

Hermione Elly Melara de Campos
Bicudo

Estudo Citogenético de Espécies de *Drosophila* do
Complexo Mulleri (Grupo Repleta) com Ênfase à
Regulação da Atividade Organizadora Nucleolar





Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

ESTUDO CITOGENÉTICO DE ESPÉCIES DE DROSOPHILA DO
COMPLEXO MULLERI (GRUPO REPLETA), COM ÊNFASE À
REGULAÇÃO DA ATIVIDADE ORGANIZADORA NUCLEOLAR

Tese apresentada para o concurso de
Livre-Docência junto ao Departamento de
Biologia do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas de São José
do Rio Preto, da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



591/93

São José do Rio Preto
1979



DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, sou casado com a Sra. Maria da Glória

de nascimento e de nacionalidade brasileira, residente e domiciliada em Rua da Liberdade, nº 123, bairro da Liberdade, cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, CEP 01301-000.

Declaro, sob as penas da lei, que a Sra. Maria da Glória é a única e verdadeira esposa com a qual tenho tido e terei filhos, e que não tenho, nem terei, nenhuma outra esposa, atual ou futura, legítima ou ilegítima, em qualquer circunstância.

Declaro, sob as penas da lei, que não tenho, nem terei, nenhum outro filho, legítimo ou ilegítimo, com qualquer pessoa, em qualquer circunstância.

Declaro, sob as penas da lei, que não tenho, nem terei, nenhuma outra filha, legítima ou ilegítima, com qualquer pessoa, em qualquer circunstância.

A meu marido, Luiz Carlos,
e a meus filhos, Luiz André
e Ana Cristina.

PREFÁCIO

O presente trabalho aborda aspectos citológicos envolvidos fundamentalmente com mecanismos reguladores do desenvolvimento e da fisiologia celular, com ênfase, como seu próprio nome indica, a alguns problemas relativos à atividade organizadora nucleolar.

Por essa razão, a Introdução do trabalho é uma revisão referente à síntese nucleolar e seu controle. Não se trata de uma revisão completa; isto requereria muito mais tempo do que o disponível e seria uma tarefa extremamente difícil diante do número de trabalhos que são publicados mensalmente sobre o assunto, em revistas de todas as partes do mundo. Creio, porém, ter abordado seus aspectos fundamentais, ainda que superficialmente.

Os Resultados foram apresentados em ítems, de acordo com os métodos utilizados. Na sua parte inicial, porém, introduzi um item onde procurei caracterizar as espécies analisadas, apresentando principalmente dados de isolamento reprodutivo, citológicos e ecológicos, coletados na literatura ou resultantes de minhas próprias observações. Muitos desses dados foram úteis no desenvolvimento do trabalho ou na interpretação de seus resultados.

A Discussão acompanhou, aproximadamente, a subdivisão dos Resultados. Entretanto, alguns aspectos foram abordados tendo em vista uma visão global dos dados obtidos.

De modo geral, os resultados do presente trabalho abrem, no material analisado, várias frentes passíveis de entrosamento, em um campo ainda aberto a todo tipo de discussão que é a regulação gênica nos eucariotos. Por essa razão, a

credito que o estudo desses problemas deva ter continuidade.



AGRADECIMENTOS

A participação de um concurso de Livre-Docência resulta de uma decisão em um momento de nossa vida profissional, em que, diante da atividade realizada, e avaliando-a, julgamo-nos em condições de aspirar a uma nova posição na carreira universitária. É, portanto, em parte, um momento de retrospectção. Ao realizar essa retrospectção, dentro do princípio verdadeiro de que ninguém é capaz de construir alguma coisa, por mais simples que seja, sem a colaboração de outras pessoas, quero expressar meu reconhecimento a todos os que, em maior ou menor extensão, colaboraram ou têm colaborado comigo no desempenho de minha atividade profissional.

Não vou citar nomes por dois motivos: (1) a lista seria muito longa; (2) eu correria o risco de omitir algum. Quero porém, destacar tres grupos de trabalhos, com seus professores, estagiários e funcionários, os quais tiveram e continuam tendo participação efetiva em minhas atividades: (1) O grupo do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, que despertou em mim o interesse pela pesquisa em Genética de Drosophila, com o qual iniciei minha atividade profissional, em 1958, e que, apesar dos anos decorridos, ainda hoje me recebe com amizade e atenção. (2) O grupo do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde iniciei minha atividade como professora universitária, em 1960; grupo de amigos de todas as horas, criando o ambiente fundamental de compreensão e harmonia; amigos com os quais tenho partilhado por um número maior ou menor de anos, o esforço diário para construir alguma coisa representativa em nosso cenário científico. E, finalmente, (3) o grupo de pesquisas do

Departamento de Zoologia da Universidade do Texas em Austin, U.S.A., onde encontrei amizade, interesse pelo meu trabalho e a abertura necessária para utilização, a qualquer momento, de técnicas mais sofisticadas para complementação de minhas pesquisas.

Tenho, porém, contado ainda com a colaboração de componentes de outros grupos de trabalho, de outros locais e deste Instituto de Biociências; e ainda da Diretoria do Instituto, cujo esforço no objetivo de dotar a Escola de melhores condições, tem beneficiado acentuadamente o trabalho de todos.

Duas entidades de auxílio à pesquisa têm desempenhado papel relevante na minha vida profissional: a FAPESP e o CNPq. A primeira através de bolsas para mim e meus alunos, e vários auxílios; a segunda através da minha primeira bolsa de iniciação científica e através do Projeto Integrado de Genética.

A todos expresso minha profunda gratidão.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
	A. Espécies e linhagens analisadas	26
	B. Métodos de obtenção das larvas	26
	C. Métodos de preparação das lâminas	29
	1. Coloração pela orceína-lacto-acética	29
	2. Coloração pelo nitrato de prata	30
	3. Hibridação "in situ" com RNA ribossômico	33
	D. Número de larvas analisadas	34
	E. Fotografias	35
III.	RESULTADOS	36
	A. Caracterização das espécies analisadas	36
	1. Taxonomia	36
	2. Distribuição geográfica	36
	3. Hibridação em laboratório	38
	4. Hibridação natural	43
	5. Distinção do sexo na fase larvária	45
	6. Constituição cromossômica	46
	a. Análise intraespecífica	46
	b. Análise interespecífica	52
	C. Outras observações sobre a regulação do organizador nucleolar em <u>Drosophila mulleri</u> e <u>D. arizonensis</u> e seus híbridos	61
	1. Em lâminas de indivíduos obtidos de retrocruzamentos, coradas pela orceína-lacto-acética	61
	a. Primeiro Experimento: fêmeas híbridas F ₁ (<u>mu-</u>	

<u>lleri/arizonensis</u>) X machos <u>mulleri</u> e <u>arizo-</u> <u>nensis</u>	63
b. Segundo Experimento: fêmeas híbridas F_1 (<u>mu-</u> <u>lleri</u> X <u>arizonensis</u>) X machos <u>arizonensis</u> .	80
2. Em lâminas de híbridos F_1 e espécies parentais, submetidas à hibridação "in situ" com RNA r ..	99
C. Estudo da relação morfológica entre cromossomos e nucléolos, abrangendo outras espécies do complexo mulleri e alguns de seus híbridos	103
1. Observação em lâminas não coradas ou coradas pelo método da orceína lacto-acética	103
a. Híbridos <u>mulleri/mojavensis</u>	105
b. Híbridos <u>arizonensis/mojavensis</u>	106
c. Híbridos <u>mulleri/aldrichi</u>	109
d. Híbridos <u>mulleri/navajoa</u>	113
e. Híbridos <u>mulleri/wheeleri</u>	120
2. Observações em lâminas submetidas aos métodos de coloração AG-AS e AG-I	122
IV. DISCUSSÃO	137
V. CONCLUSÕES	170
VI. RESUMO	173
VII. SUMMARY	176
VIII. BIBLIOGRAFIA	179

I. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes problemas da biologia moderna é determinar como a expressão gênica é regulada nos eucariotos. Neles, a dificuldade em conhecer os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição resulta, fundamentalmente, da complexidade genética e estrutural de seus cromossomos.

Principalmente a partir de 1965, porém, uma grande quantidade de trabalhos, desenvolvidos por especialistas do mundo inteiro, vem fornecendo as peças que, aos poucos, compõem esse intrincado quebra-cabeças que é o controle gênico nos eucariotos. Questões importantes são formuladas e os métodos de pesquisa vão sendo aperfeiçoados para atender a suas demandas.

A síntese do RNA ribossômico (RNA r) é um dos aspectos da atividade gênica cujo controle tem sido bastante analisado, em vários organismos. Esse interesse decorre do papel fundamental desempenhado pelos ribossomos na fisiologia celular, pelo seu envolvimento na síntese protéica. Em consonância com esse papel fundamental, hoje sabe-se que os organismos dispõem de sistemas reguladores que podem ser acionados para assegurar à célula um suprimento adequado de RNA ribossômico.

Uma das informações básicas relacionadas à síntese do RNA r foi a comprovação, pela técnica da hibridação DNA/RNA, de que o DNA complementar aos componentes ribossômicos 18S e 28S localiza-se na região organizadora nucleolar (em Drosophila, RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965; em Xenopus, BIRNSTIEL & cols., 1966a, WALLACE & BIRNSTIEL, 1966).

O organizador nucleolar (NO) é a região cromossômica com a qual o nucléolo se associa e que é responsável por sua formação (MCCLINTOCK, 1934). A identificação do NO como sen

do o sítio do DNA ribossômico (DNA r) comprovou a idéia de que o nucléolo é o sítio de síntese do RNA r, sobre a qual já havia indicações anteriores (por exemplo, BROWN & GURDON, 1964).

Os nucléolos não são apenas os locais de síntese do RNA r; há evidência de que neles ocorre também a formação das sub-unidades ribossômicas (PERRY, 1965; BIRNSTIEL & cols., 1966b).

Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo mostra quatro componentes: zona granular, zona fibrilar, matriz ou zona amorfa e cromatina associada ao nucléolo (BERNHARD, 1965). As zonas granular e fibrilar são duas formas morfológicamente distintas sob as quais se apresentam as ribonucleoproteínas. Ambas estão em suspensão na matriz que parece ser de natureza proteica. A cromatina associada situa-se em torno do nucléolo e penetra no mesmo.

Os componentes nucleolares são fundamentalmente os mesmos em diferentes vertebrados, invertebrados e vegetais, mas suas quantidades e distribuição variam consideravelmente em diferentes tipos celulares ou em um mesmo tipo celular, dependendo do estado fisiológico do núcleo; essas variações são mais pronunciadas em estados patológicos (BERNHARD, 1965).

A zona fibrilar ocupa a região central do nucléolo. Há indicações de que o precursor do RNA r é sintetizado e processado nessa região, movendo-se depois para a zona cortical do nucléolo onde forma a zona granular (DAS & cols., 1970).

Estudos de microscopia eletrônica em Allium cepa revelaram que a região organizadora nucleolar é estruturalmente muito diferente do restante da cromatina, mostrando áreas mais densas (cromatina condensada) arranjadas em uma zona de densidade mais baixa, rica em ribonucleoproteína (ESPONDA & GIMÉNEZ-MARTÍN, 1974), e que a região NO aparece exclusivamente em con

tacto com a parte fibrilar do nucléolo (ESPONDA & GIMÉNEZ-MARTÍN, 1975).

O primeiro produto da transcrição do DNA r é uma longa molécula precursora que é processada através de uma série de formas intermediárias até chegar às formas maduras (para revisão ver, por exemplo, LOENING & cols., 1969; PERRY & cols., 1970; LEWIN, 1974; SPEIRS & BIRNSTIEL, 1974; DE ROBERTIS & cols., 1975; LEVIS & PENMAN, 1978; MADEN, 1978). O processo de maturação do RNA r inclui, além do processamento em que parte da molécula é perdida, modificações nucleotídicas tais como a conversão de alguns resíduos nucleotídicos de uridina em pseudouridina e a metilação de outros resíduos.

Nos mamíferos, a molécula precursora sedimenta em torno de 45S, é formada de aproximadamente 14.000 nucleotídeos de comprimento e seu peso molecular é de aproximadamente $4,10 \times 10^6$ daltons. A molécula precursora em outros organismos como aves, répteis, anfíbios, peixes, plantas e insetos é menor que a dos mamíferos. Na Drosophila, seu peso molecular foi calculado em $2,85 \times 10^6$ daltons (revisão em LEWIN, 1974).

O processo de maturação da molécula precursora leva, nos vertebrados, à produção de duas moléculas de alto peso, a 28S e a 18S, cujos comprimentos respectivos, nos mamíferos, são de aproximadamente 5.000 e 2.000 nucleotídeos, e uma pequena molécula, a 5,8S, de 158 nucleotídeos de comprimento (revisão em LEWIN, 1974; LEVIS & PENMAN, 1978).

Em muitos organismos, além das moléculas derivadas do processamento da molécula precursora, os ribossomos contêm RNA 5S, que é codificado por outras regiões cromossômicas que não fazem parte do organizador nucleolar e cuja localização já foi determinada em várias espécies de Drosophila (por exemplo, em D. melanogaster, TARTOF & PERRY, 1970), no homem (JOHN-

SON & cols., 1974), em Xenopus laevis (PARDUE & cols., 1973), em Chironomus thummi (BAUMLEIN & WOBUS, 1976), e outros organismos.

Segundo LEVIS & PENMAN (1978), a molécula precursora do ^RRNA r de Drosophila sedimenta em torno de 34S e seu processamento produz uma molécula 26S e uma 19S (de acordo com os autores, esses valores estão sendo presentemente aceitos em substituição aos valores 28 e 18S, para os RNAs r desse organismo). A forma madura do RNA r 26S pode ser separada, sob condições de ⁵denaturação, em quatro constituintes: duas cadeias de aproximadamente 19S, uma de 130 bases, análoga ao RNA r 5,8S dos vertebrados, e uma molécula de 30 bases. Portanto, computando-se também o RNA r 5S, os ribossomos de Drosophila contêm seis moléculas de RNA r em vez de quatro como ocorre nos vertebrados.

Em termos de kb (quilobase), o comprimento da molécula precursora do RNA r, em Drosophila, foi avaliado em 8 kb, e o dos produtos finais de sua maturação, em 4 kb (26 ou 28S) e 2 kb (19 ou 18S) (GLOVER & HOGNESS, 1977).

Os genes para RNA r são reiterados e dispostos em "tandem". Cada unidade consiste de regiões que são transcritas e que se alternam com regiões que não são transcritas (regiões "spacer"). Nos vertebrados, as regiões que são transcritas incluem as sequências que codificam para os RNAs r 18S, 5,8S e 28S, separadas por regiões que são degradadas no processo de maturação; os cistrons 5,8S localizam-se entre as sequências que codificam para os RNAs r de maior peso molecular (SPEIRS & BIRNSTIEL, 1974; MADEN, 1978).

Em Drosophila melanogaster, foi demonstrada a existência de duas unidades gênicas diferentes que codificam para RNA r. Ambas diferem no comprimento — 11,5 kb e 17 kb —, sendo a diferença devida à existência de uma intersecção de 5,4 kb, de função desconhecida, na sequência codificadora do RNA



28S. Esta fica, portanto, subdividida em dois blocos (GLOVER & HOGNESS, 1977; WHITE & HOGNESS, 1977).

Há evidências de uma preservação acentuada das sequências de DNA que codificam para RNA 18S e 28S, no processo evolutivo. O RNA r de Xenopus hibrida com o DNA de uma grande variedade de eucariotos, incluindo o homem (SINCLAIR & BROWN, 1971; BIRNSTIEL & GRUNDSTEIN, 1972; EVANS & cols., 1974). O RNA r de Xenopus liga-se também especificamente, "in situ", ao DNA nucleolar de núcleospolitênicos de dípteros (PARDUE & cols., 1970).

O conservantismo das sequências ribossômicas, contudo, não se estende às sequências "spacer" que são intercaladas entre os cistrons de RNA r. Assim, a homologia entre genes que codificam para RNA 18S e 28S, em eucariotos tão diferentes como plantas e vertebrados, é maior que a homologia das sequências "spacer" de espécies tão próximas como as de Xenopus (BROWN & cols., 1972).

Apesar da semelhança, tem sido possível distinguir a sub-unidade 28S de várias espécies de organismos, por meio, por exemplo, da eletroforese em gel de poliacrilamida; essa diferenciação vem sendo utilizada para analisar a síntese do RNA r em híbridos interespecíficos (BROWN & BLACKLER, 1972; MARSHALL & cols., 1975).

A observação de que os nucléolos geralmente se associam a regiões cromossômicas, visíveis nos cromossomos metafásicos como constrições secundárias, fez com que estas passassem a ser conhecidas, de longa data, como regiões NO (HSU & cols., 1975; PARDUE & HSU, 1975). Os resultados de hibridação com RNA r confirmaram que as constrições secundárias são realmente sítios de DNA r, em muitos organismos. Essa confirmação ocorreu, por exemplo, nos cariótipos de Xenopus (PARDUE, 1974), Drosophi-



la (SCHAFER & KUNZ, 1975), homem (HENDERSON & cols., 1972; EVANS & cols., 1974), chimpanzé (HENDERSON & cols., 1974a), rato (HENDERSON & cols., 1974b), Muntiacus (PARDUE & HSU, 1975), vários outros mamíferos (HSU & cols., 1975), e em Sciaridae (CROUSE & cols., 1977).

Entretanto, nem sempre as constrições secundárias observadas nos cromossomos metafásicos constituem organizadores nucleolares inequívocos. Entre os exemplos contidos na literatura, pode-se mencionar o mamífero Cricetulus griseus (Hamster chinês), portador de uma única constrição secundária localizada no cromossomo X. Esse mamífero mostrou, em experimentos de hibridação, que seus genes ribossômicos estão localizados nas regiões teloméricas de vários autossomos; a constrição secundária do cromossomo X, porém, apresentou uma marcação tão fraca que os autores admitiram que essa região não constitui um NO (HSU & cols., 1975).

Assim, a simples detecção de constrições secundárias nos cromossomos metafásicos não constitui uma forma segura de localizar os organizadores nucleolares. A hibridação "in situ", permitindo situar, nas preparações citológicas, pelo uso de RNA r radioativo, os cistrons ribossômicos, é considerado o processo mais seguro para esse fim. O método requer, basicamente, a denaturação do DNA celular e a renaturação na presença do ácido nucléico isotopicamente marcado, seguindo-se o tratamento autorradiográfico (GALL & PARDUE, 1969, 1971). Entretanto, essa técnica exige condições que não estão ao alcance de qualquer laboratório, razão pela qual tem havido uma crescente utilização de métodos de coloração específicos para o NO.

Dois métodos de coloração vêm sendo empregados na detecção das regiões NO: o método das bandas N (MATSUI & SASAKI, 1973; FUNAKI & cols., 1975) e o da impregnação pela prata



(GOODPASTURE & BLOOM, 1975; HOWELL & cols., 1975; BLOOM & GOODPASTURE, 1976).

A técnica das bandas N envolve a extração seletiva de DNA, RNA e histonas das preparações citológicas, e coloração pelo Giemsa. Como apenas proteínas não-histônicas permanecem, a coloração específica foi atribuída à atuação do corante sobre proteínas residuais ligadas ao NO (MATSUI & SASAKI, 1973; MATSUI, 1974a, b, c). Em cromossomos politênicos de Drosophila melanogaster, as bandas N coincidiram com a região de heterocromatina alfa do cromocentro, a qual foi considerada o sítio do NO por HEITZ, 1934 (FUNAKI & cols., 1975).

