del metatórax en las de la parte anterior del mesatórax, pero no afecta en absoluto (salvo en combinaciones genéticas que descubren el efecto polar de bx³ sobre pbx⁺) a las células de la parte posterior, estableciéndose una clara delimitación entre las células anteriores, transformadas en mesatórax y las posteriores, no transformadas, e indicando que el producto normal del gen bithorax no es necesario en la parte posterior del metatórax. De la misma forma, la mutación pbx conduce a la transformación mesotorácica del metatórax posterior, pero no afecta al metatórax anterior. Además, ni bx³ ni pbx afectan al desarrollo normal del primer segmento abdominal, que necesita la presencia del pro-

ducto normal de bithoraxoid.

Así pues, parece ser que existen tres productos, atribuibles a bx⁺, pbx⁺ y bx_d⁺, cada uno de los cuales es necesario para el desarrollo normal de tres regiones específicas, metatórax anterior y posterior y primer segmento abdominal. Sin embargo, a pesar que los productos de estos genes ejercen una acción específica en diferentes regiones, su síntesis parece ser controlada de forma común a todos ellos.

En primer lugar, la mutación bx_d manifiesta un claro efecto polar sobre pbx⁺, y además este efecto polar se suprime por mutaciones como su (Hw)², que suprimen el fenotipo de bx_d - (Lewis 1.963), sugiriendo que los productos de bx_d⁺ y pbx⁺ se transcriben, probablemente por medio de un RNA mensajero común, y se traducen juntos. Por otro lado, también algunas combinaciones del mutante bx³ manifiestan efecto polar sobre pbx⁺, sugiriendo también una síntesis coordinada de ambos productos génicos. Además, las mutaciones en Ubx¹ ó Ubx¹³⁰ impiden la función de los alelos normales de bx, pbx ó bx_d en cis. El hecho de que esta inhibición afecten tanto a los genes colocados a la derecha como a la izquierda de Ubx¹ ó Ubx¹³⁰ es difícil de explicar en términos de efecto polar debido a la falta de traducción de los genes situados a la derecha del mutante en un RNA policistrónico. Probablemente las mutaciones en Ubx⁺ actúan impidiendo

do la transcripción del todo el sistema de tal forma que no parece ningún producto traducible de bx¹, bxd⁺ ó pbx⁺. El análisis clonal de la homocigosis para Ubx¹ (ver Sección D) revela que el fenotipo Ubx¹/Ubx¹ es idéntico al de la triple combinación mutante de bx, pbx y bxd, no detectándose ninguna característica específicamente atribuible al locus Ubx y sugiriendo que no existe un producto génico Ubx⁺ sino que su función sería la de permitir la síntesis de los productos génicos de bx⁺, pbx⁺ y bxd⁺.

En el operón de la lactosa, se creyó primeramente (Jacob y Monod 1.961a) que el sitio de iniciación de la transcripción era el mismo operador. Así, a algunas mutaciones que rebajaban el nivel de transcripción, se las llamó operador cero (0°). Posteriormente (Jacob, Ullmann y Monod 1.964), se descubrieron mutaciones en el operador que no rebajaban el nivel de transcripción y se postuló un sitio específico de transcripción, El "promotor", localizado junto al operador, pero en un locus diferente. Posteriormente, Scaife y Beckwith (1.966) han encontrado varias mutaciones en este locus. La posición del "promotor" es a la izquierda del locus del operador (Miller et al. 1.968).

Probablemente las mutaciones del tipo de Ubx¹, representan situaciones parecidas a las de la mutación en un

"promotor" de un operón bacteriano. Sin embargo, y a diferencia del "promotor" de *E. coli*, el gen Ubx no está localizado al comienzo de la serie, sino que deja a su izquierda a los loci de bx y Cbx y a la derecha a bx_d y pbx y sugiriendo que en el caso de ser el locus Ubx donde se inicia la transcripción, esta se verificaría en sentidos opuestos a partir del comienzo.

La mutación Cbx, que mapea inmediatamente a la izquierda de Ubx, presenta de forma dominante un fenotipo que resulta ser el recíproco al de las mutaciones en bx y pbx, transformando las estructuras del mesotórax en las del metatórax. Es interesante hacer notar que a pesar del carácter dominante de la mutación, la deficiencia heterocigótica para el locus de Cbx⁺ no presenta fenotipo Cbx, indicando que la mutación Cbx no equivale a la falta de Cbx⁺, sino que realiza una función específica. Además, por análisis clonal, hemos visto que la combinación Df115/Ubx¹³⁰, que aparentemente representa la falta de función total del sistema bithorax, no produce ningún tipo de transformación en el mesotórax, indicando que muy probablemente no existe función del sistema bithorax en el mesotórax, a pesar de que se requiera la función de un Cbx⁺ para el normal desarrollo mesotórácico. Estos resultados sugieren que Cbx⁺ está relacionado con la represión de la función de los genes del sistema bithorax en el mesotórax. La condición mutante, por lo tanto, llevaría a la derrepresión de esta función. Por otro la

do, el hecho de que algunas mutaciones en cis con Cbx, como $\text{bx}^3 \text{Cbx}/+$ ó $\text{Cbx Ubx}^1/+$ supriman el fenotipo de Cbx, indica que este fenotipo es probablemente debido a la función de los genes estructurales en cis, apoyando la hipótesis de que Cbx representa una mutación constitutiva del operador que conduce a la derepresión de la función de los genes estructurales.

Así pues, la transformación producida por Cbx es debida a la expresión en el mesotórax de la función del sistema bithorax, donde normalmente estaría reprimida. De esta forma, la serie pseudoalélica bithorax estaría organizada funcionalmente de forma similar a los operones bacterianos. Existirían varios genes estructurales, bx^+ , bx^d+ y pbx^+ , junto con otros que controlan la expresión de estos estructurales. Uno de ellos, Ubx^+ , estaría relacionado con la iniciación de la transcripción al modo de un "promotor" y otro Cbx^+ reprime la función de los estructurales en cis, probablemente reconociendo el producto represor de un gen regulador, como en el caso del operón de la lactosa de E. coli (Jacob y Monod 1.961a,b).