Entretanto, a especificidade dessa técnica como marcadora das regiões NO foi posta em dúvida, tendo sido levantada a possibilidade de que as bandas N correspondam não ao próprio NO, mas à heterocromatina adjacente a ele (FAUST & VOGEL, 1974). Em um trabalho mais recente, foi feita a aplicação da técnica a cromossomos politênicos de Chironomus e de Drosophila (HAGELE, 1977). No Chironomus, o padrão de bandas N correspondeu ao padrão de pufes; na Drosophila, a coloração mais intensa ocorreu na heterocromatina alfa, confirmando as observações anteriores. Os resultados foram interpretados como decorrentes da coloração de proteína não histônica que se acumula em regiões cromossômicas geneticamente ativas, e que se encontra presente, também, em um tipo determinado de heterocromatina.

A técnica de coloração pela prata para regiões NO apresenta várias modalidades que receberam nomes diferentes: AG-SAT (HOWELL & cols., 1975), AG-AS (GOODPASTURE & BLOOM, 1975) e AG-I (BLOOM & GOODPASTURE, 1976). A especificidade da técnica foi demonstrada pela sua aplicação a 9 espécies de mamíferos anteriormente submetidos à hibridação "in situ" com RNA r, tendo-se verificado a marcação das mesmas regiões cromossômicas pelas

duas técnicas (GOODPASTURE & BLOOM, 1975). Além desse trabalho, vários outros, realizados com mamíferos (inclusive o homem), empregaram a técnica com sucesso (por exemplo, TANTRAVAHÍ & cols., 1976; VARLEY, 1977). Foi também aplicada a cromossomos de outros organismos, como anfíbios (RAGGHIANI & cols., 1977; RUIZ & cols., 1978) e grilo (HOWELL, 1977; FERREIRA & cols., 1978).

Há indicações de que o processo de coloração pela prata atua sobre proteínas e não sobre DNA ou RNA (HOWELL & cols., 1975; GOODPASTURE & BLOOM, 1975; MILLER & cols., 1977). Um trabalho recente, em que foi utilizada a microscopia eletrônica e a digestão enzimática, revelou que a prata cora um componente da ribonucleoproteína que se localiza fora do organizador nucleolar ou em torno dele, e não um componente do próprio cromossomo (SCHWARZACHER & cols., 1978).

A visualização induzida pela prata tem sido relacionada com a funcionalidade do organizador nucleolar. Estudos de híbridos celulares somáticos homem/rato indicaram que somente as regiões que produzem RNA r, e presumivelmente tenham funcionado como NO na intérfase precedente, coram-se pela prata (MILLER & cols., 1976a, b, 1977). A aplicação da técnica aos cromossomos de ovócito de grilo levou à mesma conclusão, sugerindo que a prata liga-se às proteínas que se associam rapidamente ao RNA r logo após sua transcrição (HOWELL, 1977).

Na maioria dos mamíferos, as regiões NO são encontradas nos autossomos. Em alguns casos, porém, os cromossomos sexuais mostram sequências complementares ao RNA r (PARDUE & HSU, 1975; HSU & cols., 1975). Essa preponderância de sítios DNA r autossômicos, nos mamíferos, foi atribuída a possíveis problemas que poderiam resultar da inativação do cromossomo X nas fêmeas, se esse cromossomo fosse portador daqueles sítios, corroborando essa idéia o fato de que nos mamíferos em que o NO

é ligado ao X, o Y também o apresenta (HSU & cols., 1975).

Já na maioria das espécies de Drosophila, os NOs localizam-se nos cromossomos sexuais. Em D. melanogaster, estão na heterocromatina proximal do cromossomo X e no braço curto do cromossomo Y (KAUFMANN, 1934, 1938, em PARDUE & cols., 1970). Drosophila simulans, críptica de D. melanogaster, apresenta um NO na heterocromatina proximal do cromossomo X, mas não há indicação de que contenha NO no cromossomo Y (DURICA & KRIDER, 1977). Em D. hydei, há um NO no braço esquerdo, inteiramente heterocromático, do cromossomo metacêntrico X. Além desse, outros dois NOs ocorrem no cromossomo Y que é submetacêntrico: um no braço curto e outro na parte distal do braço longo (HEITZ, 1934, em PARDUE & cols., 1970; SCHAFER & KUNZ, 1974, 1975; HENNIG & cols., 1975).

Nos genomas dos mamíferos, os genes ribossômicos podem apresentar-se conforme os seguintes padrões: um único sítio, múltiplos sítios nas áreas da heterocromatina centromérica, múltiplos sítios nos braços heterocromáticos curtos (inclui-se neste padrão o homem), múltiplos sítios nas regiões teloméricas (HSU & cols., 1975). Os autores admitem que o padrão com um único e longo sítio ribossômico seja o mais ancestral em termos de distribuição de DNA r e que subseqüentes inversões e translocações tenham cortado a região e transposto partes para outras posições no mesmo ou em outros cromossomos. Entretanto, os mesmos autores desconhecem se há vantagem seletiva para a sobrevivência da espécie, na existência de sítios múltiplos.

Em geral, o número de NOs é característico de uma espécie. NOs (e nucléolos) adicionais foram, porém, observados em populações naturais de Allium, que apresenta, normalmente, um único par de cromossomos NO (BOUGOURD & PARKER, 1976). Por outro lado, conhece-se, em Xenopus laevis, uma mutação que

reduz o número de nucléolos que nas células normais é dois; homozigotos para a mutação morrem antes de atingir o desenvolvimento completo (FISCHBERG & WALLACE, 1960).

Em uma célula, o número de nucléolos pode corresponder ao número de cromossomos portadores de regiões NO, ou esses cromossomos podem associar-se para formar um só nucléolo. Nas preparações metafásicas mitóticas de cromossomos humanos, esse tipo de associação é frequente e recebe o nome de associação satélite, por envolver as regiões satélites dos cromossomos acrocêntricos (FERGUSON-SMITH & HANDMAKER, 1961). Os cromossomos associados nas preparações metafásicas são frequentemente conectados por filamentos nucleoprotêicos que se estendem entre as regiões NO, ou por restos do nucléolo. Essas associações são consideradas remanescentes da relação desses cromossomos com um nucléolo. Os filamentos que conectam os cromossomos associados contêm DNA r (HENDERSON & cols., 1973).

Foi proposto que a frequência com que um cromossomo é envolvido em associações é uma função de seu conteúdo de DNA r (HENDERSON & cols., 1973). Envolvimento ao acaso indicaria quantidade igual de DNA r nos cromossomos NOs. O comprimento do filamento da região satélite, isto é, da constrição secundária é que está correlacionado com a frequência da associação satélite, e não o tamanho do satélite (SCHMID & cols., 1974). Essa observação está de acordo com o fato de que, nos cromossomos humanos, o DNA r localiza-se na constrição ou filamento, e não parece estar presente nos satélites; cromossomos com filamento longo hibridam algumas vezes mais que os de filamento curto, enquanto o tamanho do satélite não afeta a hibridação (EVANS & cols., 1974).

Dados de MILLER & cols. (1977) também mostraram forte correlação entre a frequência de associação satélite e a

quantidade de material corado pela prata no NO. Os cromossomos com grande quantidade de material corado foram os mais envolvidos em associações.

A frequência do envolvimento cromossômico em as sociações satélite não parece ser, porém, uma simples função do conteúdo de DNA r, pois nem todos os cromossomos mostram uma correlação positiva entre quantidade de hibridação DNA/RNA r e associação satélite (WARBURTON & cols., 1976).

Em preparações meióticas de cromossomos humanos, os 5 bivalentes também podem estar associados com o nucléolo; este fenômeno sugere uma correspondência às associações satélite mitóticas (FERGUSON-SMITH, 1964).

O número de nucléolos, portanto, pode variar, não só dependendo do número de NOs no complemento, como do arranjo cromossômico na intérfase. Em fêmeas do mamífero Potorus tridactylis, cada NO pode organizar um nucléolo separadamente, ou os dois NOs podem dispor-se próximo um do outro e formar um só nucléolo (HSU & cols., 1975). Por outro lado, estudos realizados com o mamífero Cricetulus griseus, em que foi induzida a formação de micronucléolos por tratamento com colchicina, sugeriram que cada cromossomo NO pode organizar um nucléolo (PHILLIPS & PHILLIPS, 1969). Entretanto, o número máximo é raramente atingido em qualquer organismo.

Há aparentemente uma relação entre o grau de diferenciação celular e o número de nucléolos; nas células diferenciadas, que já não se dividem, geralmente predomina um nucléolo único, mesmo que o organismo seja portador de NOs múltiplos, enquanto nas células em ativo crescimento ou menos diferenciadas, predomina uma atividade dos NOs em separado (HSU & cols., 1975).

Indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar

nucléolos de tamanhos diferentes ou quantidades diferentes de ribonucleoproteína associada aos NOs (MACGREGOR, 1965). O uso das técnicas de hibridação vieram demonstrar que nas células diplóides contendo NOs com níveis de redundância diferentes, os tamanhos relativos dos nucléolos que se formam são proporcionais ao número de genes em cada NO (em Bufo marinus, MILLER & BROWN, 1969; em Xenopus laevis, MILLER & GURDON, 1970; em Zea mays, PHILLIPS & cols., 1971; em Chironomus tepperi, EIGENBROD, 1978). Entretanto, em Ambystoma mexicanum não foi possível atribuir à perda de genes ribossômicos, uma mutação que determina redução do tamanho do nucléolo em certas fases do desenvolvimento do embrião; os autores atribuem essa redução a algum mecanismo regulador (SINCLAIR & cols., 1974).

A evidência de que a quantidade de DNA r varia, não só entre as espécies, mas também entre os indivíduos de uma mesma espécie, originou-se inicialmente de observações quanto ao comprimento do organizador nucleolar e à quantidade de ribonucleoproteína a ele associada (por exemplo, em anfíbios, MACGREGOR, 1965). Posteriormente, o emprego das técnicas de hibridação "in situ" com RNA r mostrou a existência de incorporação diferencial nas regiões organizadoras nucleolares de cromossomos homólogos. Diferenças individuais quanto à quantidade de DNA r foram também indicadas pela técnica de hibridação em filtro (GILLESPIE & SPIEGELMAN, 1965). A utilização das duas técnicas de hibridação permitiu que a variabilidade intraespecífica fosse verificada em vários organismos, entre os quais, os anfíbios (por exemplo, MACGREGOR & KEZER, 1971; MACGREGOR & WALKER, 1973; MILLER & BROWN, 1969; MILLER & KNOWLAND, 1970; MACGREGOR & cols., 1977; SINCLAIR & cols., 1974), o homem (por exemplo, HENDERSON & cols., 1972; EVANS & cols., 1974; WARBURTON & cols., 1976; DITTES & cols., 1974), a Drosophila (por exemplo, RITOSSA & cols., 1966,

1976), e vegetais (FLAVELL & SMITH, 1974; CULLIS & DAVIES, 1975).

A quantidade de DNA r nos cromossomos humanos difere não só entre cromossomos homólogos como também entre os diferentes acrocêntricos de um mesmo indivíduo, sendo as diferenças hereditárias (EVANS & cols., 1974; DITTES & cols., 1974).

Em alguns casos conhecidos, o decréscimo da quantidade de DNA r, abaixo de um certo limite, leva a modificações fenotípicas visíveis. Em Drosophila, associa-se ao fenótipo "bobbed" (RITOSSA & cols., 1966) e em Sciara, ao fenótipo "wavy" (GERBI, 1971). Assim, quando o número de genes para RNA é baixo, a síntese de RNA r é inadequada e incompatível com um desenvolvimento normal.

A literatura vem acumulando um crescente número de trabalhos que demonstram a existência de mecanismos reguladores que atuam no sentido de permitir à célula sintetizar quantidades de RNA r condizentes com seu nível de atividade. Alguns desses mecanismos regulam o número de genes para RNA r.

De modo geral, se a capacidade de transcrição de um único gene for insuficiente para suprir a demanda de seu produto em determinada fase do desenvolvimento, este problema pode ser solucionado, ao nível gênico, pela reiteração do gene no lote haploide ou pela amplificação seletiva do gene no estágio crucial do desenvolvimento (RUTTER & cols., 1973).

A reiteração dos genes para RNA r foi demonstrada em diversos organismos pela cinética da hibridação (por exemplo, em Drosophila, RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965; em abóbora, MATSUDA & SPIEGEL, 1967; em Xenopus, BIRNSTIEL & cols., 1968; em Sciara, GERBI, 1971). Mas, além da reiteração, os cistrons ribossômicos apresentam também amplificação. Essa amplificação foi observada no núcleo de ovócitos de anfíbios, de insetos e de vários outros animais inclusive o homem (por exemplo, BROWN

& DAWID, 1968; EVANS & BIRNSTIEL, 1968; GALL, 1968, 1969; GALL & cols., 1969; LIMA-DE-FARIA & cols., 1969, 1973; STAHL & cols., 1975). A amplificação nos ovócitos é aparentemente necessária para a intensa síntese de RNA r que ocorre no seu período de crescimento, e pode ter sido selecionada no processo evolutivo porque a reiteração dos genes ribossômicos, no nível da amplificação encontrada nos ovócitos de alguns organismos, resultaria em pelo menos 50% do genoma codificando para uma única função (RUTTER & cols., 1973).

Por exemplo, em Xenopus laevis, calcula-se entre 450 e 610 o grau de reiteração dos genes para RNA r, por complemento haploide de célula somática (BROWN & WEBER, 1968; DAWID & cols., 1972). Na vesícula germinativa, após a amplificação, a quantidade de DNA r (5,3 pg) corresponde a aproximadamente 1.500 vezes a quantidade presente no lote haploide de célula somática (0,0035 pg) (BROWN & DAWID, 1968).

Em Xenopus o DNA r amplificado fica localizado fora do cromossomo, em múltiplos nucléolos presentes no núcleo do ovócito. Enquanto as células somáticas contêm um só nucléolo por lote haploide de cromossomos, derivado de uma região organizadora nucleolar, o ovócito contém aproximadamente 1.000 nucléolos (BROWN & DAWID, 1968). A atividade sintetizadora do DNA r contido nesses nucléolos foi visualizada ao microscópio eletrônico (MILLER & BEATTY, 1969).

A replicação seletiva do DNA r nos ovócitos de anfíbio ocorre no paquíteno. As cópias do DNA r amplificado persistem até um estágio posterior da maturação do ovócito, quando então os nucléolos se fundem e o DNA r é degradado (BROWN & DAWID, 1968).

Nos ovócitos humanos, na fase de diplôteno, há, geralmente, um número máximo de 3 nucléolos e numerosos micrónu

cléolos que denotam amplificação dos cistrons ribossômicos (STAHL & cols., 1975). Enquanto os nucléolos associam-se aos cromossomos acrocêntricos (NOs), os micronúcléolos aparecem conectados a regiões de heterocromatina constitutiva. Como essa observação opõe-se à clássica noção de inércia genética da heterocromatina, os autores admitem que as regiões de heterocromatina sejam inativas nos cromossomos das células somáticas, mas apresentem a capacidade de funcionar como organizadores nucleolares nos ovócitos, quando aumenta a necessidade de RNA r.

Nos ovócitos humanos, portanto, a amplificação parece estar a cargo de organizadores nucleolares secundários.

Nos ovócitos de Acheta (Orthoptera), a amplificação ocorre em cromômeros dos cromossomos 6 e 11. As cópias do DNA r amplificado desprendem-se desses cromômeros, com a concomitante diminuição de seus diâmetros (LIMA-DE-FARIA & cols., 1973).

Nos insetos com ovários meroísticos, como é o caso da Drosophila, há uma situação diferente (revisão em GEHRING, 1976). Uma pequena síntese de RNA r ocorre nos ovócitos. Entretanto, as células nutritivas poliploides produzem grandes quantidades de RNA que parecem ser transferidas para o ovócito pelos canais intercelulares que as comunicam com este. Acredita-se que esse RNA seja predominantemente ribossômico (MERMOD & cols., 1977). Como as células nutritivas são poliploides, coloca-se, nesse caso, a questão da existência ou não de amplificação dos genes ribossômicos. Há indicações de sub-replicação desses genes nos núcleos das células nutritivas e das células foliares de Drosophila hydei (RENKAWITZ & KUNZ, 1975). Sub-replicação do DNA r foi também observada no ovário de pupas de D. virilis (ENDOW & GALL, 1975). Entretanto, há dados que mostram ocorrência, nas câmaras de ovos de D. melanogaster, de aumento

da síntese de RNA r paralelamente a um aumento do número de genes ribossômicos (MERMOD & cols., 1977). Esses aumentos foram atribuídos à poliploidização dos núcleos das células nutritivas.

Vários trabalhos têm indicado a existência de um controle para a replicação do DNA r, nos cromossomos politênicos, à parte do mecanismo que regula a replicação do DNA eucromático ou do DNA heterocromático (SPEAR & GALL, 1973; SPEAR, 1974). Isto permite que a quantidade de DNA r seja diferente da quantidade dos demais DNAs.

Os valores de saturação para hibridação dos RNAs r 18S e 28S mostraram que, nas células politênicas de Drosophila, o DNA r correspondente apresenta-se sub-replicado em relação ao DNA eucromático (HENNIG & MEER, 1971; SPEAR & GALL, 1973). Em D. hydei, a replicação do DNA r na politenização dos cromossomos salivares corresponde a 1/8 da replicação do DNA eucromático (HENNIG & MEER, 1971).

Contudo, há dados que indicam amplificação do DNA ribossômico nos cromossomos politênicos. Nos Sciaridae, a presença de micronucléolos em células politênicas foi interpretada como resultado de uma possível amplificação do DNA r (DA CUNHA & cols., 1969). Posteriormente, foi demonstrada a presença de cistrons para RNA r nesses micronucléolos (PARDUE & cols., 1970; GERBI, 1971). Entretanto, os valores de saturação DNA/RNA r obtidos para tecidos de Rhynchosciara com e sem micronucléolos não acusam amplificação do DNA r acima do nível das células diploides (GERBI, 1971). Esses cistrons ribossômicos existentes fora do cromossomo foram explicados como sendo provavelmente devidos ao destacamento de partes do organizador nucleolar de sua localização cromossômica original. Entretanto, permanece a possibilidade de que a formação dos micronucléolos poderia ocorrer para ajustar, ao nível normal, o DNA r sub-replicado pela poli-

tenia (GERBI, 1971).

A amplificação dos cistrons ribossômicos ocorre também como mecanismo compensatório em situações de deleção parcial ou completa de um organizador nucleolar. Em D. melanogaster, indivíduos portadores de menos de 130 genes para RNA r 18S e 28S apresentam o fenótipo "bobbed", já mencionado, que se caracteriza por cerdas menores, cutícula quitinosa mais fina e aumento do tempo de desenvolvimento (RITOSSA & cols., 1966; HENDERSON & RITOSSA, 1970). Machos portadores de deleção em ambos os cromossomos sexuais podem reverter ao fenótipo selvagem, depois de algumas gerações, com aumento concomitante do número de cistrons ribossômicos, aparentemente no próprio locus "bobbed". Esse fenômeno recebeu o nome de magnificação (RITOSSA, 1968; HENDERSON & RITOSSA, 1970). Como mecanismo para explicar a magnificação foi aventada a hipótese de troca desigual entre cromátides irmãs, chamada pelo autor hipótese USE ("unequal sister exchange") (TARTOF, 1974).

Em fêmeas de D. melanogaster normais há cerca de 250 genes para RNA r por região organizadora nucleolar. Quando essa região está presente em dose única (machos XO ou XYbb⁻, ou fêmeas XXNO⁻) o número de genes ribossômicos aumenta para aproximadamente 400. Esse aumento foi explicado como devido a um mecanismo de replicação desproporcional, capaz de superar uma deficiência do número de genes para RNA r, de forma análoga à amplificação dos genes ribossômicos nos ovócitos (TARTOF, 1971, 1973, 1974).

Tanto a magnificação como a replicação diferencial envolvem o aumento da quantidade de moldes presentes para transcrição, sendo, ambos os processos, provavelmente, manifestações de um mesmo princípio regulatório básico. Mas a replicação diferencial, diferentemente da magnificação, ocorre no cro

mosso X normal e em uma única geração. Além disso, enquanto a replicação diferencial é restrita às células somáticas, a magnificação ocorre nas células germinativas.

Entretanto, testes de conteúdo de DNA r em extrato de tecidos separados uns dos outros, em vez de extrato total da mosca adulta (como foi utilizado por TARTOF) não confirmaram aumento de DNA r nos tecidos diploides de indivíduos XO, indicando a possível influência de tecidos politênicos nos resultados daquele autor (SPEAR, 1974).

O mutante "bobbed" ocorre também em outras espécies de Drosophila. Em D. hydei comporta-se, do ponto de vista genético, como em D. melanogaster, e da mesma forma que nesta espécie, algumas linhagens "bobbed" de D. hydei são instáveis, revertendo ao normal (HESS, 1976).

Magnificação dos genes ribossômicos, provavelmente análoga à verificada nos mutantes "bobbed" de Drosophila, foi observada em Saccharomyces cerevisiae deficiente para 25% dos genes ribossômicos (KABACK & HALVORSON, 1977).

A regulação do conteúdo ribossômico dos eucariotos está, porém, sujeita a mecanismos que atuam em outros níveis além do controle numérico dos genes que codificam para os diferentes RNAs r. A transcrição, o processamento da molécula precursora, a síntese e a reunião dos demais componentes ribossômicos, e mesmo o "turnover" ribossômico, são alguns dos aspectos do problema passíveis de regulação (revisão em PERRY, 1973).

A inexistência de relação direta entre quantidades de DNA r e de RNA r, detectada em alguns mutantes "bobbed", sugere a atuação de mecanismos reguladores (SHERMOEN & KIEFER, 1975). Os autores basearam-se em exemplos conhecidos de regulação da transcrição em D. melanogaster e na falta de exemplos naturais de controle do processamento do RNA para propor a exis-

tência de uma região cromossômica externa e adjacente ao DNA r, a qual afetaria sua transcrição.

Por outro lado, foi analisado um mutante "bobbed" cujo conteúdo de DNA r e cuja atividade sintética de RNA r não diferem dos da linhagem selvagem (MARRAKECHI, 1974). Como os dados indicaram também uma degradação específica do RNA r 28S no processamento do precursor, o autor admitiu a existência de um defeito qualitativo na molécula transcrita.

Indicação de mecanismos reguladores atuando em outro nível que não o do número de moldes disponíveis para transcrição foi também apresentada no caso, já referido, da variação de tamanho do nucléolo em Ambystoma (SINCLAIR & cols., 1974).

Os métodos de coloração pela prata também evidenciaram mecanismos de regulação dessa natureza, em alguns organismos. No homem, embora o DNA r tenha sido detectado, por hibridação "in situ", em todos os cromossomos acrocêntricos (WARBURTON & cols., 1976), os métodos de coloração pela prata mostram cromossomos com pouca ou nenhuma coloração, sugerindo a possibilidade de que esses resultados sejam decorrentes de uma proporção de NOs inativos que não se coram apesar da presença do DNA r (TANTRAVAHÍ & cols., 1976; MILLER & cols., 1977).

MILLER & cols. (1977) observaram que o número de acrocêntricos humanos corados pela prata varia entre as células de um mesmo indivíduo, sendo que os cromossomos não corados não ocorrem ao acaso. Esses autores obtiveram números modais de acrocêntricos corados, por indivíduo, que variaram de 5 a 9 na amostra analisada. Também variou a intensidade de coloração para um mesmo cromossomo e entre diferentes cromossomos. Os autores interpretaram esses resultados como decorrentes, em parte, da diferença de conteúdo de DNA r, mas em parte, como efeito da regulação da expressão desses genes.

O estudo de híbridos trouxe informações importantes sobre os mecanismos reguladores da atividade organizadora nucleolar ao nível da transcrição. Tornou-se evidente, por exemplo, a existência de dominância do organizador nucleolar nesses indivíduos.

A dominância nucleolar foi descrita em híbridos vegetais (de Salix, WILKINSON, 1944; de Ribes, KEEP, 1962; de Crepis, NAVASHIN, 1934, em DURICA & KRIDER, 1978; WALLACE & LANDRIDGE, 1971; DOERSCHUG & cols., 1976), em híbridos animais (de Xenopus, BROWN & BLACKLER, 1972; HONJO & REEDER, 1973; CASSIDY & BLACKLER, 1974; de Drosophila, BICUDO & RICHARDSON, 1977; DURICA & KRIDER, 1977, 1978), e em híbridos celulares somáticos homem/roedores (ELICEIRI & GREEN, 1969; MARSHALL & cols., 1975; CROCE & cols., 1977; MILLER & cols., 1976a, b; BRAMWELL & HANDMAKER, 1971).

Nos casos analisados, em que a hibridação é possível em ambas as direções de cruzamento, a origem específica do NOR dominante manteve-se a mesma. Por exemplo, em híbridos Xenopus laevis/X. mulleri, o DNA r amplificado, nos ovócitos, é o de X. laevis, mesmo quando proveniente do pai. Essa independência do DNA r amplificado, em relação à origem específica da mãe, permitiu que se pudesse atribuir a um mecanismo de cópia cromossômica, a amplificação que ocorre nos ovócitos, eliminando-se a possibilidade de amplificação a partir de um epissomo que envolveria herança citoplasmática (BROWN & BLACKLER, 1972). A maneira não linear com que o DNA r se acumula, durante a amplificação, sugere que as cópias cromossômicas sejam sintetizadas por um mecanismo de "cascata" ("cascade"), em que as moléculas de DNA r amplificadas servem de molde para a replicação seguinte (BROWN & BLACKLER, 1972). Nesses híbridos de Xenopus, a dominância nucleolar manifesta-se também nos tecidos somáticos;

neles, o RNA r transcrito é o de X. laevis (HONJO & REEDER, 1973; CASSIDY & BLACKLER, 1974).

Nos híbridos de Drosophila melanogaster e D. simulans ocorre, nos neuroblastos, supressão da constrição nucleolar do cromossomo X de D. simulans, também independentemente da direção de cruzamento. A dominância nucleolar foi observada em 80 a 100% das células examinadas (DURICA & KRIDER, 1977).

A situação verificada nos híbridos interespecíficos vegetais é semelhante a essa. Nos híbridos de Crepis capillaris e C. dioscorides ocorre supressão da constrição secundária associada com a formação do nucléolo, do cromossomo derivado de C. dioscorides (DOERSHUG & cols., 1976). Neste caso foram efetuadas medidas do conteúdo de DNA r das espécies parentais e híbridos, as quais indicaram que a hibridação não altera o número de genes ribossômicos. Segundo os autores, esses resultados sugerem que a supressão do organizador nucleolar deve ocorrer ao nível da transcrição.

Resultados diferentes foram obtidos em Drosophila melanogaster, D. simulans e seus híbridos. As fêmeas híbridas apresentaram aproximadamente 73 genes acima do valor previsto a partir das medidas das espécies parentais, podendo, esse aumento, representar uma resposta à deficiência funcional (DURICA & KRIDER, 1977).

Os híbridos Ribes nigrum/R. grossularis mostraram ausência de constrição secundária de R. nigrum e um único nucléolo no final da divisão celular. Em algumas células foi visto um pequeno nucléolo adicional associado ao cromossomo de R. grossularis (KEEP, 1960, 1962).

A perda de constrição satélite foi também observada nos híbridos F_1 de várias espécies de Salix, tendo sido possível, em alguns casos, diagnosticar a espécie parental cujo sa

télate foi suprimido (WILKINSON, 1944). Em F_2 , porém, a atividade nucleolar foi normal, sugerindo que o efeito da hibridação não se estende além da primeira geração.

Em todos esses casos, configura-se uma situação de repressão alélica, em que a presença do DNA r de uma espécie suprime a atividade do DNA r da outra.

Nos híbridos melanogaster/simulans, a expressão da dominância nucleolar é dependente da presença de um cromossomo X de D. melanogaster. A constrição nucleolar aparece no X de D. simulans, em machos híbridos XO, nos quais o X de D. melanogaster está ausente (DURICA & KRIDER, 1977). Um estudo posterior em que deficiências heterocromáticas em torno ou incluindo o NO dos cromossomos X e Y foram utilizadas, indicou, porém, que a presença do NO de melanogaster é insuficiente para estabelecer a dominância nucleolar. Esta depende da presença de pelo menos uma região heterocromática, localizada na região proximal em relação ao NO do cromossomo X e distal em relação ao NO do cromossomo Y. A expressão da dominância nucleolar nesses híbridos, não resulta, portanto, de uma relação entre os próprios DNAs ribossômicos (DURICA & KRIDER, 1978).

Em híbridos de Xenopus, tanto o citoplasma como o DNA r de X. laevis podem reprimir a atividade do DNA r de X. mulleri (HONJO & REEDER, 1973). Mas, enquanto a repressão na presença de DNA r de X. laevis é permanente, a repressão exclusivamente pelo citoplasma dessa espécie é transitória.

Nos heterocárions homem/rato, ambos os tipos de RNA r 28S estão presentes; nos sincárions, porém, ocorre eliminação cromossômica e supressão da atividade do DNA r de uma das espécies (ELICEIRI & GREEN, 1969; BRAMWELL & HANDMAKER, 1971; MARSHALL & cols., 1975; MILLER, 1976b). A origem específica do DNA r suprimido variou com a origem específica dos cromossomos

eliminados. Nos sincârons que eliminaram preferencialmente cromossomos de rato, os organizadores nucleolares humanos permaneceram ativos; nos sincârons em que cromossomos humanos foram eliminados, apenas RNA r 28S de rato foi produzido.

Os resultados foram atribuídos a um efeito da proporção de certos cromossomos humanos e de rato, determinando a origem específica do organizador nucleolar a ser suprimido (MILLER & cols., 1976b). Os organizadores nucleolares da espécie que teve cromossomos eliminados, mesmo presentes não são ativos; o método AG-AS mostra ausência de coloração nesses cromossomos.

Da mesma maneira que nos híbridos celulares homem/rato, heterocârons homem/hamster produzem RNA r 28S de ambas as formas parentais, enquanto os sincârons que eliminaram cromossomos humanos contêm apenas RNA r 28S de hamster (MARSHALL & cols., 1975).

Aparentemente, constitui regra geral nos sincârons homem/roedores, que somente sejam ativos os genes DNA r da espécie cujos cromossomos são retidos predominantemente.

Os trabalhos mencionados mostraram a existência de vários processos que visam dotar os organismos de níveis de RNA r compatíveis com sua atividade, atuando diferentemente em diferentes organismos, tipos celulares e fases do desenvolvimento. Algumas vezes são mecanismos utilizados normalmente, outras vezes são mecanismos de reserva, acionados apenas para corrigir distorções e cuja existência, em alguns casos, revela-se mais facilmente através dos híbridos.

Os estudos realizados em Drosophila mulleri, D. arizonensis e seus híbridos sugeriram que processos descritos em diferentes organismos podem fazer parte do sistema regulador de reserva de uma única espécie e podem ser acionados de acordo

com as exigências do momento (BICUDO & RICHARDSON, 1977). Os híbridos das espécies mencionadas apresentaram, simultaneamente, dominância interespecífica do sistema regulador do NO e ativação de um organizador nucleolar secundário associada à amplificação gênica.

As observações efetuadas nos cromossomos politênicos das glândulas salivares desses híbridos mostraram que, embora nas fêmeas e machos de ambas as espécies ocorra uma associação evidente do cromossomo X ao nucléolo, nas fêmeas híbridas um único X, o de arizonensis, mostra essa associação. Nos machos híbridos, um dos elementos do par de microcromossomos sofre uma amplificação de até mais de 4 vezes seu conteúdo normal de DNA. Ao mesmo tempo, esse microcromossomo amplificado passa a mostrar uma associação muito frequente com o nucléolo. Às vezes, um corpúsculo semelhante ao nucléolo aparece ligado ao microcromossomo amplificado, quando este não se encontra associado ao nucléolo normal.

Essas observações foram interpretadas como indicativas de uma dominância do sistema regulador do organizador nucleolar de D. arizonensis sobre o de D. mulleri. Como os cruzamentos das duas espécies só produzem descendentes na direção fêmeas mulleri X machos arizonensis, todos os machos híbridos são portadores do cromossomo X de mulleri. Se a dominância ocorresse apenas ao nível dos organizadores nucleolares e não ao nível do sistema regulador do mesmo, o X de mulleri deveria assumir inteiramente a função de organizador nucleolar nesses machos. No entanto, um microcromossomo (há alguma evidência de que se trata do microcromossomo de arizonensis) sofre um processo de amplificação e passa a atuar como um organizador nucleolar secundário.

Os autores admitiram que o cromossomo X e o micro

cromossomo de D. arizonensis contêm cistrons ribossômicos e o sítio regulador da supressão do NO de D. mulleri e que o NO localizado no microcromossomo de D. arizonensis é regulado pelo cromossomo X da mesma espécie.

O presente trabalho contém resultados obtidos posteriormente, com dois objetivos principais: (1) Testar hipóteses aventadas no trabalho anterior e ampliar as informações sobre os fenômenos observados, (a) pela análise dos descendentes de retrocruzamentos das fêmeas híbridas F_1 (mulleri/arizonensis) com as espécies parentais, em preparações citológicas coradas pela orceína lacto-acética e (b) pela hibridação "in situ" DNA/RNA r de fêmeas híbridas F_1 e espécies parentais; (2) Verificar se o padrão de regulação da atividade organizadora nucleolar observado nos híbridos mulleri/arizonensis repete-se total ou parcialmente, ou mostra novas facetas, em híbridos dessas espécies com outras do mesmo complexo, em preparações citológicas coradas com orceína lacto-acética ou com nitrato de prata. Por esta análise pretendeu-se, também, verificar se o padrão de regulação da atividade organizadora nucleolar sofreu modificações no processo de diferenciação das espécies analisadas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Espécies e linhagens analisadas

A procedência das linhagens representantes das seis espécies analisadas consta da Tabela 1. Todas foram obtidas dos estoques do Genetics Foundation, na Universidade do Texas, em Austin, U.S.A..

A manutenção dessas espécies, em nosso laboratôrio, tem sido feita em meio de cultura de banana e agar-agar, e à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram realizados à essa temperatura e a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

B. Métodos de obtenção das larvas

O presente trabalho foi baseado na análise de preparações citológicas de glândulas salivares e cérebro de larvas. Foram analisadas larvas obtidas diretamente dos estoques, larvas híbridas F_1 e larvas produzidas por retrocruzamentos de fêmeas híbridas F_1 com machos parentais.

As larvas híbridas F_1 foram obtidas por dois processos: (a) cruzamentos "em massa", em vidros de 1/4 de litro, e (b) cruzamentos "em massa", em caixas de população. O segundo processo é particularmente adequado para obtenção de larvas híbridas interespecíficas, por duas razões: primeiro porque um número maior de casais pode ser utilizado, aumentando a produtividade (ver dados comparativos dos dois métodos em BICUDO & RICHARDSON, 1978); e segundo porque, devido à maior facilidade de observação, pode-se controlar melhor o grau de maturidade das larvas e, conseqüentemente, aproveitar um maior número de

TABELA 1. Relação das espécies analisadas e sua procedência

Espécie	Procedência
<u>D. mulleri</u>	Guayalejo, Tamazunchale, México
<u>D. arizonensis</u>	Guayalejo, Tamazunchale, México
<u>D. mojavenensis</u>	Baja California, México
<u>D. aldrichi</u>	Austin, Texas, U.S.A.
<u>D. navajoa</u>	Navajoa, México
<u>D. wheeleri</u>	Arroyo Solloro, Baja California, México

las no est dio adequado ao preparo das lâminas. Assim, os cruzamentos em frascos de 1/4 de litro foram utilizados para as combinações interespecíficas que produzem híbridos mais facilmente, enquanto os cruzamentos em caixas de população foram utilizados para as combinações que produzem híbridos com dificuldade. O primeiro tipo de cruzamento envolveu o uso de 20 a 40 casais por frasco, e o segundo, o uso de 200 a 600 casais por caixa. A maior parte desses cruzamentos foi mantida a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Fêmeas e machos permaneciam separados até à idade de 7 a 10 dias, quando eram preparados os cruzamentos.

As caixas de população utilizadas neste trabalho são caixas de acrílico incolor medindo 20 cm de lado na base e 16 cm de altura. Apresentam 4 aberturas na base e outra em uma das paredes laterais, todas com diâmetro de 5,5 cm. As caixas têm p s de 8 cm. As aberturas da base adaptam-se, com fita adesiva, placas de petri plásticas, contendo meio de cultura, as quais são trocadas no intervalo de tempo que se desejar (trocamos a cada 72 horas, neste trabalho). A abertura lateral serve para introduzir as moscas e para arejamento através de um orifício na rolha, fechado com tela. A tampa da caixa   parafusada e pode ser removida para limpeza.

Os retrocruzamentos envolveram duas das seis esp  cies analisadas - D. mulleri e D. arizonensis - e foram utilizados em dois grupos de experimentos. No primeiro deles, os cruzamentos foram inicialmente preparados "por casal" em tubos de aproximadamente 10 cm de altura por 2 cm de diâmetro, sendo 50 casais formados por fêmeas F_1 e machos arizonensis, e 50, por fêmeas F_1 e machos mulleri. Após 15 dias, como não produzissem descendentes, os casais foram reunidos em grupos de 10 (cruzamentos "em massa"), deixados em tubos por 3 dias, e transferidos para vidros de 1/4 de litro. Apenas nos tubos nasceram des 

cendentes. O segundo teste de retrocruzamentos foi realizado com fêmeas F_1 e machos arizonensis em um total de 70 casais cruzados "em massa" e mantidos em caixa de população.

C. Métodos de preparação das lâminas

Neste trabalho foram utilizadas 3 técnicas citológicas: 1. Coloração pela orceína lacto-acética; 2. Coloração pelo nitrato de prata; e 3. Hibridação "in situ" com RNA ribossômico. Nos 3 casos as preparações citológicas foram feitas por esmagamento das glândulas salivares e cérebros larvais, obedecendo a processos diferentes conforme a técnica a que se destinavam.

As larvas utilizadas para lâminas de glândulas salivares foram as do 3º estágio do desenvolvimento, na sua fase mais adiantada. Nessa fase, que precede a formação do puparium, os espiráculos anteriores das espécies do complexo mulleri são amarelos. As larvas utilizadas para lâminas de cérebro foram as do 3º estágio inicial.

1. Coloração pela orceína lacto-acética

Para esta técnica, o procedimento foi o seguinte: dissecação da larva em solução fisiológica de Shen (NICOLETTI, 1959) ou de Demerec (DEMEREK & KAUFMANN, 1945); transporte das glândulas salivares para solução 3:1 (3 partes de etanol e 1 de ácido acético) por 2 minutos aproximadamente; transporte das glândulas para orceína lacto-acética (solução a 2%) por 1 minuto; transporte para solução aquosa de ácido lático a 50%, por 3 minutos; ruptura das glândulas em 2 ou 3 partes com o auxílio de estiletes, seguida de esmagamento na própria solução de ácido lático, entre lâmina e lamínula; luto da lâmina com esmalte de unhas incolor.

O preparo das lâminas de cérebro obedeceu ao mesmo procedimento, intercalando-se dois passos entre a dissecação e a fixação em etanol acético (3:1): permanência por 10 minutos em solução aquosa de colchicina (Colchicine Houdé) a 10 ug/ml, seguida de 10 minutos em solução hipotônica de KCl a 0,4%.