Lewis (comunicación personal) supone que la mutación R(pbx) representa una mutación hipomórfica de un gen regulador. Los datos obtenidos por nosotros de que la penetrancia de R(pbx) cuando se enfrenta con Cbx tiene valor cero, apoyan esta hipótesis, ya que la falta de producto del regulador no ten

dría influencia sobre un sistema en condiciones constitutivas debidas a Cbx. Sin embargo, varios otros datos están en contradicción. En primer lugar, la mutación R(pbx) sólo produce, en las condiciones de máxima expresión, un fenotipo pbx y no afecta a bx⁺ ó bxd⁺ sugiriendo que el único gen regulado es pbx y según hemos visto, todos los datos hacen pensar que la síntesis de bx, bxd y pbx, se realiza de forma coordinada y se sintetizan todos los productos génicos simultáneamente y es difícil explicar el porqué en este caso sólo se detecta la falta de pbx⁺. En segundo lugar, hemos visto (Sección B) que en combinaciones genéticas que llevan los genes del sistema bithorax a otro cromosoma, la penetrancia del carácter R(pbx) es muy baja, indicando que la expresión de este carácter mutante requiere la presencia de los alelos del sistema bithorax en su posición normal en el brazo derecho del tercer cromosoma. Como además, la mutación R(pbx) está asociada a una inversión en el brazo derecho del tercer cromosoma, es posible que esta mutación represente un caso extremo de inhibición funcional debido a deficiente apareamiento de los cromosomas homólogos. Sería otro ejemplo de "efecto trans" descrito por Lewis en 1.955. Se puede especular con la posibilidad de que el punto de ruptura proximal estuviera situado entre bxd y pbx y se impediría el apareamiento únicamente en pbx.

En condiciones normales, el sistema bithorax funciona en el metatórax y en el primer segmento abdominal, pero no funciona en el mesotórax. Esto indica que algún tipo de inductor debe existir que impide la represión de Cbx⁺ en el metatórax y primer segmento abdominal, bien directamente ó bien mediante la combinación de un producto genicorepresor. No hay, hasta el momento, ninguna evidencia experimental de la presencia de este inductor. Sin embargo, algunos tipos de tratamientos experimentales aplicados durante el estadio blastodérmico, producen fenocopias de bithorax y postbithorax (Gloor 1.947, Henke y Maas 1.946, Capdevila, no publicado). Estas fenocopias no pueden interpretarse como una inhibición de la capacidad de síntesis de los genes bx⁺ y pbx⁺ ya que la función de estos genes parece ser continua a lo largo de casi todo el desarrollo y resulta difícil explicar porqué las fenocopias sólo se detectan en los tratamientos aplicados en el blastodermo y no posteriormente y además, porqué la continua función de los genes bx⁺ y pbx⁺ no salvan la inhibición producida durante el corto período de tratamiento (10 minutos). Se puede especular que estos tratamientos afectan a la función de un inductor presente en el blastodermo, que normalmente desencadenaría la función de estos genes mediante la eliminación de la represión debida a Cbx⁺ en las células presuntivas del metatórax. Este inductor no existiría en el mesotórax donde la función del sistema bithorax permanecería bloqueada. La falta de este inductor en el

metatórax, debida al tratamiento con eter, permite que Cbx⁺ - continúe reprimiendo en este segmento la síntesis de los productos de bx⁺ y pbx⁺, dando lugar a la fenocopia.

2) La expresión génica en los mutantes de sistema bithorax.

Las transformaciones homeióticas producidas por las diversas combinaciones mutantes del sistema bithorax manifiestan en algunos casos una expresividad total, esto es, todas las células del segmento ó subsegmento manifiestan la transformación, y en otros casos manifiestan una expresividad parcial, - en los cuales el genotipo mutante solamente se manifiesta en una fracción de las células. Los resultados obtenidos en el análisis genético (Sección B) indican que algunos de estos mutantes se pueden considerar como hipomorfos, es decir, producen una cantidad insuficiente de producto normal que conduce a la aparición de un fenotipo de expresión parcial. El análisis de estos fenotipos, revela que la expresividad es variable dependiendo de las regiones del segmento ó subsegmento afectado y está de acuerdo con observaciones sobre otros mutantes homei_óticos. Las causas que conducen a esta expresión fenotípica diferencial permanecen desconocidas por el momento. Pueden existir diferencias regionales en la actividad del gen responsable ó bien los requerimientos del producto génico normal pueden -

ser diferentes en cada una de las regiones.

Posthlewait y Schneiderman, 1969, 1.971, han llevado a cabo un análisis clonal del mutante Anntennapedia, que transforma con expresión variable las estructuras de antena en pata, con objeto de conocer la fenomenología celular de la expresión génica variable de este mutante. Concluyen que el cambio homei^ótico está ligado a un cambio en la determinación, que ocurre en grupos de células del disco mutante en un momento específico, a partir del cual los descendientes heredan esta determinación, de forma que se producen dos linajes celulares separados, uno compuesto de células presuntivas de antena y otro de células presuntivas de pata. El cambio homei^ótico va acompañado del disco mutante por un mayor ritmo de división celular.

Los resultados obtenidos por nosotros (Sección C) en el análisis clonal del mutante Cbx, no se puede explicar según esta hipótesis. En primer lugar, no se ha encontrado evidencia de separación clonal entre las estructuras de ala y halterio en Cbx, ya que se han encontrado clones que engloban ambas estructuras en todos los estadios examinados (excepto en edades muy cercanas a la pupación donde el pequeño tamaño del clon hace muy difícil definirse por el tipo de estructuras diferenciadas) y si existe un momento de determinación este sería muy al final del desarrollo. Sin embargo, si esto fuera así, la cuti-

cula mesotorácica de Cbx se presentaría como un mosaico de pequeños grupos celulares diferenciados en halterio ó ala y distribuidos por toda la cutícula y lo que sucede es que en algunas regiones la manifestación del carácter halterio es total - (por ejemplo la parte posterior), sugiriendo una determinación temprana, y en otras se encuentra gran cantidad de mosaicismo, sugiriendo una determinación tardía.

Estos resultados indican que a diferencia del caso - de Antennapedia, en el caso de Cbx no se detecta un momento es pecífico de determinación que separe de forma irreversible dos diferentes linajes celulares.

En segundo lugar, el ritmo de división no parece jugar un papel en el caso de la transformación homeiótica, ya - que el tamaño de los clones que engloban estructuras de ala y los de halterio, es igual y aún ^{en} los que engloban ambas estructuras, el tamaño relativo de la zona de halterio y ala es al - azar. En este punto hay que hacer notar que en los experimentos de Posthlewait y Scheneiderman no se valora el crecimiento de las regiones de pata y antena del disco mutante y su con clusión se deriva del aparente mayor número de divisiones celu lares que presenta el disco mutante en relación con el disco - normal en los estadios finales de desarrollo.

Nuestra interpretación de la expresividad parcial de Cbx se apoya en los datos obtenidos en el análisis genético del mutante. Como hemos visto, esta mutación conduce a la función de los genes bithorax y postbithorax en el mesotórax, con lo cual éste se transforma, con expresión variable, en metatórax. Sin embargo, el grado de función de bx⁺ y pbx⁺ en cis con Cbx no alcanza el nivel normal, como se deduce de las transformaciones de metatórax en mesotórax que producen las combinaciones de Cbx en trans con los alelos mutantes de Ultrabithorax y con la Df115. Esta hipofunción de bx⁺ y pbx⁺, da lugar a que la transformación homeiótica producida por Cbx, presente una expresión parcial y solamente una fracción del blastema manifieste el carácter mutante. Según esta hipótesis, la expresión del fenotipo Cbx depende del nivel de producto génico de bx⁺ y pbx⁺, presente en cada una de las células del disco al final del desarrollo. Esta interpretación está apoyada además por los resultados obtenidos en los experimentos expuestos en la Sección D, donde se muestra que la normal determinación de las células de halterio puede cambiarse experimentalmente hasta edades muy cercanas al final del desarrollo del disco eliminando el producto génico de bx⁺. Esta hipótesis además, explica la razón de la falta de clonalidad de la expresión mutante, ya que esta no depende de un particular linaje celular, sino de

la presencia, en cada una de las células, de un nivel basal de productos de bx⁺ y pbx⁺.

Esta interpretación, sin embargo, no explica porqué la expresividad varía en las diferentes regiones, aunque es posible que el nivel de actividad génica o los requerimientos celulares muestren diferencias específicas de región.

3) Respuesta celular al cambio en la información genética.

Determinadas variaciones genéticas (mutantes homeióticos), fisiológicas (transdeterminación) o tratamientos experimentales (fenocopias), interfieren con los procesos de determinación celular. Todas estas variaciones, sin embargo, afectan al comportamiento de todo un blastema o una fracción de él, sin ninguna indicación de cómo estas variaciones se expresan en cada una de las células afectadas.

La técnica de recombinación mitótica inducida mediante rayos X nos ha permitido valorar la respuesta de células aisladas al cambio en la información genética producido por varios mutantes homeióticos del sistema bithorax.

Los experimentos descritos en la Sección D, revelan que el cambio genético va acompañado por un cambio en el comportamiento celular que se manifiesta en todas las células des

cendientes de la que ha sufrido el cambio genético. Este cambio en las propiedades celulares, asociado con el cambio genético, da lugar a la adquisición de un nuevo estado de determinación en las células afectadas. Estos resultados permiten concluir que la expresión del estado normal de determinación requiere la presencia, en cada una de las células, de productos génicos específicos. Esta dependencia se mantiene durante la mayor parte del desarrollo del disco excepto en los estadios finales, en los cuales el cambio genético no se acompaña por un cambio en la determinación. Este hecho, perdurabilidad, parece ir asociado a la fenomenología del cambio de la determinación. Así, se ha encontrado (García-Bellido y Merriam 1.971c; Santamaría, Morata y García-Bellido, en preparación) que variables genéticas que afectan a la determinación tricoma-queta, manifiestan perdurabilidad cuando el cambio genético se induce al final del desarrollo. Lo mismo sucede en el caso del mutante homeiótico engrailed (García-Bellido y Santamaría 1.972). En todos estos casos el fenómeno está ligado con la presencia o ausencia de determinados productos génicos, indicando que a partir de un determinado momento, estos productos, que son necesarios para los procesos de determinación, no son ya requeridos (han ejercido su función) y las células muestran una rígida determinación que conduce de forma irreversible a un camino

específico de desarrollo. El momento en que estos genes dejan de ser necesarios puede ser variable en los diversos tipos celulares, así, la aparición de los tricomas mesotorácicos manifiestan mayor perdurabilidad que las quetas mesotorácicas, sugiriendo unos requerimientos diferenciales de productos génicos para ambas estructuras.

El cambio en la determinación producido por los mutantes homeióticos se expresa en la adquisición de las propiedades típicas del nuevo estado. En el caso del mutante engrailed, García-Bellido y Santamaría (1.972) han mostrado cómo las células de la parte posterior del disco mesotorácico mutante crecen durante todo el desarrollo de forma similar a las de la parte anterior del disco, mostrando en disociados, afinidades específicas con ellas. Así pues, la falta de un producto génico específico conduce a la expresión de un nuevo estado de determinación. El análisis llevado a cabo por nosotros en el caso de la transformación producida por los mutantes bx³ y pbx, lleva a la misma conclusión. Como hemos visto, (Sección C), el número de células al principio del desarrollo del disco metatorácico mutante para bx³ y pbx es el mismo que el del disco mesotorácico normal, que es aproximadamente 4 veces mayor que el número de células del disco metatorácico normal. Este resultado indica que el cambio genético debido a la mutación en bitho-

rax y postbithorax condiciona el desarrollo del disco desde el comienzo y durante todo el desarrollo posterior, ya que como se ha visto, el crecimiento del disco metatorácico mutante para bx³ y pbx es idéntico al del disco mesotorácico normal. Asimismo, los clones homocigóticos bx³/bx³ que aparecen en el metatórax normal de moscas bx³/+ adquieren las propiedades típicas del mesotórax, manifestando unas afinidades celulares diferentes de las del metatórax y dando lugar en sus descendientes a la aparición de los patrones típicos mesotorácicos.

De lo anteriormente expuesto, surgen dos conclusiones; 1) los mecanismos responsables de la determinación operan a nivel de células aisladas, la suma de cuyas propiedades define el estado de determinación de un blastema, y 2) los diferentes estados de determinación de un blastema parecen depender de la presencia o ausencia de productos génicos específicos durante la mayor parte del desarrollo.

La respuesta celular al cambio de la determinación muestra una serie de características que orientan sobre procesos que operan en las sucesivas etapas de determinación. Hemos visto (Sección D) que el tipo de estructuras mesotorácicas diferenciadas por los clones homocigóticos para bx³ que aparecen en el metatórax está condicionado por la región metatorácica donde se localiza el clon, estableciéndose una homología entre

regiones mesotorácicas y metatorácicas. Las mismas relaciones de homología se encuentran en el caso de la transformación inversa a la anterior (transformación de mesotórax en metatórax) producido por el mutante Cbx. Estos resultados indican la presencia de una serie de restricciones en las posibilidades prospectivas de las células y sugieren la existencia de una serie de propiedades específicas de las diferentes regiones del disco, que conducen a caminos cada vez más restringidos de desarrollo. Estas propiedades regionales delimitarían los sucesivos estados de determinación y han sido puestas de manifiesto, lo mismo en experimentos de transplatación y cultivo de fragmentos de disco (Hadorn y Buck, 1.962) que mediante análisis clonal (García-Bellido y Merriam 1.971a; Ripoll 1.972; García-Bellido, Ripoll y Morata en prensa). Las relaciones de homología entre diversas regiones del metatórax y mesotórax se pueden explicar suponiendo que algunos de los factores que controlan el normal desarrollo de algunos segmentos son comunes y conducen a propiedades similares en las regiones homólogas.