Outra técnica, mais simples, foi também utilizada para glândulas salivares com bons resultados: dissecação em Shen ou Demerec; transporte das glândulas para orceína lacto-acética (2%), por 2 minutos; transporte para solução aquosa de ácido lático a 50%, por 10 minutos, seguindo-se esmagamento entre lâmina e lamínula e a lutagem.

2. Coloração pelo nitrato de prata

O preparo das lâminas para coloração pelo nitrato de prata e para hibridação "in situ" obedeceu a um mesmo procedimento: dissecação em solução de Shen ou Demerec; transporte para solução 3:1, por 2 minutos; transporte para solução aquosa de ácido lático a 50%, por 3 minutos; transporte para ácido acético em solução aquosa a 45%, e imediato esmagamento, no próprio ácido acético, entre lâmina e lamínula. O esmagamento foi feito como indicado por ATHERTON & GALL (1972), batendo-se, delicadamente, com a ponta de um lápis-borracha sobre a lamínula colocada sobre a lâmina e envolta em papel de filtro, e acompanhando-se, ao microscópio, o grau de distensão dos cromossomos. Atingida a distensão adequada, procedeu-se ao aquecimento em placa aquecedora a aproximadamente 45°C, durante 1 minuto. A lamínula foi retirada com auxílio do nitrogênio líquido. Os passos seguintes foram: permanência por 15 minutos em solução 3:1, por 10 minutos em álcool 70, 5 minutos em álcool 95 e 12 horas ou mais no álcool 100, seguindo-se secagem ao ar.

Para as técnicas de coloração pelo nitrato de



prata e hibridação "in situ" foram também utilizadas preparações de cérebros larvais. Essas preparações foram feitas do seguinte modo: dissecação da larva em solução fisiológica, transporte do cérebro para solução aquosa de colchicina a 10 μ g/ml, por 10 minutos, transporte para solução hipotônica de KCl a 0,4%, por 10 minutos, seguindo-se 3 minutos em solução 3:1 e esmagamento em solução de ácido acético a 45%. A lâminula foi retirada com auxílio do nitrogênio líquido e os demais passos foram idênticos aos descritos para as glândulas salivares.

No preparo de parte das lâminas utilizadas para coloração pelo nitrato de prata foi eliminada a passagem pelos álcoois antes da secagem.

As lâminas de vidro empregadas nas preparações que seriam submetidas à coloração pelo nitrato de prata e à hibridação "in situ" foram recobertas por uma camada de gelatina. O procedimento para gelatinização consiste em limpar as lâminas previamente, fervendo-as em solução de ácido clorídrico a 0,1 N, por 10 minutos e secando-as ao ar; e, posteriormente, em submergi-las em um banho preparado pela mistura de 2 soluções: (a) 0,10 g de gelatina dissolvida em 50 ml de água quente, e (b) 0,01 g de alúmen de cromo dissolvido em 50 ml de água. O banho deve ser mantido morno durante o uso. Segue secagem ao ar.

Foram empregados dois métodos de coloração pelo nitrato de prata: o método Ag-AS, de GOODPASTURE & BLOOM (1975), e que é fundamentalmente semelhante ao AS-SAT de HOWELL & cols. (1975); e o método Ag-I, de BLOOM E GOODPASTURE (1976). O primeiro método utiliza 3 soluções: (a) solução aquosa de nitrato de prata a 50%; (b) solução de prata amoniacal, preparada pela dissolução de 4 g de nitrato de prata em 5 ml de água e acrescentando-se 5 ml de hidróxido de amônia concentrado; e (c) solução aquosa de formalina a 3%, neutralizada (pH 7.0) com cristais de

acetato de sódio e ajustada ao pH 4.5 com ácido fórmico. Empregou-se água deionizada em todas essas soluções.

As soluções a e b são mantidas em frasco escuro, a 4°C, e devem ser filtradas imediatamente antes do uso. A coloração é feita pingando-se algumas gotas da solução a na lâmina que é colocada sob um foco de luz forte, durante 10 minutos. A técnica original recomenda a utilização de uma lâmpada fotográfica de 2.800°K que foi substituída, porém, por uma lâmpada de 150 W colocada em uma estufa ligada a 60°C. A lâmina é, então, removida em água deionizada. Colocam-se, agora, sobre o material, 2 gotas da solução b, 2 da solução c e a lâmina. A coloração dourada aparece rapidamente (menos de 1 minuto) e deve ser acompanhada ao microscópio. Atingida a coloração desejada, lava-se a lâmina em água deionizada e faz-se a montagem permanente.

O método Ag-I produz os mesmos resultados e apresenta vantagens sobre o Ag-AS por ser muito mais simples e por permitir um melhor controle da intensidade de coloração, pois esta se processa muito mais lentamente. Esse método envolve apenas o uso de algumas gotas da solução aquosa de nitrato de prata a 50%, sobre o material, na lâmina. Esta é recoberta pela lâmina e colocada em estufa a 37 ou 45°C, em placa de petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada. A 45°C a coloração ocorre em aproximadamente 4 horas, e, a 37°C, em 8 a 12 horas. Porém, esses tempos variam com o material utilizado.

Introduzimos uma pequena modificação nessa técnica Ag-I: algumas gotas de ácido acético a 45% eram pingadas sobre o material, na lâmina, e escorridas (não totalmente secas) antes de colocar a solução de prata a 50%. Sem este procedimento, os tempos acima mencionados ficam mais longos.



3. Hibridação "in situ" com RNA ribossômico

A hibridação "in situ" entre o DNA e o RNA ribossômico foi realizada, basicamente, conforme a técnica de WIMBER & cols. (1974), com algumas modificações sugeridas por SZABO (publicadas, por exemplo, em SZABO & cols., 1977).

As lâminas, preparadas da forma descrita anteriormente, foram reidratadas através de série de álcoois, decrescente em concentração (70, 50 e 30%, 5 minutos cada) e secas ao ar. Seguiu-se tratamento por incubação com RNase (concentração enzimática 100 µg/ml em solução 2XSSC), por duas e meia horas, à temperatura ambiente, lavagem em 2XSSC (4 banhos de 3 minutos cada), desidratação em série crescente de álcoois (70, 95 e absoluto, 3 minutos cada), e secagem ao ar.

A solução 2XSSC foi preparada com 87,6 ml de solução de cloreto de sódio a 1,5 M, 44,1 ml de citrato trissódico a 0,15 M e completando 5 litros com água destilada.

A desnaturação foi feita por aquecimento em presença de formamida. Após adição de 0,03 ml da solução de hibridação (RNA ribossômico marcado + 2XSSC + formamida) sobre o material em cada lâmina, e cobertura com lamínula, as lâminas foram colocadas em placas de petri em cujo fundo havia sido posto papel de filtro umedecido com 10 ml da solução formamida a 50% + 2XSSC (1:1) e incubadas por 22 horas a 40°C. Ao fim da incubação, a lamínula foi retirada, as lâminas foram lavadas 4 vezes em 2XSSC (5 minutos cada) e tratadas com RNase por 2 horas e meia, à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 banhos em 2XSSC, passagem por álcool 70% e 95% (5 minutos cada) e secagem ao ar. As lâminas foram reveladas 90 dias após a cobertura com emulsão autorradiográfica (Kodak NTB), tendo sido utilizado o revelador Kodak D-19. Para coloração do material foi utilizado o Giemsa.

O RNA ribossômico, isolado de Drosophila melano-
gaster, e contendo as frações 18S e 28S marcadas com I^{125} , foi
fornecido pelo Dr. Dale M. Steffensen, da Universidade de Illinois.
A atividade específica foi estimada em aproximadamente 70×10^6
dpm/ μ g.

Esta parte do trabalho foi realizada na Universi-
dade do Texas, em Austin, em colaboração com o Dr. R. H.
Richardson, quando de meu estágio em seu laboratório, em 1975 e
1976.

D. Número de larvas analisadas

O número de larvas cujas glândulas salivares fo-
ram analisadas variou entre as diferentes técnicas. A orceína
lacto-acética foi utilizada em, no mínimo, 40 e no máximo 60
larvas de cada combinação interespecífica, além de 10 a 30 lar-
vas, de cada sexo, das espécies parentais. A técnica de colora-
ção pelo nitrato de prata foi aplicada a um mínimo de 5 e um má-
ximo de 10 larvas de cada sexo, em cada espécie parental e nas
combinações interespecíficas. A hibridação "in situ" foi reali-
zada em 30 lâminas, incluindo indivíduos dos estoques mulleri e
arizonensis e seus híbridos.

Dos retrocruzamentos, foram analisadas as glându-
las salivares de 51 indivíduos, em dois experimentos, utilizan-
do, em ambos os casos, a técnica de coloração com orceína lacto-
acética.

Na análise de cromossomos mitóticos foi aplicada
a técnica da orceína lacto-acética a cérebros de 5 larvas de ca-
da sexo, obtidas de cada espécie parental e seus híbridos. A téc-
nica da coloração pelo nitrato de prata foi aplicada a um total
aproximado de 30 cérebros larvais, das diferentes espécies e

seus híbridos. E a hibridação "in situ" foi aplicada a 6 larvas de cada sexo das espécies mulleri e arizonensis e seus híbridos.

E. Fotografias

As fotografias do presente trabalho foram tiradas em um Fotomicroscópio II Zeiss, utilizando filme Kodak Panatomic X 32 ASA. O papel fotográfico empregado nas cópias a partir das quais foram preparadas as montagens foi o Kodak F-4. Para as cópias das montagens foram utilizados também o F-2 e o F-3.

No desenvolvimento deste trabalho foram tiradas aproximadamente 1500 fotomicrografias, das quais 164 foram utilizadas no preparo das figuras que compõem a presente tese.

A escala, nas figuras, corresponde a 10 micrômetros. A presença de escala em um só componente da montagem significa que a escala é a mesma para os demais componentes.

Nas figuras foram utilizados os seguintes símbolos: MU = mulleri; AR = arizonensis; AL = aldrichi; WH = wheeleri; NA = navajoa; MO = mojavensis; nu = nucléolo.



III. RESULTADOS

A. Caracterização das espécies analisadas

1. Taxonomia

As espécies de Drosophila, utilizadas no presente trabalho, pertencem ao complexo mulleri do subgrupo de mesmo nome, do grupo repleta.

WASSERMAN (1962) incluiu 12 espécies no complexo mulleri: mulleri, aldrichi, mojavensis, arizonensis, wheeleri, longicornis, ritae, martensis, pachuca, propachuca, desertorum e tira. Entretanto, calcula-se que o número de espécies do complexo, hoje conhecidas, deva situar-se em torno de 20 (R. H. RICHARDSON, informação pessoal). As novas espécies, porém, não foram ainda descritas. Entre elas inclui-se D. navajoa, que analisamos no presente trabalho.

2. Distribuição geográfica

A maior parte das espécies do subgrupo mulleri estão associadas a cactos, razão pela qual sua área de distribuição é dependente da distribuição desses vegetais. Das espécies analisadas no presente trabalho, sabe-se, por exemplo, que D. mojavensis é uma espécie cactifílica estrita, alimentando-se e cruzando-se somente em caules em decomposição de certos cactos. Encontra-se associada principalmente às espécies Lamprocactus thurberi e Machaerocactus gummosus, embora também tenha sido coletada, em número reduzido, em Carnegiea gigantea, Opuntia spp e Rathbunia alamonensis (HEED & cols, 1968). Drosophila mojavensis foi também encontrada, na natureza, associada aos cactos Equinocactus acanthodes (PATTERSON & CROW, 1940).

Drosophila arizonensis foi obtida, em número elevado, a partir de Myrtillocactus geometrizans (RICHARDSON & SMOUSE, 1976; BICUDO & RICHARDSON, 1978). Mas foi também obtida a partir de Rathbunia alamonensis, Lamaireocereus thurberi, Ferocactus, Opuntia, moranga, e frutas cítricas (HEED & cols, 1968).

Tanto mojavensis como arizonensis são, portanto, espécies polífagas, com alguns hospedeiros em comum. Convém salientar, porém, que nesses hospedeiros comuns, quando o número de exemplares coletados de uma das espécies é elevado, o da outra é muito reduzido. Por exemplo, em amostras de Rathbunia, HEED & cols. (1968) obtiveram 790 arizonensis e 20 mojavensis, e em Lamaireocereus, 113 mojavensis e 3 arizonensis.

Drosophila mulleri utiliza espécies de Opuntia, como a O. lindheimeri. Flutuações estacionais no tamanho da população de D. mulleri acompanham o tempo de frutificação dessas plantas (PATTERSON, 1943; PATTERSON & WAGNER, 1943).

Drosophila aldrichi utiliza os frutos dos cactos Opuntia, como ocorre com D. mulleri, mas, esta última espécie também habita outros frutos e vegetais (HEED, 1957; FELLOWS & HEED, 1972).

De modo geral, as espécies analisadas neste trabalho ocorrem, predominantemente, ao sul dos Estados Unidos da América do Norte e no México. De acordo com PATTERSON & STONE (1952), as áreas de distribuição de D. mulleri e D. aldrichi superpõem-se no Texas e no nordeste do México. Entretanto, ainda de acordo com os mesmos autores, a distribuição de mulleri vai além da de aldrichi, na direção leste, atingindo a Flórida, enquanto a distribuição de aldrichi ultrapassa a de mulleri na direção sul do México. Drosophila mulleri foi, posteriormente, coletada em Kingston (Jamaica) e no Estado americano de Nebraska, localizado ao norte do país (WASSERMAN, 1962), enquanto D. aldrichi

chi foi registrada na Austrália, onde espécies de gênero Opuntia foram introduzidas (MULLEY & BARKER, 1977).

Drosophila arizonensis ocorre nos Estados de Arizona e Novo México, U.S.A., e no Estado de Sonora, México (PATTERSON & STONE, 1952). Essa espécie foi também coletada na Baja California, México (WASSERMAN, 1962) e no Texas (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1978).

Drosophila wheeleri foi coletada na California, U.S.A., e em Sonora, México (PATTERSON & ALEXANDER, 1952).

A espécie D. navajoa, ainda não descrita, ocorre no México, tendo sido coletada na localidade que lhe deu o nome.

3. Hibridação em laboratório

A tabela 2 contém dados existentes na literatura, referentes aos cruzamentos férteis das espécies em estudo no presente trabalho. Pode-se verificar que os resultados de testes de hibridação entre mulleri e arizonensis obtidos por CROW (1942) e PATTERSON (1947) de um lado, e por BICUDO & RICHARDSON (1977, 1978) de outro, não concordam: enquanto os testes realizados pelos primeiros autores produziram apenas machos, os realizados pelos últimos autores produziram fêmeas e machos. Essa não concordância de resultados pode ser decorrente da diferença dos métodos utilizados, bem como da diferença quanto à procedência das linhagens intercruzadas (BICUDO & RICHARDSON, 1978). WASSERMAN (1954) mencionou, inclusive, não ter conseguido obter híbridos entre as duas espécies.

Entre todas as possibilidades de hibridação envolvendo as espécies em estudo, algumas foram selecionadas, tendo em vista um dos objetivos do presente trabalho que era o de verificar se outras espécies do complexo mulleri comportam-se, em cruzamentos com D. mulleri, da mesma forma que D. arizonen-

TABELA 2. Dados existentes na literatura, sobre a hibridação, em laboratório, das espécies estudadas no presente trabalho. MU = mulleri; AR = arizonensis; AL = aldrichi; MO = mojavensis; WH = wheeleri; f = fêmea; m = macho; F = fértil; S = estéril.

Cruzamento			Resultado	Autor (es)
f		m		
MU	X	AR	m S	CROW (1942); PATTERSON (1947)
			f F; m S	BICUDO & RICHARDSON (1977, 1978)
MU	X	AL	f S; m S	PATTERSON & CROW(1940); CROW(1942)
MU	X	MO	f F; m S	PATTERSON & CROW (1940)
MU	X	WH	f F; m S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
WH	X	MU	f S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
AL	X	AR	f S	CROW (1942)
AL	X	MO	f S	PATTERSON & CROW (1940)
AR	X	MO	f F; m S	CROW (1942); METTLER (1957)
MO	X	AR	f F; m F	CROW (1942); METTLER (1957)
WH	X	MO	f S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
MO	X	WH	m S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
WH	X	AR	f S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
AL	X	WH	f F; m S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)
WH	X	AL	f F; m S	PATTERSON & ALEXANDER (1952)

sis, quanto ao organizador nucleolar (BICUDO & RICHARDSON, 1977). Com esse objetivo, foram então cruzadas com D. mulleri, as espécies mojavensis, aldrichi, wheeleri e navajoa. Com o objetivo de obter informações quanto a possíveis diferenças de comportamento do organizador nucleolar, dependentes da direção de cruzamento, foram intercruzadas mojavensis e arizonensis.

Dos intercruzamentos selecionados, os de maior produtividade são os de D. arizonensis com D. mojavensis. As duas direções desse cruzamento produzem um grande número de descendentes fêmeas e machos, os quais são férteis na direção fêmeas mojavensis X machos arizonensis, mas os machos são estéreis no recíproco. Na direção fêmeas mojavensis X machos arizonensis a produtividade é aparentemente tão boa quanto a dos cruzamentos intraespecíficos.

A produtividade de mulleri X mojavensis segue-se, em ordem decrescente, à de arizonensis X mojavensis. A postura de noventa fêmeas, em 3 cruzamentos em massa (30 casais cada), com uma transferência para meio de cultura novo, produziu, no espaço de 20 dias, 308 descendentes adultos, sem computar as 50 larvas utilizadas no preparo de lâminas. Já em mulleri X arizonensis, BICUDO & RICHARDSON (1978) obtiveram, de uma caixa de população fundada com 400 fêmeas e 600 machos, 261 larvas híbridas, em 20 dias de manutenção. Desse total, 46 larvas foram utilizadas para o preparo de lâminas, e as demais produziram 80 adultos. Tanto mulleri X arizonensis como mulleri X mojavensis são férteis apenas na direção que envolve fêmeas mulleri. As fêmeas híbridas de ambos os cruzamentos são férteis, enquanto os machos são estéreis.

A produtividade de larvas dos cruzamentos mulleri X navajoa é semelhante à de mulleri X arizonensis. Entretanto, o número de adultos produzidos por mulleri X navajoa é acen

tuadamente menor que o do outro cruzamento. Neste caso também, somente a direção que envolve fêmeas mulleri é fértil, mas a geração F_1 é constituída apenas de fêmeas adultas. Estas não produziram descendentes em cruzamentos com machos mulleri.

A produtividade dos cruzamentos mulleri X wheeleri foi inferior aos anteriores. Essas espécies inter cruzam-se nas duas direções, produzindo apenas fêmeas estéreis na direção fêmeas wheeleri X machos mulleri, e fêmeas férteis e machos estéreis no recíproco. A produtividade também difere nas duas direções. PATTERSON & ALEXANDER (1952) obtiveram, de 200 casais, em cruzamentos em massa, 28 descendentes fêmeas na direção fêmeas wheeleri X machos mulleri, e 54 fêmeas e 71 machos na direção recíproca. No presente trabalho obtivemos 18 fêmeas e 28 machos (computando larvas e adultos), de uma caixa de população contendo, aproximadamente, 200 casais, no decorrer de 20 dias.

Entre todos os inter cruzamentos analisados, porém, o mais difícil de obter é o que envolve mulleri e aldrichi. Estas espécies produzem descendentes apenas na direção fêmeas mulleri X machos aldrichi, embora PATTERSON (1947) tenha verificado a ocorrência de inseminação das fêmeas aldrichi quando cruzadas com machos mulleri. Os híbridos, fêmeas e machos, são estéreis. Em uma caixa de população contendo aproximadamente 200 casais, conseguimos obter 18 larvas, no decorrer de 20 dias de manutenção.

A inexistência de dados anteriores, relativos a navajoa, torna oportuna a descrição mais detalhada de algumas observações relativas aos híbridos obtidos em cruzamentos dessa espécie com mulleri. Uma delas refere-se à mortalidade desses híbridos, constatada nas fases de larva e de pupa. Aproximadamente 30% das larvas morre antes de atingir a fase do 3º estágio em

que os espiráculos anteriores tornam-se amarelos. As larvas "anormais" paralisam o desenvolvimento mas continuam a crescer em tamanho, muitas superando as "normais" quanto a esse aspecto. Tornam-se pouco ativas, movimentando-se lentamente e chegam a permanecer no 3º estágio inicial entre 4 e 5 dias, quando normalmente ficariam aproximadamente 24 horas nessa fase. Ao morrer adquirem uma coloração marron escura, quase preta.

Embora não se possa excluir a existência de fêmeas entre as larvas que se comportam da maneira descrita, entre elas devem predominar os machos, pelas seguintes razões: 1. A maioria das larvas coletadas para análise citológicas (3º estágio adiantado) compunha-se de fêmeas. 2. Entre as larvas macho da fase de espiráculos anteriores amarelos analisadas, algumas eram muito grandes e apresentavam também as glândulas salivares muito desenvolvidas. 3. Esses cruzamentos interespecíficos produzem apenas fêmeas adultas.

A análise citológica de algumas larvas anormais mostrou cromossomos muito alterados e muitas inclusões citoplasmáticas. Foi possível analisar o sexo da larva pelo cromossomo X em apenas 8 casos, mas todas eram machos. Esta observação pode ser tomada como um 4º argumento para admitir que, entre os indivíduos que morrem antes do 3º estágio adiantado, devem predominar os machos.

Entretanto a mortalidade entre as fêmeas híbridas mulleri/navajoa é também bastante acentuada, pois embora um número elevado de descendentes fêmeas na fase de larva possa ser obtido desse cruzamento, o número de fêmeas adultas produzidas é muito pequeno. A mortalidade das fêmeas deve manifestar-se, portanto, predominantemente, na fase de pupa.

Foram coletadas 43 pupas híbridas das placas de petri apostas às caixas de população e transportadas cuidadosa-

mente para um frasco de 1/4 de litro contendo meio de cultura. O frasco foi mantido à mesma temperatura em que vinham sendo mantidas as caixas de população ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Apenas 5 fêmeas adultas foram obtidas a partir dessas pupas, o que dá uma mortalidade aproximada de 89% nessa fase do desenvolvimento. Os adultos obtidos apresentaram uma peculiaridade: 4 das 5 fêmeas tinham as asas abertas e o corpo encurvado (Figura 1), assemelhando-se à disposição das asas do mutante *Dichaeta*, descrito em BRIDGES & BREHME (1944). O mutante *Dichaeta*, em *Drosophila melanogaster*, apresenta uma inversão no cromossomo X e é letal nas fêmeas, em homozigose.

A mortalidade dos híbridos *mulleri/navajoa* obtidos à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, aparentemente não difere da observada nos híbridos obtidos a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Entretanto, a 25°C nenhuma fêmea apresentou a alteração das asas verificada a 20°C . Esses resultados permitem admitir a possibilidade de que variações da temperatura, nos limites analisados, não alteram a viabilidade dos híbridos, mas alteram a manifestação de determinados efeitos decorrentes das interações genéticas interespecíficas. Esse problema requer, porém, um estudo mais detalhado para confirmação.

Dois cruzamentos em massa, com 20 casais cada, foram preparados nas duas direções de cruzamento, envolvendo *navajoa* e *arizonensis*. Esses cruzamentos não produziram descendentes.

4. Hibridação natural

Drosophila mulleri e *D. aldrichi* são simpátricas no sul do Texas e suas larvas utilizam os mesmos frutos do cactus *Opuntia*. HEED (1957) tentou detectar hibridação natural entre as duas espécies pela ocorrência de reação de inseminação

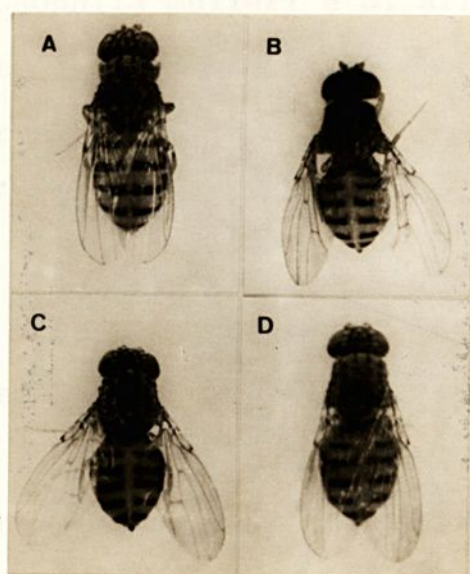


FIGURA.1. A. Fêmea mulleri. B, C, D. Fêmeas híbridas mulleri/navajoa. Em B e C, a implantação das asas é anormal e o corpo ligeiramente encurvado.

em fêmeas coletadas na natureza. O método não permitiu, ao autor, chegar a uma conclusão satisfatória sobre a existência ou não de hibridação natural entre essas espécies. PATTERSON (1947), entretanto, havia identificado machos híbridos naturais que eram produzidos quando a proporção de machos aldrichi constituía pelo menos 1/3 da população masculina total (mulleri + aldrichi). Como mencionamos anteriormente, as fêmeas e os machos híbridos dessas duas espécies são estéreis.

Drosophila mulleri e D. arizonensis superpõem suas áreas de distribuição, mas, embora em laboratório seu isolamento seja menor que o de mulleri X aldrichi, híbridos naturais das duas espécies não são conhecidos (BICUDO & RICHARDSON, 1977).

As espécies arizonensis e mojavensis apresentam, em laboratório, isolamento ainda menor que qualquer das espécies mencionadas. METTLER (1957), NAGLE & METTLER (1969) e NAGLE (1969) obtiveram inclusive introgressão em populações de laboratório fundadas com as duas espécies. Mas, também no caso dessas espécies, híbridos naturais são desconhecidos.

Essa ausência de híbridos naturais de espécies simpátricas que se cruzam em laboratório indica a existência, na natureza, de outros mecanismos de isolamento efetivos na separação das mesmas. No caso de D. arizonensis, D. mojavensis e D. mulleri, esses mecanismos podem estar envolvidos com a seleção de habitat, pois diferentes gêneros de cactos são utilizados por essas espécies como sítios de oviposição e substratos larvais (FELLOWS & HEED, 1972; RICHARDSON & SMOUSE, 1976).

5. Distinção do sexo na fase larvária

Em todas as espécies analisadas neste trabalho, é possível distinguir o sexo das larvas pelo tamanho das gônadas.



Os primórdios dos testículos são bem maiores que os dos ovários e podem ser vistos por transparência da parede do corpo das larvas, da mesma forma descrita por DEMEREC & KAUFMANN (1945) para D. melanogaster. Nos híbridos em estudo, porém, excetuando-se os descendentes do cruzamento arizonensis X mojavensis, esse processo de distinção do sexo não pode ser utilizado; neles, os primórdios dos testículos confundem-se, pelo tamanho, com os ovários. BICUDO & RICHARDSON (1978) já haviam mencionado esse problema com referência aos híbridos mulleri/arizonensis, atribuindo-o à malformação das gônadas masculinas em consequência da hibridação; os machos adultos, híbridos dessas duas espécies, apresentam testículos menores e paragônias maiores que as espécies parentais.

6. Constituição cromossômica

a. Análise intraespecífica

A configuração metafásica dos cromossomos cerebrais de mulleri, arizonensis e aldrichi foi analisada por WHARTON (1943), e a de wheeleri, por PATTERSON & ALEXANDER (1952). Todas essas espécies têm 6 pares de cromossomos, sendo 5 acrocêntricos e um par de microcromossomos.

Desconheço qualquer análise anterior dos cromossomos metafásicos de navajoa. Suas características são as mesmas verificadas para as demais espécies (Figura 2).

Os cromossomos salivares de mulleri, mojavensis e aldrichi foram primeiramente analisados por PATTERSON & CROW (1940) e CROW (1942). As observações dos autores referem-se principalmente a comparações interespecíficas quanto ao pareamento cromossômico, que classificaram como pobre, bem como à ausência de grandes rearranjos cromossômicos nos híbridos mulleri/aldrichi. Referem-se também à presença de algumas inversões nos

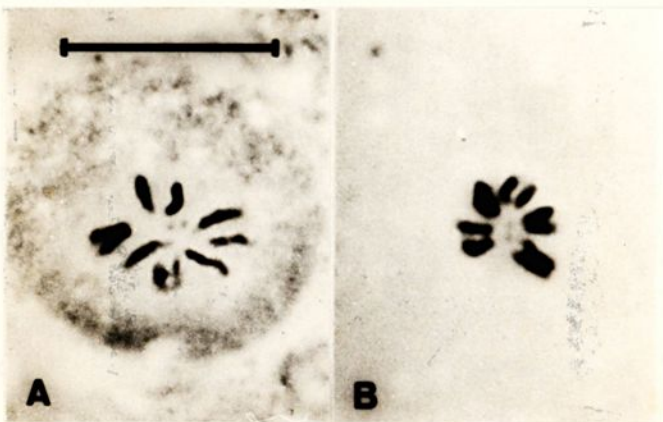


FIGURA 2. Cromossomos metafásicos de navajoa. A. Macho. B. Fêmea.

híbridos mulleri/mojavensis, nos quais o pareamento também foi considerado pobre, e ao pareamento bom e à presença de várias inversões nos híbridos mojavensis/arizonensis.

Um estudo mais detalhado do ordenamento cromossômico intra e interespecífico foi realizado por WASSERMAN (1954, 1962), abrangendo as espécies analisadas no presente trabalho, com exceção de navajoa. Intraespecificamente todas as espécies mostraram completa homozigose cromossômica.

Posteriormente, METTLER (1963) constatou polimorfismo cromossômico em D. mojavensis, resultante de duas inversões paracêntricas no cromossomo 2 (a que chamou LP e BA) e uma no cromossomo 3 (denominada MU). Baseado na distribuição dos arranjos cromossômicos, o autor descreveu duas raças cromossômicas para essa espécie: mojavensis (dos Montes Chocolate, Califórnia, USA) e baja (dos estados mexicanos de Baja California, Sonora e Sinaloa). As populações polimórficas eram todas procedentes da Baja California. JOHNSON (1973) ampliou a área de coleta da espécie, procurando determinar os limites da distribuição das inversões e suas frequências.

A análise cromossômica intraespecífica, realizada no presente trabalho, confirmou a homozigose anteriormente verificada por WASSERMAN para mulleri, aldrichi, wheeleri e arizonensis, embora as linhagens utilizadas por aquele autor tivessem origem geográfica diferente das nossas (eram respectivamente de Austin, Texas, USA, Humboldt, Nebraska, USA, e Kingston, Jamaica; San Pedro, México; Arcadia, California, USA; Fairbanks e Patagônia, Arizona, USA, e Baja California, México). Por outro lado, mostrou que navajoa é também homozigota para todos os cromossomos.

Quanto à linhagem de mojavensis da Baja Califórnia, analisada neste trabalho, verificou-se que também é polimórfica.

fica, apresentando uma inversão heterozigota no cromossomo 2 (Figura 3A) e outra no cromossomo 3 (Figura 3B). A inversão do cromossomo 3 é a mesma MU descrita por METTLER (1963). A inversão do cromossomo 2, porém, não corresponde às inversões LP ou BA descritas por aquele autor. Parece, porém, conferir com a descrição da inversão 2s, apresentada por WASSERMAN (1954). O último autor admitiu a ocorrência das inversões a que chamou 2q, 2r e 2s, no processo evolutivo que teria originado o cromossomo 2 de mojavensis a partir de arizonensis. A confirmação de que se trata realmente da inversão mencionada indicará que essa linhagem, na sequência estabelecida por WASSERMAN, é ancestral das demais linhagens da espécie, já analisadas.

Outro aspecto novo nesta análise cromossômica intraespecífica refere-se à detecção de uma deficiência e de uma adição de material cromossômico em arizonensis. A deficiência foi observada, em heterozigose, na extremidade distal do cromossomo 5, em uma larva fêmea tomada do próprio estoque. A adição foi detectada, também em heterozigose, na extremidade distal do cromossomo 4, em dois indivíduos, sendo uma fêmea e um macho, ambos descendentes de um retrocruzamento entre uma fêmea híbrida mulleri/arizonensis e um macho arizonensis. Tanto a larva fêmea como a larva macho, portadoras da adição, eram homozigotas para o cromossomo 4 originado de arizonensis.

A deficiência e a adição foram encontradas em cromossomos originados do mesmo estoque de arizonensis, mas os fenômenos foram observados com um intervalo de dois anos.

Na Figura 4, as fotos 4B a 4D mostram a deficiência e as fotos 4F a 4H mostram a adição. Os padrões de banda normais do cromossomo 5 e do cromossomo 4 são vistos, respectivamente, nas fotos 4A e 4E. A foto 4B sugere a ausência de uma banda terminal. No entanto, a foto 4D mostra uma banda aparente

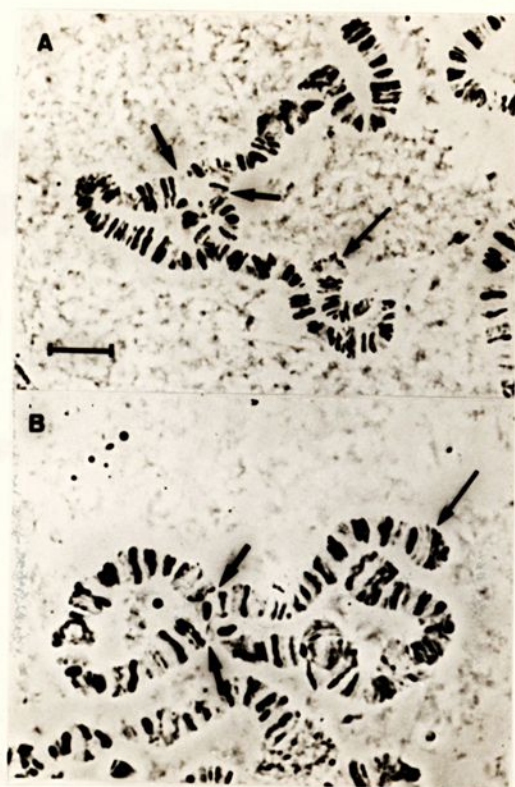


FIGURA 3. Inversões heterozigotas em mojavensis. A. Cromossomo 2. B. Cromossomo 3. As setas menores indicam os pontos de quebra, e as maiores, a extremidade distal dos cromossomos.

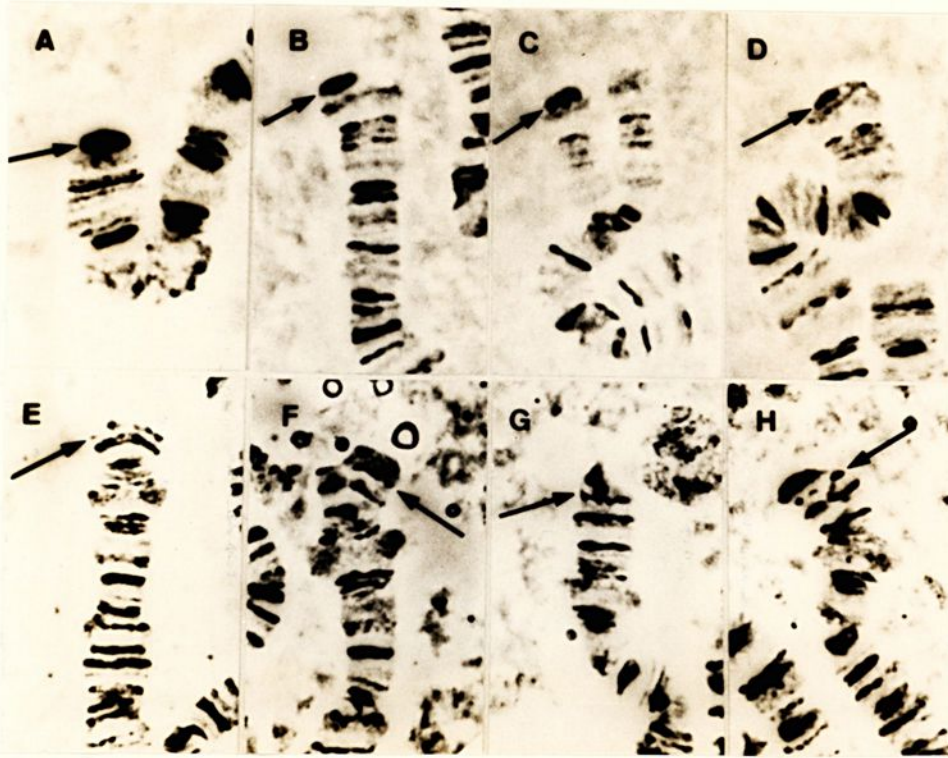


FIGURA 4. Deficiência e adição em arizonensis. A-D. Cromossomos 5. A. Cromossomo normal. B, C, D. Cromossomos heterozigotos para deficiência da banda espessa apontada pela seta. Em C, a extremidade distal do cromossomo encontra-se despareada. E-H. Cromossomos 4. E. Cromossomo normal. F, G, H. Cromossomos heterozigotos para adição de material. Nas fotos E-F, a seta aponta a faixa que é, aparentemente, extrema nos cromossomos normais.

mente recobrando a extremidade final de ambos os homólogos (o deficiente e o normal), indicando tratar-se de ausência de uma banda subterminal.

Quanto à adição de material, pode-se verificar, pelas fotos 4F e 4G, que ela ocorre acima da banda que é, aparentemente, a mais extrema no cromossomo normal. No entanto, a foto 4H também sugere a existência de uma faixa comum aos dois homólogos, recobrando o material adicional.

b. Análise interespecífica

WASSERMAN (1954, 1960, 1962) determinou a sequência de bandas das espécies do complexo *mulleri*, por ele analisadas, comparativamente à sequência de *D. repleta*, tomada como padrão. O autor verificou que aquelas espécies diferem desta por 3 inversões homozigotas no cromossomo X (inversões Xa, Xb, Xc), por 2 inversões homozigotas no cromossomo 2 (inversões 2a, 2b), e por 1 inversão homozigota no cromossomo 3 (inversão 3b). Os cromossomos 4 e 5 não diferem dos de *repleta* e o 6 (microcromossomo) não foi comparado.

O estudo comparativo do ordenamento cromossômico entre as espécies do complexo *mulleri* foi feito, por WASSERMAN (1954, 1962), pela análise de híbridos interespecíficos, exceto para *mulleri/arizonensis*. Neste caso, as inversões interespecíficas foram deduzidas a partir da observação dos híbridos *mulleri/mojavensis* e *arizonensis/mojavensis*, pois o autor não conseguiu obter descendentes em cruzamentos de *mulleri* com *arizonensis*. Os resultados mostraram que entre as espécies em estudo neste trabalho, algumas partilham inversões homozigotas que permitem diferenciá-las das outras espécies. Essas inversões distribuem-se da seguinte maneira:

Cromossomo X: *mojavensis* - homozigota para a inversão X_e; demais

espécies homozigotas para o arranjo padrão.

Cromossomo 2: mulleri, aldrichi e wheeleri - homozigotas para as inversões 2c, 2f, 2g, 2h, 2i; mojavensis - homozigota para as inversões 2c, 2f, 2g, 2h, 2q, 2r, 2s.

Cromossomo 3: mulleri, aldrichi wheeleri - homozigotas para as inversões 3a e 3c; arizonensis - homozigota para a inversão 3b; mojavensis - homozigota para as inversões 3a e 3d.