4) Herencia celular de la determinación.

El análisis experimental del estado de determinación en los discos imaginales mediante las técnicas clásicas de transplatación y cultivo (Hadorn 1.965; Gehring 1.966a) revela que este estado es esencialmente estable y ha permitido de-

finirlo en función de las propiedades de diferenciación prospectivas que manifiestan las células de los diferentes discos o - diferentes regiones de un mismo disco.

La estabilidad de este estado de determinación, aún después de muchas generaciones celulares en cultivo, indica - que la determinación se hereda de una generación celular a - otra y las células están de forma irreversible (excepto cuando se da el fenómeno de transdeterminación) condicionadas en un - particular camino de desarrollo. Sin embargo, hemos visto a lo largo del presente trabajo que el mantenimiento del estado de determinación está condicionado por la presencia de una serie de productos génicos como son los de bithorax y postbithorax - (que controlan el normal desarrollo de las estructuras metatatóricas), bithoraxoid (que controla el normal desarrollo del - primer segmento abdominal), engrailed, ecute, achaete, etc. de tal forma que la falta de cualquiera de estos productos génicos da lugar en las células afectadas a la adquisición de un nuevo estado de determinación. Es decir, la herencia de la determina - ción está condicionada por la presencia, en cada generación ce - lular, de estos productos génicos. Esta conclusión implica que la determinación no es un proceso irreversible, ya que depende del genotipo funcional de las células.

Sin embargo, existe un momento a partir del cual el genotipo celular no afecta a los procesos de determinación. Hemos visto que el cambio genético de $\underline{bx^3/+}$ a $\underline{bx^3/bx^3}$, inducido después de 8 horas antes de la pupación no afecta a la diferenciación prospectiva de las células, que no manifiestan la transformación homeiótica. Este fenómeno de perdurabilidad ha sido descrito también en otras variaciones genéticas que afectan al proceso de determinación (García-Bellido y Merriam 1.971c; García-Bellido y Santamaría 1.972; Santamaría, Morata y García-Bellido, en preparación) e indica que a partir de este momento, las células están ya rígidamente determinadas y no es posible cambiar su diferenciación prospectiva. Solamente en este caso se puede concluir que una célula está determinada y transmitirá esa determinación a sus descendientes.

El mecanismo mediante el cual estos productos génicos conducen a la expresión de un estado de determinación no está totalmente explicado; sin embargo, hemos visto que su función parece consistir en la activación de un grupo de genes responsables de una serie de propiedades celulares que en conjunto definen un estado de determinación. La expresión de estas propiedades celulares requiere continuamente la presencia del producto génico inductor. Estos productos génicos actuarían por consiguiente como "selectores" de la función de otro grupo específico de genes, "realizadores", responsables de cada una de

las propiedades celulares.

Esta hipótesis está apoyada por el análisis de la función de los genes bithorax y postbithorax en el segmento mesotorácico. Estos genes en circunstancias normales no funcionan en este segmento. Cuando, debido a la mutación Cbx, aparecen en el mesotórax los productos de bithorax y postbithorax, las células de este segmento adquieren las propiedades y diferencian las estructuras típicas de metatórax, es decir, la adquisición de estas propiedades (debida a la función de los genes realizadores) se deriva de la presencia de los productos génicos de bithorax y postbithorax.

El hecho de que la transformación debida a Cbx muestra expresividad parcial (debida a la hipofunción de bx⁺ y pbx⁺ en cis) es interesante en este contexto, ya que como hemos visto, se pueden detectar clones que engloban estructuras de halterio y ala iniciados en cualquier estadio de desarrollo, indicando que no existe un suceso de determinación para halterio o ala, o bien, que este fenómeno es reversible y puede cambiar de una generación celular a otra dependiendo de la cantidad, en cada una de las células, del producto génico de bithorax o postbithorax. Por consiguiente, la hipofunción de estos genes hace que en el caso de Cbx no exista una determinación celular heredable para ala o halterio.

Estos resultados indican que el concepto de determinación tal como clásicamente se ha definido a partir de los experimentos de transplatación y cultivo, no tiene validez a nivel genético ya que, en estos experimentos, la herencia celular que manifiesta el estado de determinación se debe a que el genotipo funcional permanece invariado y están presentes en cada una de las células los productos génicos selectores que dan lugar a la función del equipo de genes responsables de cada una de las propiedades que en los experimentos clásicos de transplatación y cultivo definen un estado de determinación.

Estos productos génicos selectores son los que permiten la aparición de sucesivos estados de determinación. Así, los genes del sistema bithorax dan lugar a la función en el metatórax de un equipo génico diferente del que funciona en el mesotórax, engrailed da lugar a la función de un equipo génico específico en la parte posterior de los segmentos torácicos, diferente del que funciona en la parte anterior, los productos génicos de scute y achaete, dan lugar a la función de los genes que controlan la formación de quetas por una fracción de las células de los discos, etc. Probablemente existen otros productos génicos de este tipo que no son conocidos en forma mutante.

Así pues, podemos concluir que la definición experimental del estado de determinación, no es sino la visualización de una serie de propiedades, presentes en determinados grupos celulares, debidas a la función de un equipo génico específico. La actividad de este grupo específico de genes está inducida - por la presencia de otros productos génicos como los de bithorax o engreiled que actuarían como selectores.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se han analizado las características del desarrollo y determinación celular de los segmentos mesotorácico, metatorácico y primer segmento abdominal de *Drosophila*, y la relación de los procesos de desarrollo de estos segmentos con los productos génicos de la serie bithorax.

En primer lugar (Sección A), se describen las estructuras cuticulares que se diferencian en estos segmentos y se estudian mediante análisis clonal los parámetros de crecimiento de las estructuras presuntivas de estas diferenciaciones cuticulares (discosimaginales), tales como ritmo de división celular, número de divisiones celulares, número de células al principio y al final del desarrollo, etc. En el caso del disco metatorácico, este análisis ha sido realizado por primera vez en el presente trabajo, encontrándose que su crecimiento es muy similar al del disco mesotorácico, manifestando un ritmo de división celular de 9,4 - horas/ciclo, iniciando el desarrollo con 12 células y terminando con 5.000-6.000 células y realizándose aproximadamente 9 divisiones celulares.