Cromossomos 4 e 5: nenhuma das espécies apresentou inversões nestes cromossomos.

Cromossomo 6 (microcromossomo): não foi comparado por WASSERMAN. De acordo com METTLER (1963), porém, o cromossomo 6 não foi submetido a modificações na evolução do grupo repleta.

No presente trabalho constatamos pareamento cromossômico ruim em todos os híbridos, exceto arizonensis/mojavensis, como havia sido mencionado por autores que nos precederam. Nos híbridos arizonensis/mojavensis, o pareamento é quase tão bom como o detectado intraespecificamente. Neles ocorre assina-pse nos microcromossomos e em algumas secções da extremidade proximal dos outros cromossomos. As extremidades distais e alguns pontos intermediários apresentam despareamento com frequência baixa.

Figuras de inversão foram detectadas em todos os híbridos, exceto mulleri/wheeleri e mulleri/aldrichi, também confirmando observações anteriores. Essas inversões, simples ou múltiplas, ocorrem em um ou mais dos pares cromossômicos X, 2 e 3.

Os híbridos mulleri/navajoa mostraram inversões interespecíficas nos cromossomos 2 e 3. Os demais cromossomos apresentaram um pareamento deficiente, mas nenhuma figura de inversão.

Dessa maneira, permanece válida, para as espécies do complexo mulleri, a observação de WASSERMAN quanto à preserva

ção do ordenamento das bandas dos cromossomos 4 e 5.

Entretanto, verificamos que o cromossomo 4 apresenta uma diferenciação interespecífica referente a algumas bandas localizadas na secção A_1 do mapa de WASSERMAN (1954). Em mulleri, wheeleri, navajoa e aldrichi, essa região é constituída por duas bandas. Na primeira espécie, ambas aparecem fundidas na maioria dos indivíduos, formando uma banda única, espessa ("doublet"), enquanto nas outras espécies ocorre o inverso, isto é, a maioria dos indivíduos mostra as duas bandas isoladas. Essa diferença pode ser vista na Figura 5 A a D, que se refere aos indivíduos dos estoques (observação intraespecífica), e nas Figuras 6 A, B e 7, que se referem aos híbridos interespecíficos. A banda diferenciadora do cromossomo 4 de wheeleri pode ser observada nas Figuras 5 B e 7, mas a duplicidade da mesma está mais evidente na Figura 7. Quanto a aldrichi, visualiza-se melhor as duas faixas do "doublet" na Figura 5 D que na 6 ^B ~~D~~.

As espécies mojavensis e arizonensis, porém, apresentam uma substituição da faixa dupla do cromossomo 4, por 3 faixas, aparentemente devido à substituição da mais distal do "doublet" por duas delgadas. Quanto à banda menos distal, verifica-se que é mais espessa em mojavensis que em arizonensis. Essa diferenciação das duas espécies em relação às demais, e das duas entre si, pode ser vista nas Figuras 5 E, F e 6 C, D.

O padrão de bandas do microcromossomo das espécies analisadas não difere, confirmando as observações de METTLER (1963), no que se refere à essas espécies.

BICUDO & RICHARDSON (1977) verificaram a existência de uma diferenciação no padrão de bandas dos cromossomos X de mulleri e arizonensis. A diferenciação, facilmente diagnósticável nas fêmeas híbridas, refere-se à região cromossômica pro

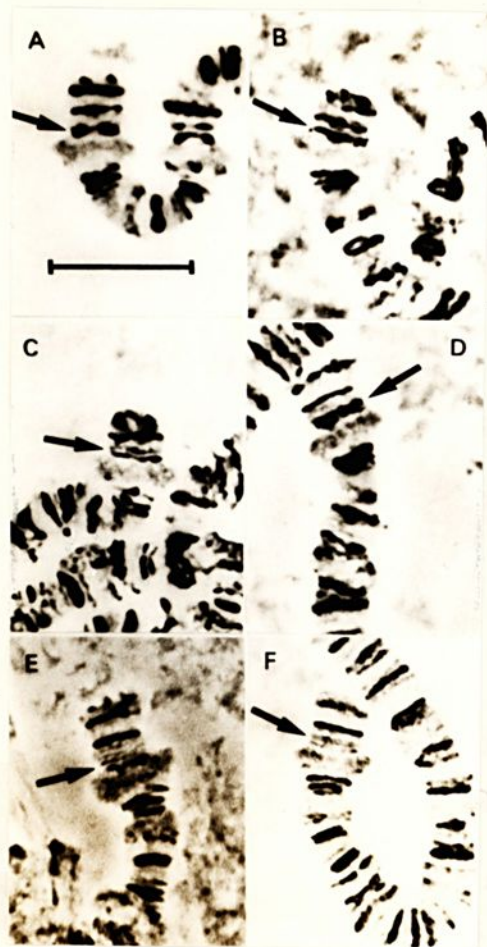


FIGURA 5. Bandas diferenciadoras do cromossomo 4. A. mulleri; B. wheeleri; C. navajoa; D. aldrichi; E. mojavensis; F. arizonensis.



FIGURA 6. Bandas diferenciadoras do cromossomo 4 nos híbridos interespecíficos. A. mulleri X navajoa. B. mulleri X aldrichi. C. mulleri X mojavensis. D. mulleri X arizonensis. A seta indica o cromossomo de mulleri.

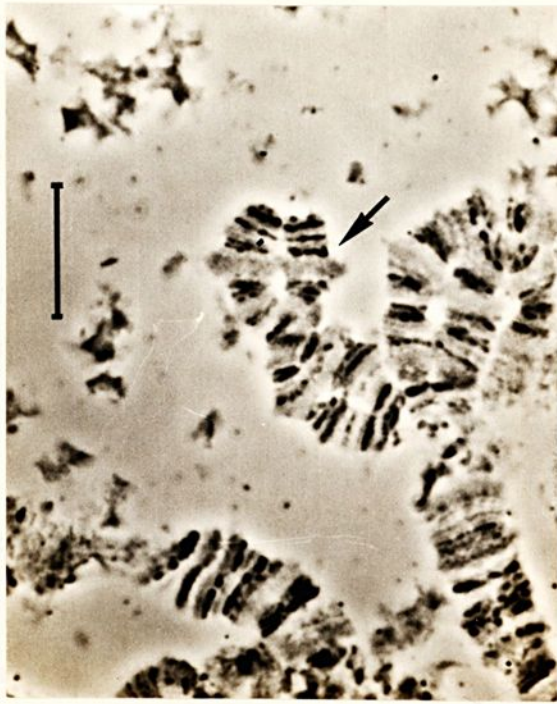


FIGURA 7. Bandas diferenciadoras do cromossomo 4 no híbrido mulleri/wheeleri. A seta indica o cromossomo de mulleri.

ximal correspondente às secções F_5 a H do mapa citológico de WASSERMAN (1954). Essa região não parecia nos híbridos das duas espécies. Além disso, BICUDO & RICHARDSON verificaram diferença, entre as duas espécies, quanto à espessura de uma banda localizada na secção F_4 do mesmo cromossomo. Essas diferenças morfológicas foram utilizadas por aqueles autores para reconhecimento da origem específica dos cromossomos X nas fêmeas híbridas.

A Figura 8 apresenta um estudo comparativo do padrão de bandas da região proximal do cromossomo X, envolvendo agora fêmeas das 6 espécies analisadas neste trabalho. A região comparada abrange as secções F_4 a H do mapa de WASSERMAN (1954). Nessa figura, os traços ligam bandas ou grupos de bandas morfollogicamente correspondentes.

Os cromossomos de arizonensis (AR), wheeleri (WH), mojavensis (MO) e aldrichi (AL) mostram padrão de bandas correspondente, diferenciando-se do de navajoa (NA) apenas quanto às últimas bandas da região proximal (Secção H, no mapa de WASSERMAN, 1954). O cromossomo X de mulleri (MU), porém, diferencia-se de todos os demais por uma extensão maior da região proximal, a mesma que diferencia aquela espécie, de arizonensis, conforme BICUDO & RICHARDSON (1977) (Secções F_5 a H). Essas diferenças foram utilizadas no reconhecimento da origem dos cromossomos X nas fêmeas híbridas interespecíficas descendentes de cruzamentos entre mulleri e as demais espécies analisadas neste trabalho.

A forma da extremidade proximal e o padrão de pufes foram também elementos auxiliares no reconhecimento cromossômico. Na Figura 9 são apresentadas, como exemplo, duas fêmeas híbridas em que esse reconhecimento pode ser facilmente realizado. Trata-se de uma fêmea mulleri/navajoa (Figura 9A) e de uma fêmea mulleri/arizonensis (Figura 9B). Na Figura 9A, o aspecto da base de ambos os cromossomos e o pufe apontado pela seta

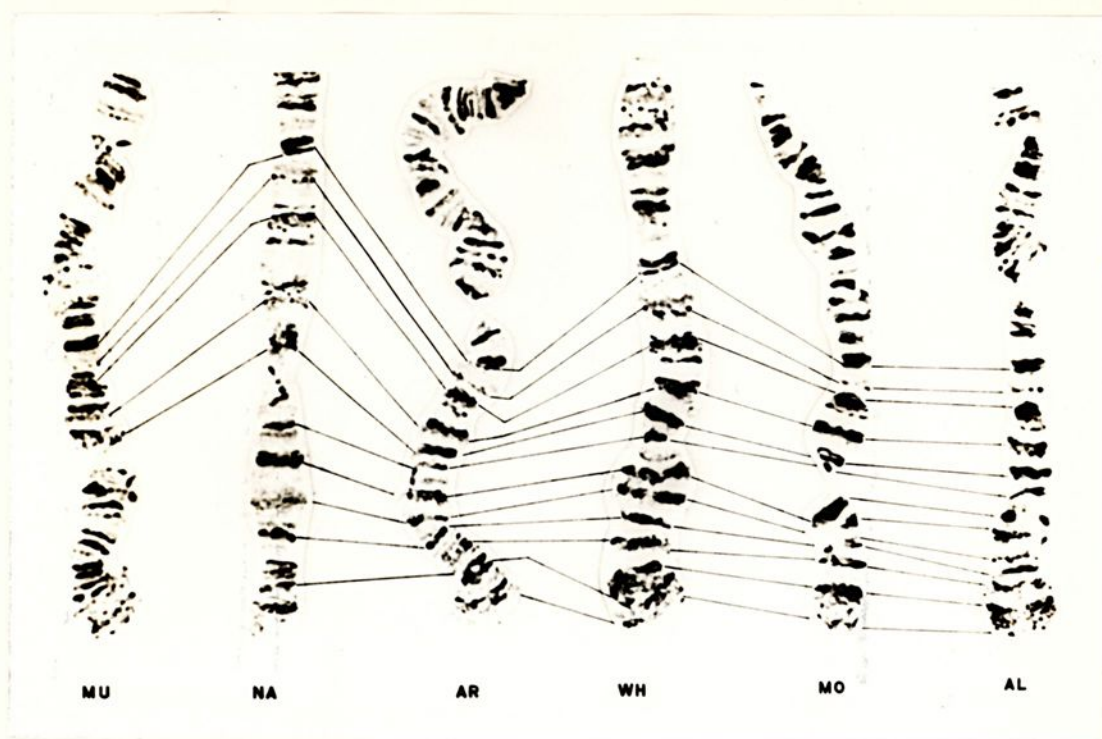


FIGURA 8. Padrão de bandas da região proximal do cromossomo X, visto em larvas fêmeas no estágio de espiráculos anteriores amarelos. Os traços ligam as bandas ou feixes de bandas morfologicamente correspondentes, das diferentes espécies. Símbolos conforme Ítem E de Materiais e Métodos.



FIGURA 9. Região proximal do cromossomo X em fêmeas híbridas. A. Fêmea mulleri/navajoa. A origem específica é reconhecível pelo aspecto da ponta e pelo pufe apontado pela seta. B. Fêmea híbrida mulleri/arizonensis. A origem do X é reconhecível pelo aspecto da ponta, pelo pufe (seta curta) e pela banda marcadora (seta longa).

permitem reconhecer sua origem específica. Na Figura 9B, além do aspecto da base e do pufe apontado pela seta curta, existe a banda marcadora (apontada pela seta longa), descrita por BICUDO & RICHARDSON (1977), que é visivelmente mais espessa no X de arizonensis que no de mulleri.

Embora a espessura da banda marcadora seja um elemento válido para o reconhecimento do cromossomo X de arizonensis nas fêmeas híbridas dessa espécie com mulleri, a Figura 8 não mostra diferença entre as 6 espécies quanto a essa banda (nessa Figura, a banda marcadora é a ligada pelo traço distal extremo). Ocorre que, um estudo intraespecífico mais detalhado mostrou ser, o espessamento da banda marcadora do cromossomo X de arizonensis, de origem fisiológica e restrito ao cromossomo X dos machos dessa espécie. Nas fêmeas híbridas, apesar da existência de dois X, o de arizonensis atua, quanto a essa banda, como se estivesse sozinho, da mesma forma que nas células dos machos daquela espécie. A Figura 10 mostra a banda marcadora em um X de macho arizonensis (10A) e um X de macho mulleri (10B). A diferença de espessura é ainda mais acentuada nos cromossomos X da fêmea híbrida anteriormente apresentada na Figura 9B. Um estudo mais detalhado desse problema, com aplicação de métodos de coloração específicos para DNA, RNA e proteínas, encontra-se em andamento.

B. Outras observações sobre a regulação do organizador nucleolar em D. mulleri e D. arizonensis e seus híbridos.

1. Em lâminas de indivíduos obtidos de retrocruzamentos, coradas pela orceína lacto-acética.

Neste trabalho foram realizados dois experimentos de retrocruzamentos, ambos envolvendo fêmeas híbridas mulleri/



FIGURA 10. Banda marcadora no cromossomo X. A. Macho arizonensis. B. Macho mulleri.

arizonensis. No primeiro deles, as fêmeas foram cruzadas com machos das duas espécies parentais e, no segundo, com machos arizonensis. O objetivo fundamental desses experimentos, já apresentado na Introdução deste trabalho, foi verificar se os fenômenos observados em fêmeas e machos híbridos F_1 , referentes ao cromossomo X, ao microcromossomo e ao nucléolo, repetir-se-iam nas condições citológicas variáveis dos descendentes dos retrocruzamentos, criadas pela segregação independente, nas fêmeas F_1 , e pelos genótipos paternos de origem específica diferente.

Seguem-se os resultados desses experimentos.

a. Primeiro Experimento: fêmeas híbridas F_1 (mulleri/arizonensis) X machos mulleri e arizonensis

A Tabela 3 contém dados referentes aos retrocruzamentos dessas fêmeas híbridas com as duas espécies parentais. Ne-la constam o número de fêmeas e machos descendentes analisados, e os resultados da análise cromossômica quanto à origem específica dos 6 pares de cromossomos. Esta permitiu classificar os descendentes em homozigotos e mistos, sendo a última classe formada pelos portadores de um ou alguns pares de cromossomos em homozigose e os demais em heterozigose. A Tabela mostra homozigotos e mistos entre os descendentes de F_1 X arizonensis, com predominância dos homozigotos; e apenas indivíduos mistos entre os descendentes de F_1 X mulleri. Portanto, indivíduos portadores de todos os cromossomos em heterozigose não foram observados nesse experimento.

Entre os indivíduos mistos, alguns eram portadores de cromossomos recombinantes interespecíficos que foram diagnosticados e tiveram seus pontos de quebra determinados pelo pareamento. Recombinação foi detectada em todos os cromossomos,

TABELA 3. Constituição cromossômica dos descendentes de retrocruzamentos das fêmeas híbridas F_1 (mulleri X arizonensis) com machos arizonensis e mulleri. AR = arizonensis; MU = mulleri.

Tipo de Cruzamento	Sexo dos Descendentes	Total de indivíduos analisados	Constituição Cromossômica	
			homozigotos	mistos
F_1 X AR	machos	10	9	1
	fêmeas	10	8	2
F_1 X MU	machos	5	0	5
	fêmeas	9	0	9



menos no par 6, cujas dimensões reduzidas dificultam esse tipo de análise.

A maior variedade de tipos recombinantes foi observada nos cromossomos 4, 5 e X. Os cromossomos 2 e 3, por serem portadores de inversões interespecíficas, apresentam pequena região livre à recombinação nas extremidades proximal e distal (ambos os cromossomos) e na região intermediária (cromossomo 3).

O cromossomo 2, portador de um complexo de inversões superpostas, apresentou 3 tipos recombinantes, denominados A, B, C, todos decorrentes de uma única quebra (Figura 11). O tipo A foi observado em 4 indivíduos descendentes de $F_1 \times MU$; o tipo B, em 2 descendentes de $F_1 \times MU$ e 1 de $F_1 \times AR$; e o tipo C, em 1 descendente de $F_1 \times MU$.

O cromossomo 3, portador de duas inversões interespecíficas independentes, mostrou 4 tipos recombinantes denominados de A a D (Figura 12). O tipo A é decorrente de duas quebras, sendo uma na região distal e outra na região intermediária, entre as duas inversões. O tipo B é decorrente de uma só quebra, aparentemente no mesmo ponto da região intermediária determinante de A. O tipo C é resultante de uma quebra na região proximal, e o tipo D, de uma quebra na região distal, aparentemente no mesmo ponto que determinou A. A detecção de recombinantes resultantes de quebra na região intermediária, entre as duas inversões, mostra que essas inversões não atuam de modo a impedir a ocorrência de recombinação efetiva nesse trecho, como acontece com algumas espécies de Drosophila, nas quais há indicação de uma associação adaptativa das inversões. Os recombinantes A, B e D do cromossomo 3 foram encontrados uma única vez, entre a descendência de $F_1 \times MU$. O recombinante C foi encontrado duas vezes entre a descendência de $F_1 \times MU$ e uma vez entre a descendên

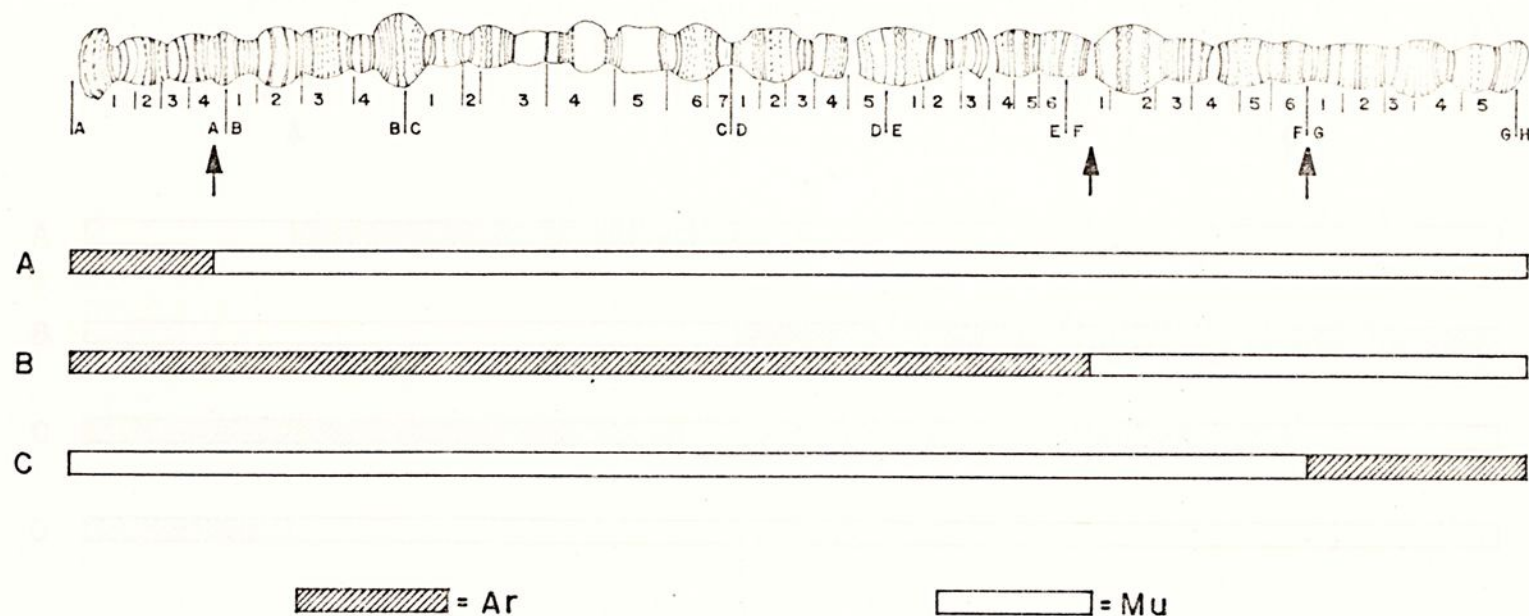


FIGURA 11. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 2. As setas, nesta figura e nas demais do mesmo tipo, mostram os pontos de quebra localizados no mapa citológico apresentado por WASSERMAN (1954).

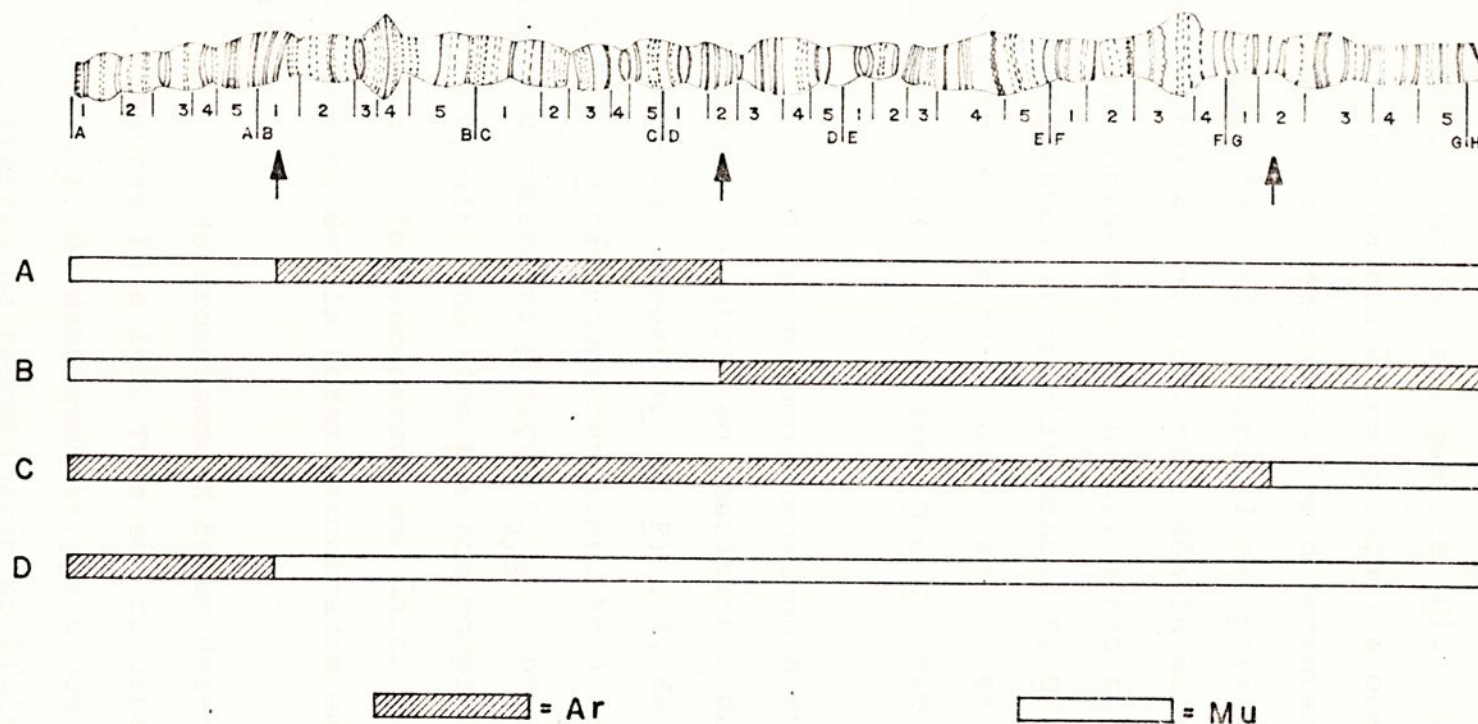


FIGURA 12. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 3.

cia de $F_1 \times AR$.

No cromossomo 4 foram detectados 8 tipos recombinantes (Figura 13). Três desses recombinantes resultaram de duas quebras (tipos A, B, F), quatro, de uma só quebra (tipos C, D, E, H), e um de três quebras (G). Como os descendentes foram analisados em uma única geração, a ocorrência de quebras no mesmo ponto dos cromossomos, em diferentes tipos recombinantes, é indicativa de predisposição local para quebras. Os cromossomos 4 mostraram aparente coincidência de quebra na região B_3 em 3 tipos recombinantes (A, B, C), e nas regiões E_1 e F_3 , em 2 tipos recombinantes (respectivamente, F, G, e B, D). Os tipos C, D, E e F foram detectados duas vezes e os demais, uma só vez, em cruzamentos $F_1 \times MU$. Os tipos D e E foram encontrados uma vez em $F_1 \times AR$.

O cromossomo 5 mostrou 8 recombinantes diferentes (Figura 14). Quatro são resultantes de duas quebras (A, E, G, H), 3, de uma quebra (C, D, F) e 1, de quatro quebras (B). Os tipos G e H são complementares. Em 4 cromossomos recombinantes ocorreu quebra na posição $D_{2/3}$ (tipos A, B, C, D). Quebra na região E_1 resultou no tipo E e nos complementares G e H. O tipo recombinante D foi encontrado uma única vez nos cruzamentos $F_1 \times AR$. Todos os demais foram encontrados em $F_1 \times MU$, também uma só vez.

No cromossomo X foram detectados 4 tipos recombinantes (Figuras 15 e 16). Três são resultantes de uma quebra (A, B, C) e um (D), de duas quebras. Os tipos A e B são complementares e decorrentes de recombinação no limite das secções B/C (seta a na Figura 13), que constitui um ponto de quebra frequente nas espécies parentais e nos híbridos F_1 . Foi detectado um indivíduo portador de cada um desses tipos (A e B) nos cruzamentos $F_1 \times MU$ e um indivíduo portador do recombinante B nos cruzamen-

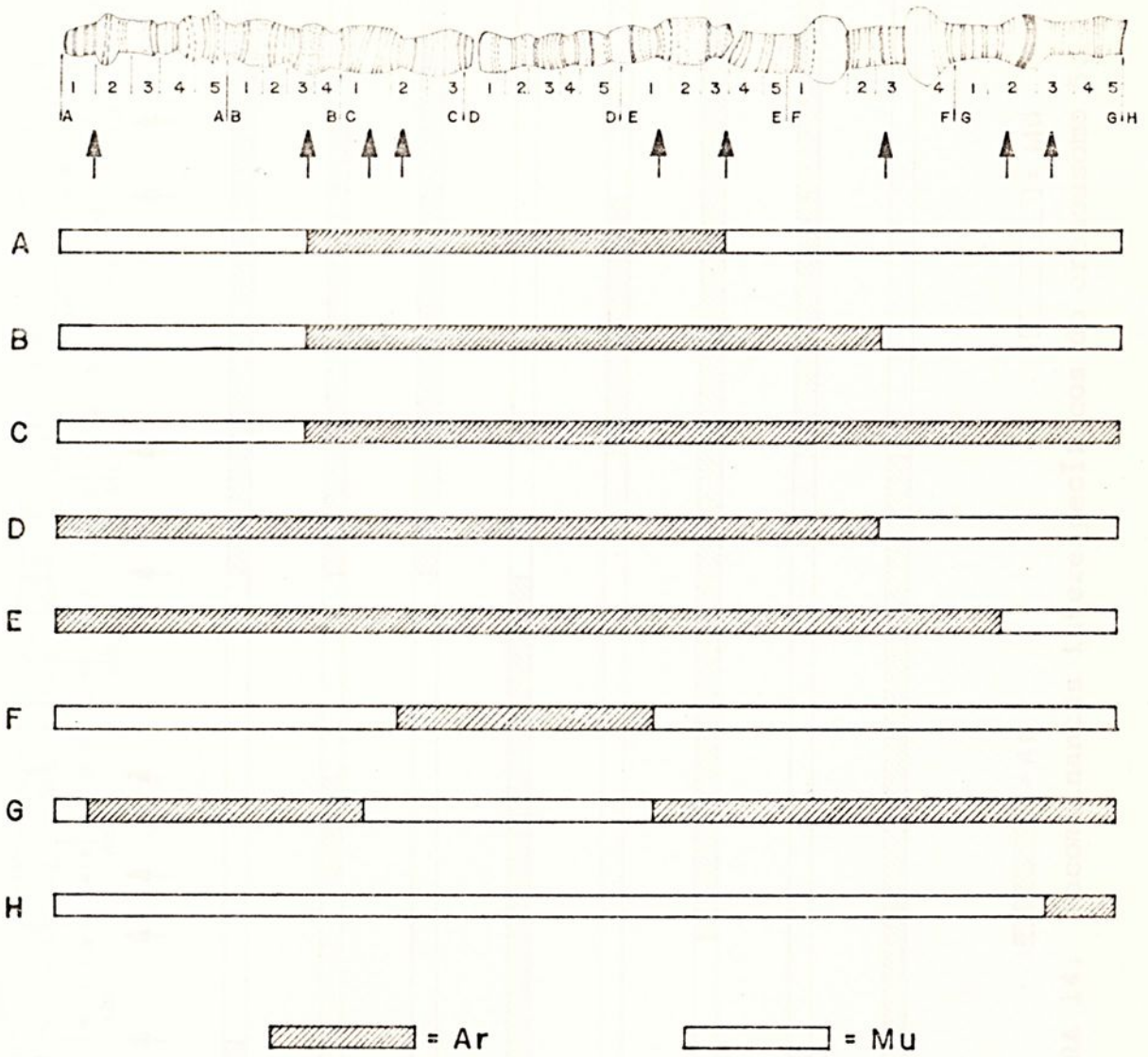


FIGURA 13. Recombinantes interspecíficos do cromossomo 4.

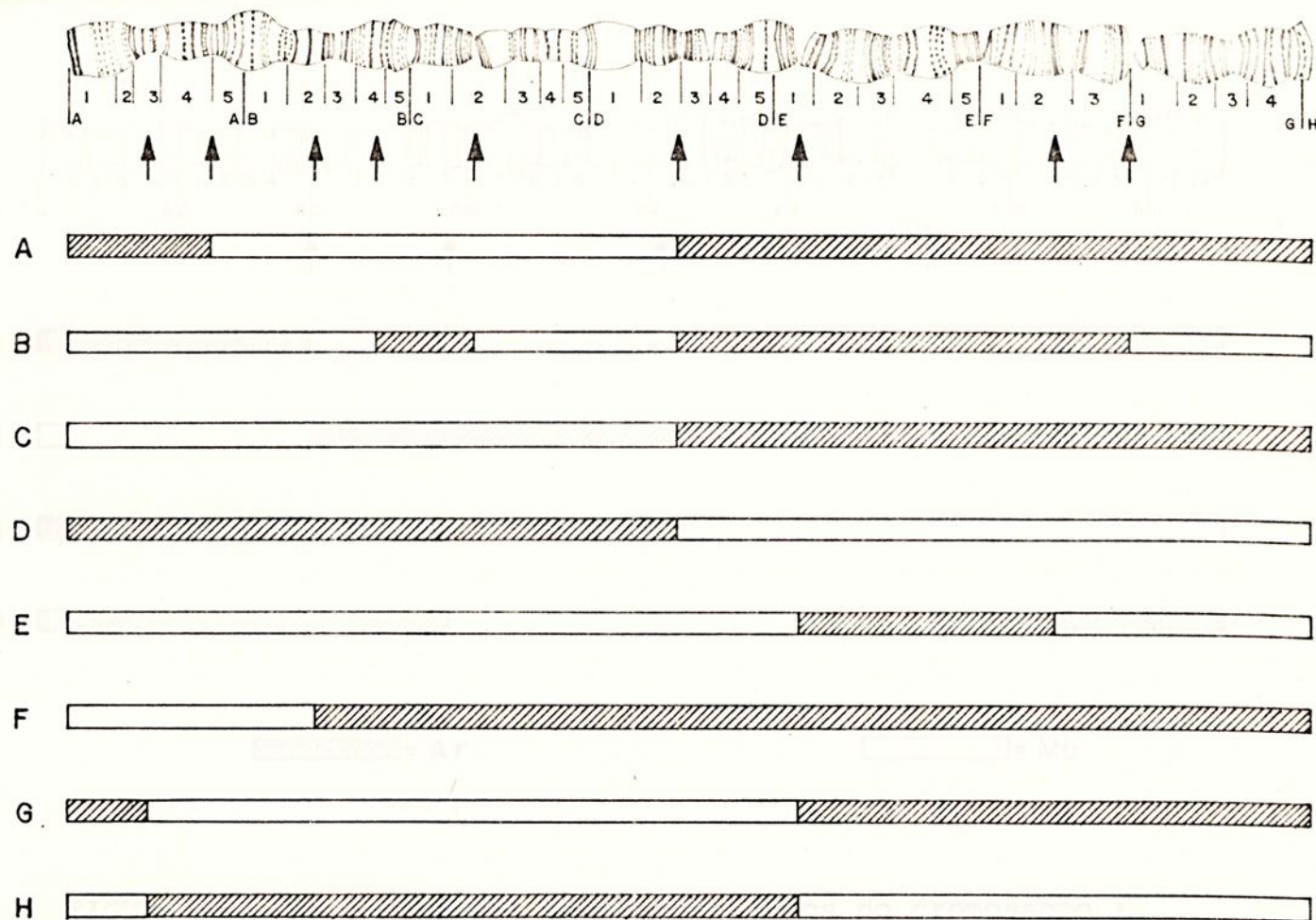


FIGURA 14. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 5.

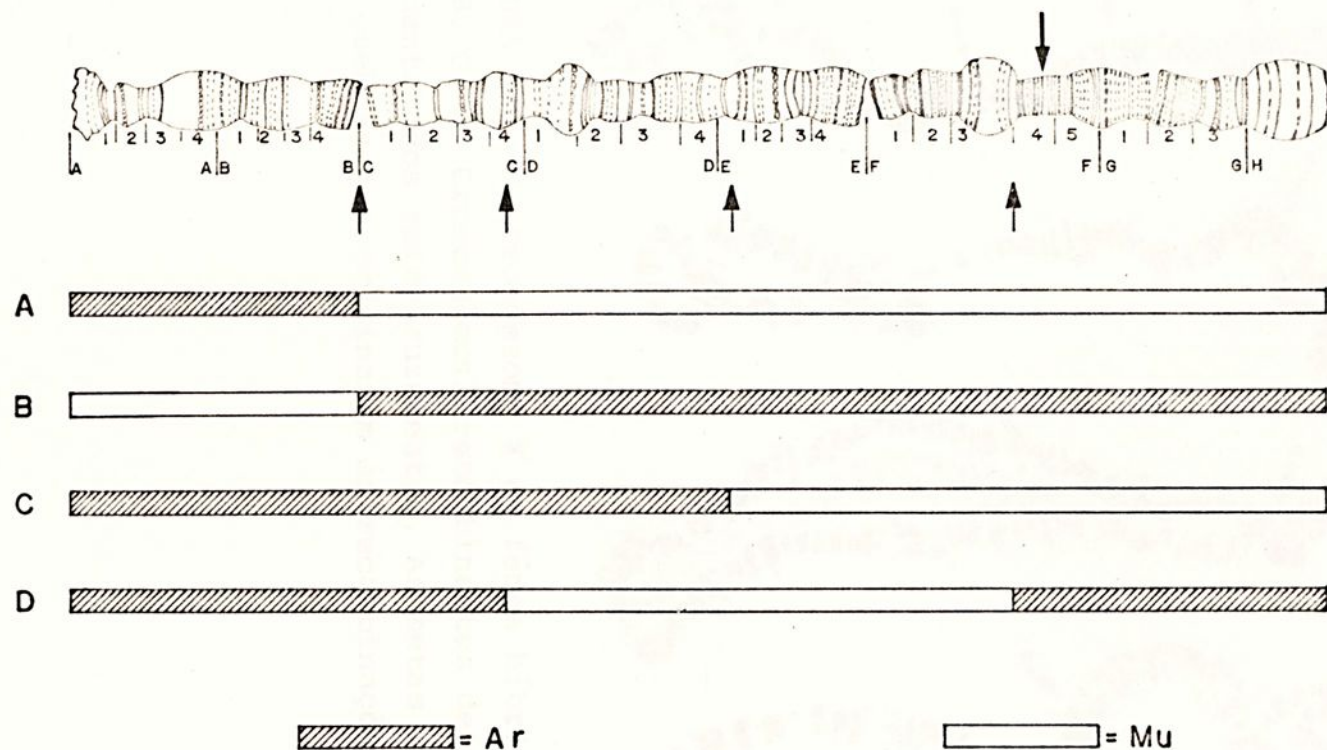


FIGURA 15. Recombinantes interespecíficos do cromossomo X.
A seta acima do cromossomo aponta a banda marcadora.



FIGURA 16. H. Cromossomo X de fêmea híbrida mulleri/arizonensis. A, B, C, D. Cromossomos X recombinantes detectados entre os descendentes dos retrocruzamentos. As setas indicam a localização das quebras que originaram as recombinações.

tos $F_1 \times AR$. O tipo C, resultante de recombinação na posição E_1 , foi o mais frequente na amostra analisada, tendo sido verificado em 3 indivíduos descendentes de $F_1 \times MU$. O tipo D, resultante de duas quebras nas posições C_4 e F_4 , foi observado uma única vez, na descendência de $F_1 \times AR$. Pode-se observar que todos os recombinantes do cromossomo X resultaram de quebras localizadas antes da banda marcadora, no sentido distal para proximal.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na análise de cada um dos pares autossômicos das fêmeas e machos descendentes dos 2 tipos de retrocruzamentos, e os obtidos para os cromossomos X das fêmeas. Os resultados quanto aos cromossomos X dos machos deixam de ser apresentados dada a dificuldade de reconhecimento da origem específica dos mesmos; o aspecto difuso das bandas cromossômicas nesses machos fez com que, na maioria dos casos, não houvesse segurança na classificação com base nos marcadores morfológicos.

Considerando-se o total de cromossomos analisados, predominaram, entre as fêmeas descendentes dos cruzamentos $F_1 \times MU$, os pares com cromossomos recombinantes, sobre os homozigotos e os heterozigotos. As duas últimas classes ocorreram em igual número na amostra analisada. Entre os machos descendentes dos mesmos cruzamentos, também predominaram os cromossomos recombinantes. O número de homozigotos, porém, superou o número de heterozigotos.

Nenhum dos machos obtidos nos retrocruzamentos $F_1 \times MU$ apresentou cromossomo 6 amplificado. O X associava-se ao nucléolo na maioria das células das glândulas salivares.

Entre os descendentes dos cruzamentos $F_1 \times AR$, dada a predominância quase que absoluta de indivíduos totalmente homozigotos, os pares cromossômicos homozigotos foram os mais frequentes. As duas únicas fêmeas mistas, da amostra analisada,

TABELA 4. Constituição cromossômica dos descendentes dos retrocruzamentos, considerando-se os pares cromossômicos separadamente. F = fêmeas; M = machos.