En el segundo apartado (Sección B), se han estudiado las características de varios mutantes pertenecientes a la serie bithorax, que interfieren con la normal determinación de estos -

segmentos. La organización funcional del sistema bithorax es en varios aspectos muy similar a las de los operones bacterianos. Se han caracterizado y analizado genéticamente mutaciones en genes estructurales como bithorax (bx³), bithoraxoid (bx^d) y postbithorax (pbx) y en varios tipos de genes reguladores de la función de los estructurales como Ultrabithorax (Ubx¹ y Ubx¹³⁰), Contra-bithorax (Cbx) y Regulador de postbithorax (R(pbx)), obteniéndose como principales conclusiones:

1) Las mutaciones bx³, bx^d y pbx muestran diversos grados de hipomorfismo. bx³ es casi totalmente amorfa, mientras bx^d y pbx son mutaciones claramente hipomórficas. Los mutantes bx³ y bx^d manifiestan efecto polar sobre pbx⁺. Este efecto polar, sin embargo, solamente produce una inactivación parcial de pbx⁺.

2) Las mutaciones Ubx¹ y Ubx¹³⁰ manifiestan efecto polar en dos sentidos, afectando la función tanto de los genes colocados a su derecha como de los colocados a su izquierda. En el caso de Ubx¹, el efecto polar produce una inactivación total de los alelos normales de los genes colocados a su derecha (bx^d⁺ y pbx⁺) y una inactivación parcial del alelo bx⁺ colocado a su izquierda. La mutación Ubx¹³⁰ da lugar a la inactivación total de todos los genes conocidos de la serie.

3) La mutación Cbx da lugar a la síntesis de los productos génicos del sistema bithorax en el segmento mesotorácico, donde normalmente no son sintetizados. Este efecto es independiente del número de dosis de Cbx⁺ presentes.

4) La expresividad parcial del genotipo Cbx en el segmento mesotorácico es debida a una hipofunción de los genes estructurales en posición cis.

5) La mutación R(pbx) no es una mutación en un gen regulador. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que probablemente se trata de un nuevo ejemplo de efecto "trans" del tipo de los descritos por Lewis, 1.955.

6) La falta total de función del sistema bithorax solamente afecta el desarrollo de los segmentos metatorácico y primer segmento abdominal.

En el tercer apartado (Sección C) se ha estudiado mediante análisis clonal las propiedades de las células de varios discos imaginales que muestran transformaciones homeióticas debido a algunas combinaciones mutantes del sistema bithorax, obteniéndose como principales conclusiones:

1) Las propiedades de las células de los discos imaginales que sufren la transformación homeiótica son idénticas a las de las células de los discos cuyas estructuras repiten.

2) En el caso de los genes bithorax y postbithorax, su función controla el desarrollo del disco metatorácico desde el periodo de la formación del blastodermo, siendo éste el ejemplo de función más temprana conocida en los genes morfogenéticos.

3) En el caso de transformaciones homeióticas de expresión parcial, como la debida a la mutación Cbx, la diferenciación de un grupo de células manifestando el fenotipo mutante y otro grupo manifestando el fenotipo normal, no se debe a un suceso de determinación que separe ambos grupos celulares en un momento del desarrollo, sino que depende del nivel presente en cada una de las células y al final del desarrollo, de los productos génicos que controlan la transformación.

En el cuarto apartado (Sección D), se ha estudiado mediante análisis clonal la respuesta de células aisladas a un cambio en la información genética del sistema bithorax y cómo este cambio afecta al estado de determinación que poseía previamente la célula. Las principales conclusiones son:

1) El mantenimiento de los estados de determinación típicos del disco metatorácico está condicionado por la presencia, en cada una de las células, de los productos génicos de bithorax y postbithorax. El producto génico de bithoraxoid es requerido a su vez por las células del primer segmento abdominal. La sustitución del alelo normal por el mutante, de cualquiera de estos genes, se expresa en la célula afectada y en sus descendientes mediante la adquisición de un nuevo estado de determinación. Esto indica que la herencia celular de la determinación está condicionada por la presencia de productos génicos específicos.

2) Los productos génicos de bithorax y postbithorax son necesarios durante la mayor parte del desarrollo excepto des

de 8-16 horas antes del comienzo de la pupación. A partir de este momento el cambio en la información genética no se expresa en un cambio en la determinación de la célula afectada y existe una rígida herencia celular del estado de determinación.

3) La información genética previa que poseía la célula condiciona decisivamente su comportamiento posterior al cambio genético, definiendo el tipo de estructuras que esta célula y sus descendientes pueden diferenciar.

4) La expresión de la nueva información genética consiste en la aparición en la célula afectada de las propiedades típicas de un nuevo estado de determinación. Así, el cambio de $\underline{bx^3/+}$ a $\underline{bx^3/bx^3}$ se expresa en la célula del metatórax anterior mediante la adquisición de las propiedades de las células del mesotórax anterior. Algunas de estas propiedades tales como afinidades celulares o formación de patrones morfológicos pueden visualizarse experimentalmente.

5) Se discute el concepto clásico de determinación a la luz de este análisis genético.

R E F E R E N C I A S

- AUERBACH, C. 1936. "The development of the legs, wings and halteres in wild type and some mutants strains of *Drosophila melanogaster*". Trans. Roy. Soc. Eding. 58: 787-815.
- BRIDGES, C.B. 1935. "Salivary chromosome maps". J. Hered. 26: 60-64.
- BRYANT, P.J. 1970. "Cell lineage relationships in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*". Dev. Biol. 22: 389-411.
- _____, SCHEIDERMAN 1969. "Cell lineage, growth and determination in the imaginal leg disc of *Drosophila melanogaster*". Dev. Biol. 20: 263-290.
- BULL, A.L. 1966. "Bicaudal, a genetic factor which affects the polarity of the embryo in *Drosophila melanogaster*". J. Exp. Zool. 161: 221-242.

- CAHN, R.D. 1968 "Factors affecting inheritance and expression of differentiation: Some methods of analysis. En: The stability of the differentiated state".
Ursprung ed. pg. 58-84 Springer-Verlag.
Berlin.
- CHAN, L.N., GEHRING, W. 1971. "Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 2217-2221.
- CHURCH, R., McCARTHY, B.J. 1967. "Ribonucleic acid synthesis in regenerating and embryonic liver. I. The synthesis of new species of RNA during regeneration of mouse liver after partial hepatectomy".
J. Mol. Biol. 23: 459-471.
- DENIS, H. 1966. "Gene expression in amphibian development. II. Release of the genetic information in growing embryos".
J. Mol. Biol. 22: 285-297.

- DOBZHANSKY, T. 1929. "The influence of quantity and quality of the chromosomal material on the size of the cells of *Drosophila melanogaster*". *Wilhem Roux Archiv.* 115: 363-379.
- FRIESEN, H. 1935. "Somatische Delektionen an das X-chromosom von *Drosophila melanogaster*". *Z. Vererbungslehre.* 68: 436-442.
- GARCIA-BELLIDO, A. 1965. "Larvalentwicklung transplantierten Organe von *Drosophila melanogaster* in adultum milieu". *J. Ins. Physiol.* 11: 1071-1078.
- _____, 1966a. "Pattern reconstruction by dissociated imaginal disc cells of *Drosophila melanogaster*". *Dev. Biol.* 14: 278-306.
- _____, 1966b. "Changes in selective affinity following transdetermination in imaginal disc cells of *Drosophila melanogaster*". *Exp. Cell Research* 44: 383-392.
- _____, 1968. "Cell lineage in the wing disc of *Drosophila melanogaster*". *Genetics* 60: 181 (Abstr.).

- _____, 1972a. "Pattern formation in imaginal discs". En:
The Biology of imaginal disks".
Ursprung and Nöthiger eds. pág. 59-91. Springer
Verlag. Berlin.
- _____, 1972b. "Some parameters of mitotic recombination
in *Drosophila melanogaster*".
Molec. Gen. Genetics, 115: 54-72.
- _____, MERRIAM, J.B. 1969. "Cell lineage of the imaginal
discs in *Drosophila gynandromorphs*".
J. Exp. Zool., 170: 61-76.
- _____, _____, 1971a. "Parameters of the wing imaginal
disc development of *Drosophila melanogaster*".
Dev. Biol., 24: 61-87.
- _____, _____, 1971b. "Clonal parameters of the tergite
development in *Drosophila*".
Dev. Biol., 26: 264-276.
- _____, _____, 1971c. "Genetic analysis of cell heredity
in imaginal disks of *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68: 2222-2226.
- _____, RIPOLL, P. and MORATA, G. "Developmental compart-
mentalization of the wing disc of *Drosophila*.
Nature (en prensa).

- _____, SANTAMARIA, P. 1972. "Developmental analysis of the wing disk in the mutant "engrailed" of *Drosophila melanogaster*".
Genetics, 72: 87-104.
- GEHRING, W. 1966a. "Übertragung and Änderung der Determinationsqualitäten in Antennen-scheiben-kulturen von *Drosophila melanogaster*".
J. Embryol. Exp. Morph., 15: 77-111.
- _____, 1966b. "Bildung eines vollständigen Mittelbeines mit Sternopleura in der Antennenregion bei der Mutante *Nasobemia* (Ns) von *Drosophila melanogaster*".
Arch. Julius Kalus-Stift., 41: 44-54.
- _____, 1967. "Clonal analysis of determination dynamics in cultures of imaginal disks in *Drosophila melanogaster*".
Dev. Biol., 16: 438-456.
- _____, 1972. "The stability of the determined state in cultures of imaginal disks in *Drosophila*". En: *The Biology of imaginal disks*.
Ursprung and Nöthiger eds. págs. 35-58. Springer Verlag. Berlin.

- GLOOR, H. 1947. "Phenokopie-Versuche mit ether and Drosophila".
Rev. Suisse Zool., 54: 637-712.
- _____, KOBEL, H. 1966. "Antenapedia (ss^{Ant}) eine homestische mutante bei Drosophila hydei Sturtevant".
Rev. Suisse Zool., 73: 229-252.
- GREEN, M.M. 1959. "Spatial and functional properties of pseudoalleles at the locus "white" in Drosophila melanogaster".
Herdity, 13: 302-315.
- _____, 1963. "Pseudoalleles and recombination in Drosophila". En: Methodology in Basic genetics".
W.J. Burlette ed. Holden-Day, San Francisco.
- _____, GREEN, K.C. 1949. "Crossing-over between alleles at the lozenge locus in Drosophila melanogaster".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 35: 586-591.
- HADORN, E. 1961. "Developmental Genetics and Lethal Factors".
Wiley. New York.

- _____, 1963. "Differenzierung-leistungen wiederholt fragmentierter Teilstücke manlicher Genitalscheiben von *Drosophila melanogaster* nach Kultur in vivo".
Dev. Biol., 7: 617-628.
- _____, 1965. Problems of determination and transdetermination". En: Genetic control of Differentiation".
Brookhaven Symposia Biol., 18: 148-161
- _____, 1966. "Konstanz, Wechsell und Typus der Determination und Diffrenzierung in Zellen aus mannlichen Genitalanlagen von *Drosophila melanogaster* nach Danerkultur in vivo".
Dev. Biol., 13: 424-509.
- _____, BUCK, D. 1962. "Über Entwicklungsleistungen transplantierter Teilstücks von Flügel-imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster*".
Rev. Suisse Zoo., 69: 302-310.
- _____, CHEN, P.S. 1952. "Untersuchungen zur Phasenspezifität der Wirkung von Letalfaktoren bei *Drosophila melanogaster*".
Arch. Julius Klaus-Stift., 27: 147-163.

- HENKE, K., MAAS, H. 1946. "Über sensible Perioden der allgemeinen Körpergliderung von Drosophila".
March Akad. Wiss-Hingen. Math.-Phys. Kl., 1: 3-4.
- JACOB, F. MONOD, J. 1961a. "Genetics regularity mechanisms in the synthesis of proteins."
J. Mol. Biol., 3: 318-356.
- _____, _____. 1961 b. "On the regulation of gene activity".
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26: 193-211.
- _____, WILLMANN, A., MONOD, J. 1964. "Le promoteur, élément génétique nécessaire à l'expression d'un opéron".
C.R. Acad. Sci., 258: 3125-3128.
- KONOPKA, R.J., BENZER, J. 1971. "Clock mutants of Drosophila melanogaster".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68: 2112-2116.
- KAPLAN, W-D. 1953. "The influence of Minutes upon somatic crossing-over in Drosophila melanogaster".
Genetics, 38: 630-651.
- LEWIS, E.B. 1952. "Pseudoallelism of white and apricot in Drosophila."
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 38: 953-961.

- _____, 1955. "Some aspects of position pseudoalleles".
Amer. Natur., 88: 225-239.
- _____, 1963. "Genes and developmental pathways".
Amer. Zool., 3: 33-56.
- _____, 1964. "Genetic control and regulation of developmental pathways". En: The role of chromosomes in development.
M. Locke ed. Acad. Press. New York. pág. 231-252.
- _____, 1967. "Genes and gene complexes". En: Heritage from Mendel".
A. Brink ed. University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin.
- LINDSLEY, D.L., GRELL, D.H. 1968. "Genetic variations of *Drosophila melanogaster*".
Carnegie Inst. Wash. Publ., nº 627.
- LOOSLY, R. 1959. "Vergleich von Entwicklungspotenzen in normalen, transplantierten und unitierten Haltern-imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster*".
Dev. Biol., 1: 24-64.

- MORATA, G. RIPOLL, P. 1973. "The autonomous effect of the Minutes on the division rate of *Drosophila melanogaster* imaginal cells". Enviado a publicar.
- MILLER, J.H., IPPEN, K., SCAIFE, J., BECKWITH? J.R. 1968.
 "The promoter-operation region of the lac operon of *Escherichia coli*.
 J. Mol. Biol., 38: 413-418.
- MULLER, H.J. 1932. "Further studies on the nature and causes of gene mutation".
 Proc. Sixth Intern. Congr. Genetics, 1: 213-255.
- NOTHIGER, R. 1964. "Differenzierungaleitungen in Kombinatens hergestellt aus Imaginalscheiben verschiedener Arten, Geschlechter and Korpersegmente von *Drosophila*".
 Wilhelm Roux Arch., 155: 269-301.
- _____, 1972. "The larval development of imaginal disks".
 EN: The biology of imaginal disks".
 Ursprung and Nöthiger eds. pág. 1-34. Springer-Verlag. Berlin.

- _____, SCHUBIGER, G. 1966. "Developmental behaviour of fragments of symmetrical and asymmetrical imaginal discs of *Drosophila melanogaster*".
J. Embryol. Exp. Morph., 16: 355-368.
- OLIVER, C.P. 1940. "A reversion to wild type associated with crossing-over in *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 26: 452-454.
- OSTER, J.L. 1952. "A developmental study of lethal point mutations induced in spermatozoa of *Drosophila melanogaster* by ultraviolet".
Genetics, 37: 611-620.
- OUWENEEL, W. 1969. "Influence of environmental factors on the homeotic effect loboid-ophthalmoptera in *Drosophila melanogaster*".
Wilhelm Roux Arch., 164: 15-36.
- PATTERSON, J.T. 1929. "Somatic segregation produced by X-rays in *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 16: 109-111.

- POSTLETHWAIT, J.M., SCHNEIEDER MAN, H.A. 1969. "A clonal analysis of determination in Antennapedia, a homeotic mutant of *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64: 176-183.
- _____, _____, 1971. "Patterns formation and determination in the antenna of the homeotic mutant Antennapedia of *Drosophila melanogaster*".
Dev. Biol., 25: 606-640.
- RIPOLL, P. 1972. "The embryonic organization of the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*".
Wilhelm Roux Arch., 169: 200-215.
- RIPOLL, P. GARCIA-BELLIDO, A. 1973. "Cell autonomous lethals in *Drosophila melanogaster*".
Nature New Biology, 241: 15-16.
- RITOSSA, F.M., SPIEGELMAN, S. 1965. "Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 53: 737-745.

- RIZKI, M.T.M. 1952. "Ontogenic distribution of genetic lethality in *Drosophila willinstonii*".
Genetics, 37: 619-620.
- SANTAMARIA, P., MORATA, G., GARCIA-BELLIDO, A. "Effect of the ac, and sc deficiencies of *Drosophila melanogaster* on the differentiation of the imaginal cuticular structures". En preparación".
- SCAIFE, J., BECKWITH, J.R. 1966. "Mutational alteration of the maximal level of lac operon expression".
Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31-403-408-
- SHEARN, A., RICE, T., GAREN, A., GEHRING, W. 1971. "Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of *Drosophila*".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68: 2594-2598.
- STERN, C. 1936. "Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*".
Genetics, 21: 625-630.
- _____, 1940. "The prospective significance of imaginal discs in *Drosophila*".
J. Morph., 67: 107-122.

- _____, 1954. "Two or three bristles".
Amer. Scientists, 42: 213-247.
- _____, RENSCHER, U, 1936. "The effect of the temperature on the frequency of somatic crossing-over in *Drosophila melanogaster*".
Proc. Nat. Acad. USA, 22: 451-453.
- STURTEVANT, A.H. 1929. "The claret mutant type of *Drosophila simulans*: A study of chromosome elimination and of cell-lineage".
Z. Wiss. Zool., 135: 323-356.
- SUZUKI, D.Y., DUCK, P. 1967. "Localization of genetic position and sensitive period of temperature-sensitive lethal mutations on *Drosophila*".
Genetics, 56: 592 (Abstract).
- VILLEE, C. 1946a. "Some effects of X-rays on development in *Drosophila*".
J. Exp. Zool., 101: 261-280.
- _____, 1946 b. "Phenogenetic studies of the homeotic mutants of *Drosophila melanogaster*. IV. Homeotic and "growth rate" genes".
Genetics, 31: 428-437.

- WADDINGTON, C.H. 1940. "The genetic control of wing development in *Drosophila*".
J. Genet., 41: 75-139.
- WELSHONS, W.J. 1958. "The analysis of a pseudoallelic recessive lethal system at the Nocht locus of *Drosophila melanogaster*".
Col. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol., 23: 171-176.
- _____, VON HALLE, E.S. 1962. "Pseudoallelism at the Nocht locus in *Drosophila*".
Genetics, 47: 743-759.
- WHITELEY, A.H., McCARTHY, B.J., WHITELEY, H.R. 1966. "Changing populations of messenger RNA during sea urchin development".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55: 519-526.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1954. "The physiology of insect metamorphosis".
Cambridge University Press, London.
- WILDERMUNTH, H. 1968. "Autoradiographische Untersuchungen zum vermehrungsmunster der Zellen in proliferierenden Russelprimordien von *Drosophila melanogaster*".
Dev. Biol., 18: 1-13.

WRIGHT, R.R.T. 1970. "The genetics of embryogenesis in *Drosophila*".

Advances in Genetics, 15: 261-395.

ZALOKAR, M. 1943. "L'ablation des disques imaginaux chez la larve de *Drosophila*".

Rev. Suisse Zool., 50: 232-236.

.....

FOTOGRAFIAS

Fotografía 1.

Clones de los diferentes mutantes marcadores celulares utilizados, a) y, b) f³⁶, c) Sb⁶³, d) Ki, e) mwh iv.

a



b



c



d



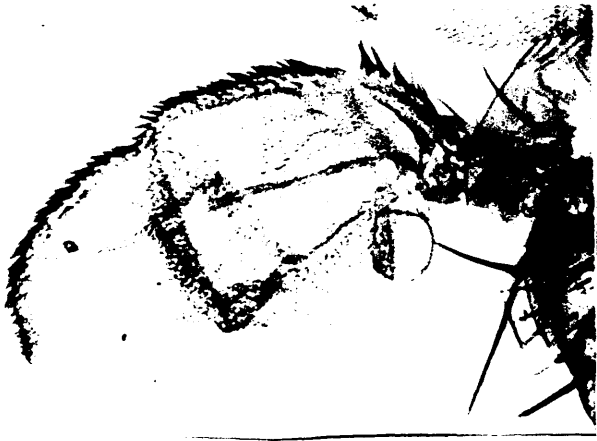
e



Fotografía 2.

Mutantes del sistema bithorax. a) bx³/bx³,
b) pbx/pbx, c) la doble combinación mutante bx³ pbx/bx³ pbx,
d) Ubx¹/+, e) Cbx.

a



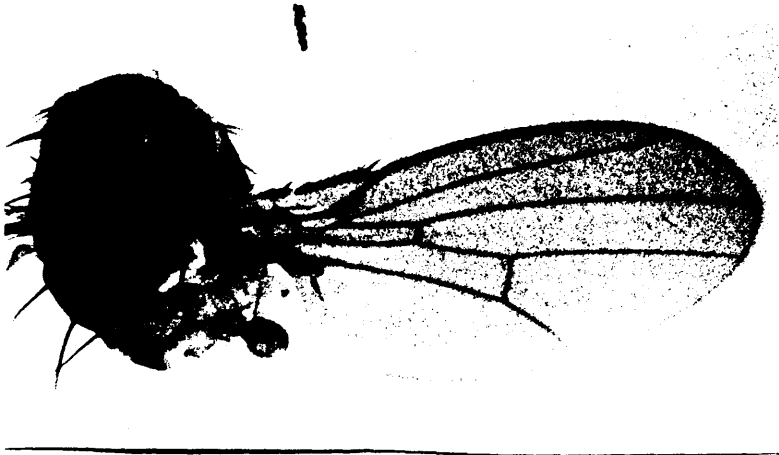
b



c



d



e



Fotografía 3.

Demostración del efecto polar de bx³ sobre pbx⁺:

a) Transformación del halterio de moscas de constitución genética bx³ pbx⁺/Df 115. Obsérvese (flecha) la débil transformación en la parte posterior del halterio; b) Transformación del halterio de moscas de constitución genética bx³/Dp bxd¹⁰⁰ bx⁺ Df 115. La transformación anterior debido a bx³ desaparece debido a la presencia de un bx⁺ en la Dp bxd¹⁰⁰, pero no su efecto polar sobre pbx⁺. Obsérvese (flecha) la presencia de la débil transformación posterior.

a



b



Fotografía 4.

Transformación inducida en el mesonotum de moscas de constitución genética bx³/Ubx¹³⁰: a) El notum mesotorácico normal y el metatorácico debido a bx³ son exactamente iguales; b) Por anomalías en el desarrollo, a veces se produce una fusión cambial entre los segmentos mesotorácico y metatorácico de las moscas bx³/Ubx¹³⁰. En este caso, el heminotum de la izquierda es de origen metatorácico y el de la derecha es mesotorácico, formándose a partir de células de diferentes discos imaginales un notum perfecto.

a



b



Fotografía 5.

Diferentes grados de expresividad del genotipo Cbx entre a) que transforma todo el ala en halterio hasta d) donde solamente se transforma la parte posterior del ala.

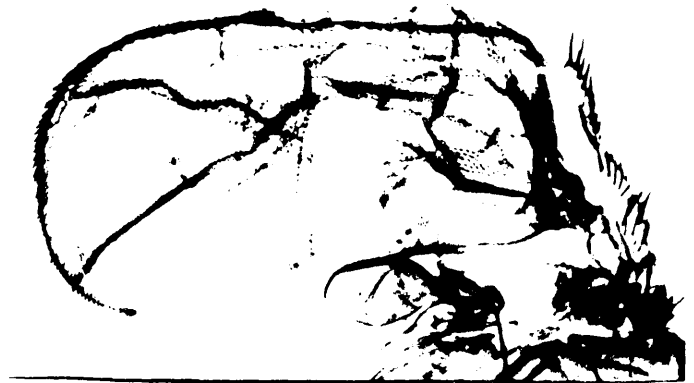
a



b



c



d

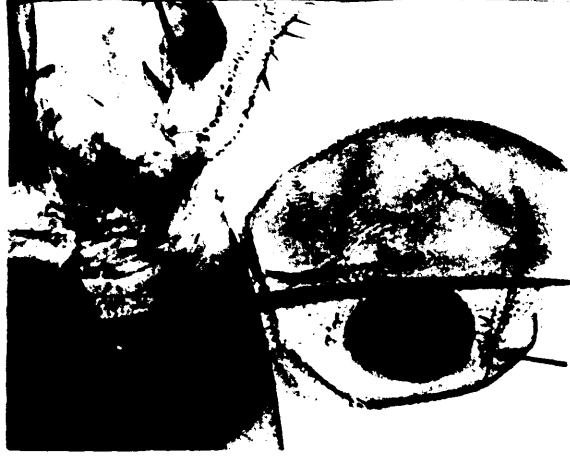
Fotografía 6.-

Diferentes tipos de clones bx³/bx³ aparecidos en el halterio de moscas de constitución genética Df(1) sc⁸; Dpsc^{J4} Dpbxd¹⁰⁰ red bx³/mwh jv bx³ que muestran transformación hacia mesotórax: a) Quetas de la triple fila media; b) Transformación en tricomas de ala. Obsérvese como el clon se ha separado de las estructuras de halterio quedando atrapado dentro del capitulum; c) Estructuras de ala distal originadas clonalmente; d) Estructuras de mesonotum originadas clonalmente.

a



b



c



d



Fotografía 7.

Diferentes tipos de clones Ubx¹/Ubx¹ aparecidos en el halterio de moscas de constitución genética y/+; mwh ju Ubx¹/Sb⁶³ que muestran transformación mesotorácica:

a) Estructuras de costa; b) Ala posterior; c) Triple fila ventral; d) Placa humeral y costa; e) Mesonotum.



a



b



c



e



d

Fotografía 8.

Diferentes grados de expresividad del genotipo R(pbx)/+. Puede variar desde a) Que produce un pequeño grupo de tricomas mesotorácicos, hasta d) Que transforma toda la parte posterior del halterio en parte posterior de ala.

a



b



c



d