Tipo de cruzamento	Sexo	Cromossomos	Nº de pares analisados	Homozigotos	Heterozigotos	Recombinantes
F ₁ X MU	F	2	9	2	3	4
		3	9	4	2	3
		4	9	2	0	7
		5	9	0	4	5
		6	9	4	5	-
		X	9	3	1	5
		Total	54	15	15	24
	M	2	4	1	0	3
		3	5	3	0	2
		4	5	0	0	5
		5	4	1	1	2
		6	4	3	1	-
		Total	22	8	2	12
F ₁ X AR	F	2	10	8	1	1
		3	10	9	0	1
		4	10	8	1	1
		5	10	9	0	1
		6	10	10	0	-
		X	10	8	0	2
		Total	60	52	2	6
	M	2	10	9	1	0
		3	10	10	0	0
		4	10	9	0	1
		5	10	9	1	0
		6	9	9	0	-
		Total	49	46	2	1

apresentaram 6 pares recombinantes e 2 heterozigotos, enquanto o único macho misto apresentou 2 pares heterozigotos e um recombinante. Os cromossomos desse macho portador de cariótipo misto estavam morfológicamente bastante alterados, na maioria das células. Seu microcromossomo não pôde ser analisado.

Os resultados das Tabelas 3 e 4 mostraram, portanto, que as fêmeas F_1 contribuíram diferentemente, no que se refere à constituição cromossômica dos gametas, para a formação dos descendentes nos 2 tipos de retrocruzamentos. Os descendentes de F_1 X mulleri caracterizavam-se por uma variabilidade cromossômica muito maior que os de F_1 X arizonensis.

A Tabela 5 destaca os resultados da análise dos cromossomos X das fêmeas descendentes dos retrocruzamentos. Nesse experimento, foram analisadas 19 fêmeas, sendo 9 descendentes de F_1 X MU e 10 descendentes de F_1 X AR. Das 9 fêmeas descendentes do cruzamento F_1 X MU, 3 eram homozigotas para esse cromossomo, 1 era heterozigota e 5 eram recombinantes. Uma das recombinantes era heterozigota para a região proximal (tipo B). Das 10 fêmeas descendentes de F_1 X AR, o cromossomo X era homozigoto em 8 e recombinante em 2, sendo, ambas as recombinantes, homozigotas para a região cromossômica proximal.

A fêmea heterozigota para o cromossomo X (sem recombinação) e a fêmea recombinante heterozigota para a região proximal do mesmo cromossomo, obtidas nos cruzamentos F_1 X MU, foram analisadas quanto à associação desse cromossomo com o nucléolo (Figura 17). Na fêmea heterozigota, as células das glândulas salivares mostraram um único elemento do par X associado ao nucléolo (Figura 17C). Contudo, a má qualidade dos cromossomos impediu uma análise mais precisa quanto à origem específica do cromossomo associado ao nucléolo. A fêmea portadora do X recombinante heterozigoto na extremidade proximal permitiu, porém,

TABELA 5. Constituição do par de cromossomos X, quanto à origem específica, na descendência feminina dos retrocruzamentos de fêmeas F_1 (mulleri X arizonensis) com machos mulleri e arizonensis.

Tipo de Cruzamento	Total de indivíduos analisados	Cromossomos X			
		Homozigotos	Heterozigotos	Recombinantes	
				homozigose proximal	heterozigose proximal
F_1 X MU	9	3	1	4	1
F_1 X AR	10	8	0	2	0



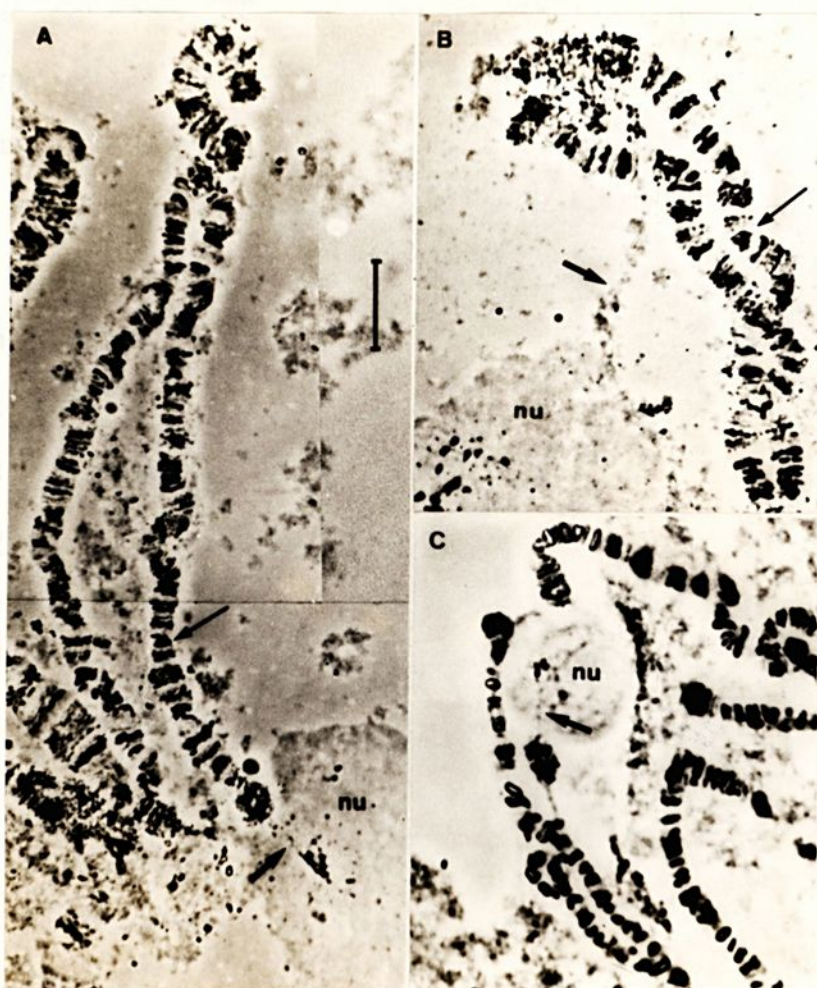


FIGURA 17. Fêmeas descendentes de retrocruzamentos de fêmeas F_1 (mulleri/arizonensis) com machos mulleri, mostrando associação de um único X ao nucléolo. A, B. Células de uma mesma fêmea, portadora de cromossomo X recombinante tipo B. A seta longa aponta a banda marcadora do X de arizonensis, e a seta curta aponta os filamentos que unem esse cromossomo ao nucléolo. Em B, a região proximal do X de arizonensis encontra-se pufada. C. Fêmea heterozigota para o cromossomo X. A origem do X associado ao nucléolo não pôde ser determinada nessa lâmina.

observar um único X associado ao nucléolo e verificar, também, que o mesmo era o originado de arizonensis (Figura 17A, B). Nessa larva portadora de recombinação no X, os cromossomos estavam morfológicamente alterados em muitas células. Em algumas, a extremidade proximal do cromossomo X de arizonensis estava transformada em um enorme pufe, como o que caracteriza a extremidade proximal do X nos machos parentais e híbridos (Figura 17B).

Quanto aos demais cromossomos, ambas as fêmeas apresentavam a seguinte constituição: fêmea heterozigota para o X — recombinante para os cromossomos 2, 3, 4 e 5 (respectivamente, tipos A, D, B e G) e heterozigota para o microcromossomo; fêmea recombinante proximal para o X — homozigota para o cromossomo 3; heterozigota para o 5 e o microcromossomo, e recombinante para o 2 e o 4 (respectivamente, tipos C e D).

Nas fêmeas de ambos os retrocruzamentos, os microcromossomos comportavam-se como os das fêmeas híbridas F_1 , isto é, às vezes ligeiramente dissociados, mas sem amplificação.

As outras 17 fêmeas, homozigotas para o cromossomo X ou recombinantes homozigotas para a região proximal desse cromossomo, mostraram, na maioria dos casos, a associação observada normalmente entre o X e o nucléolo nas espécies parentais. Cinco das 17 fêmeas, porém, apresentaram um número variável de células das glândulas salivares com despareamento proximal do X e ligação bem evidente de um único X ao nucléolo.

A Figura 18 refere-se às observações efetuadas nessas fêmeas. Das 5 fêmeas, uma foi obtida no cruzamento de fêmeas F_1 com machos AR (Figura 18A, B) e 4 no cruzamento com machos MU (Figura 18C-H). Na primeira fêmea, o despareamento proximal e associação de um único X ao nucléolo foram verificados em 50% das células das glândulas salivares; nas demais, o fenômeno foi observado em um mínimo de 3 e um máximo de 10 células.

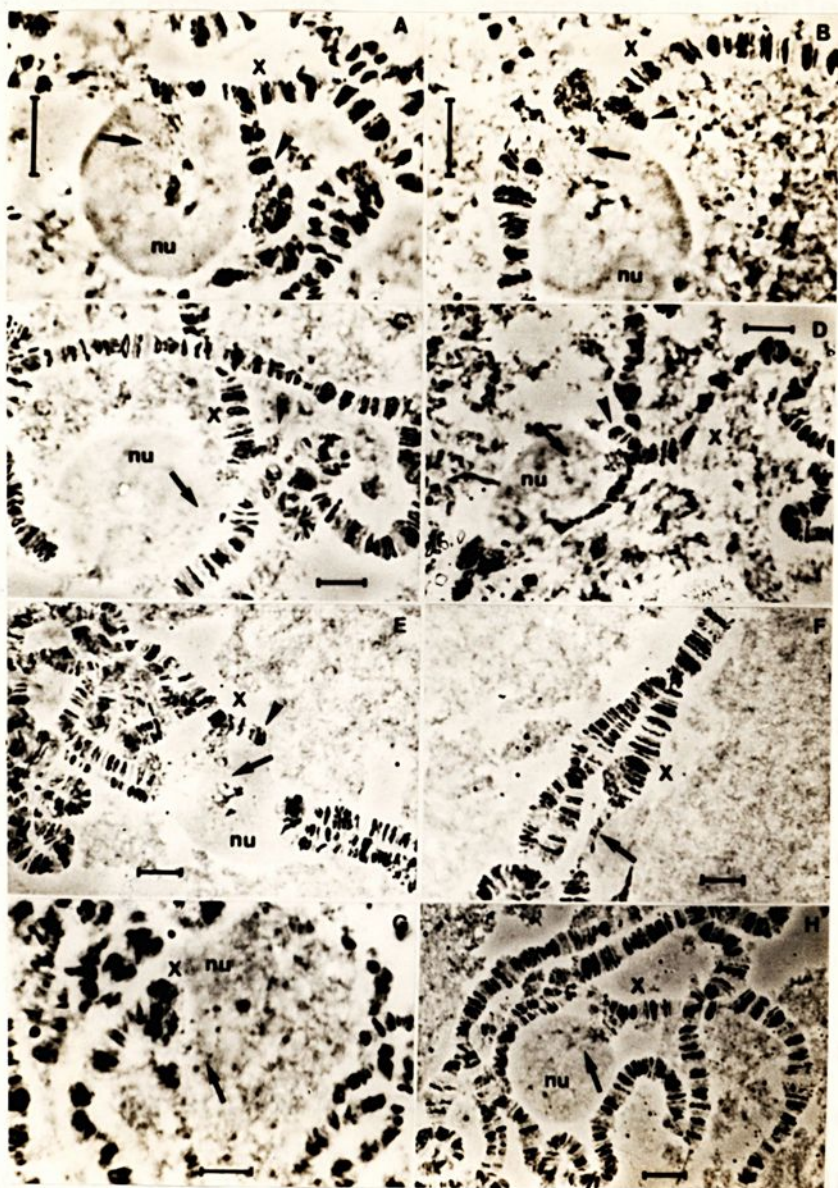


FIGURA 18. Fêmeas descendentes de retrocruzamentos de fêmeas F_1 (mulleri/arizonensis) com machos das duas espécies parentais, portadoras de cromossomos X homozigotos ou recombinantes homozigotos na região proximal. A a E. Região proximal do cromossomo X despaçada, mostrando associação (indicada pela seta longa) de um único homólogo ao nucléolo. O outro homólogo (indicado pela seta curta) encontra-se associado a um autossomo (em A) ou livre (em B, D, E). F a H. Região proximal do cromossomo X aparentando associação de um único homólogo a um autossomo (indicada pela seta em F) ou ao nucléolo (indicada pela seta em G e H). A, B. Fêmea F_1 X macho AR. C a H. Fêmea F_1 X macho MU.

Nessas células, o cromossomo X não associado ao nucléolo encontrava-se aparentemente livre (Figura 18B, D, E) ou ligado à região proximal de um autossomo (Figura 18A, C). Em algumas células, o cromossomo X associado ao nucléolo mostrava também associação à região proximal de um autossomo (Figura 18A, B, E).

Na Figura 18F, G, H, não se observa desaparecimento acentuado da região proximal do cromossomo X. A observação cuidadosa mostra, porém, um único cromossomo X associado à região proximal de outro cromossomo (Figura 18F) ou aos filamentos que penetram no nucléolo (Figura 18G, H). Na Figura 18G, esses filamentos apresentam-se em forma de leque.

A Tabela 6 contém a constituição cromossômica completa das 5 fêmeas em análise. Não há aparentemente, uma relação entre o comportamento do X e uma determinada constituição cromossômica, pois esta é muito variável entre os indivíduos que apresentaram o fenômeno.

Fenômenos semelhantes aos observados nessas fêmeas foram também vistos em uma fêmea aldrichi obtida do estoque analisado. A descrição dessas observações é aqui inserida para efeito de comparação (Figura 19). As quatro fotografias da Figura correspondem a quatro células de uma mesma fêmea. Em duas das células verifica-se desaparecimento da região proximal do cromossomo X e associação de um único X ao nucléolo (Figura 19A, B). Em uma terceira célula (Figura 19C), embora não haja desaparecimento na região proximal, aparentemente um único X associa-se ao nucléolo. Finalmente, a última célula (Figura 19D) mostra ligação de um só X aos autossomos 5 e 6.

b. Segundo Experimento: fêmeas híbridas F_1 (mulle
ri X arizonensis) X machos arizonensis.

Um segundo experimento de retrocruzamentos entre

TABELA 6. Constituição cromossômica das fêmeas descendentes de retrocruzamentos, homozigotas para a região proximal do X, e que apresentaram despareamento e associação de um só membro do par ao nucléolo. A a D = tipos recombinantes; AR AR = homozigotos arizonensis; MU MU = homozigotos mulleri; AR MU = heterozigotos.

Tipo de Cruzamento	Cromossomos					
	X	2	3	4	5	6
F ₁ X AR	AR <u>B</u>	AR <u>B</u>	AR AR	AR MU	AR <u>D</u>	AR AR
F ₁ X MU	MU MU	AR MU	AR MU	MU MU	AR MU	MU MU
	MU MU	AR MU	MU <u>A</u>	MU <u>A</u>	MU <u>C</u>	MU MU
	MU <u>C</u>	AR MU	MU MU	MU <u>H</u>	AR MU	AR MU
	MU <u>C</u>	MU <u>C</u>	MU MU	MU <u>D</u>	AR MU	AR MU



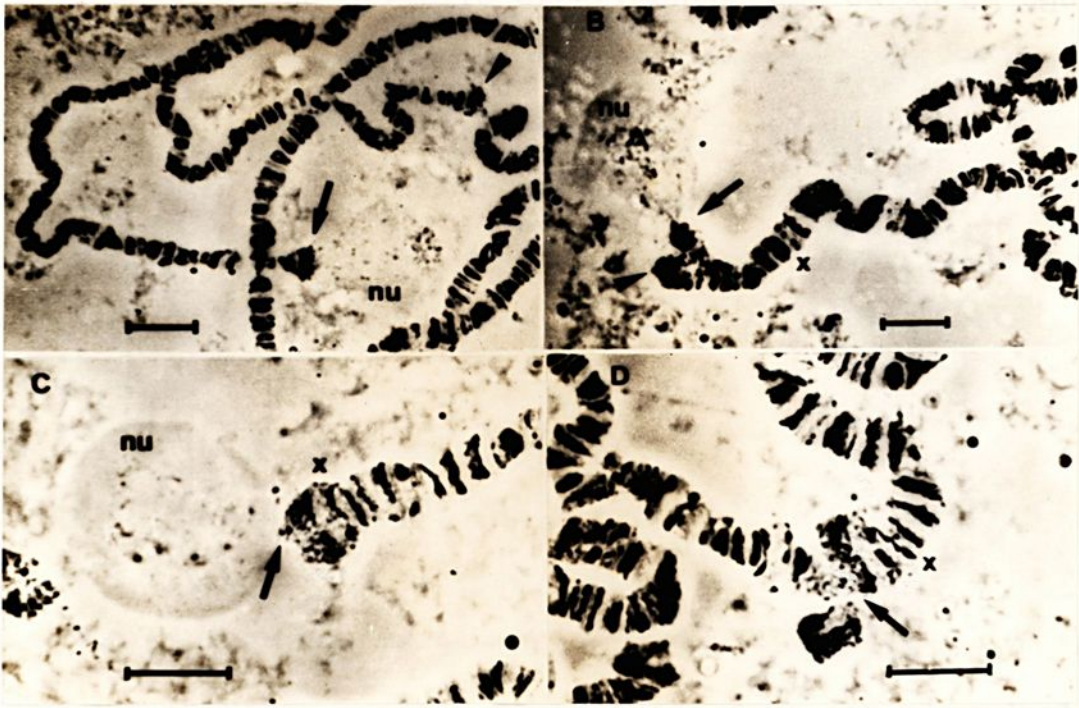


FIGURA 19. Fêmea aldrichi. A, B. Despareamento da região proximal do cromossomo X e associação de um só membro do par ao nucléolo. C. Filamento ligando, aparentemente, um só X ao nucléolo. D. Despareamento tênue da base do X e associação de um só cromossomo aos autossomos 5 e 6.

fêmeas F_1 e machos arizonensis foi realizado com o objetivo de verificar se os resultados obtidos no primeiro repetir-se-iam, especialmente quanto à predominância de homozigotos. Por outro lado, tínhamos também a esperança de poder diagnosticar a origem específica do cromossomo X dos machos descendentes, o que não fora possível no primeiro experimento. Uma caixa de população preparada com 70 fêmeas F_1 e 70 machos arizonensis produziu, no decorrer de um mês de manutenção, 21 larvas que foram utilizadas para preparações citológicas, e 8 adultos. Das 21 larvas, 17 foram analisadas quanto aos cromossomos, sendo 9 fêmeas e 8 machos; as outras 4 preparações apresentaram cromossomos muito alterados, razão pela qual foram descartadas. Entre os adultos obtidos havia 7 fêmeas e um macho.

Alguma mortalidade foi verificada entre as larvas, nos diferentes estádios, inclusive no 3º estágio adiantado (larvas de espiráculos anteriores amarelos). Um pequeno teste mostrou que entre as pupas a mortalidade deve ser elevada: 15 pupas transferidas para novo frasco deram origem a 5 adultos, sendo 4 fêmeas e um macho.

Os resultados deste 2º experimento diferiram dos obtidos no primeiro. Todos os descendentes machos e fêmeas analisados eram mistos quanto aos cromossomos.

Como no primeiro teste, excetuando-se o par 6, todos os demais apresentaram recombinantes. No cromossomo X, além dos tipos A e C, detectados anteriormente, apareceu um novo tipo - E -, resultante de uma quebra única, na posição C_4 (Figura 20). Nessa posição ocorreu também uma das quebras que determinaram o recombinante D, descrito no primeiro experimento.

No cromossomo 2 apareceram os tipos A e C já conhecidos do primeiro experimento, e dois novos tipos, D e E. O tipo D é complementar de A, e o tipo E é resultante de quebras

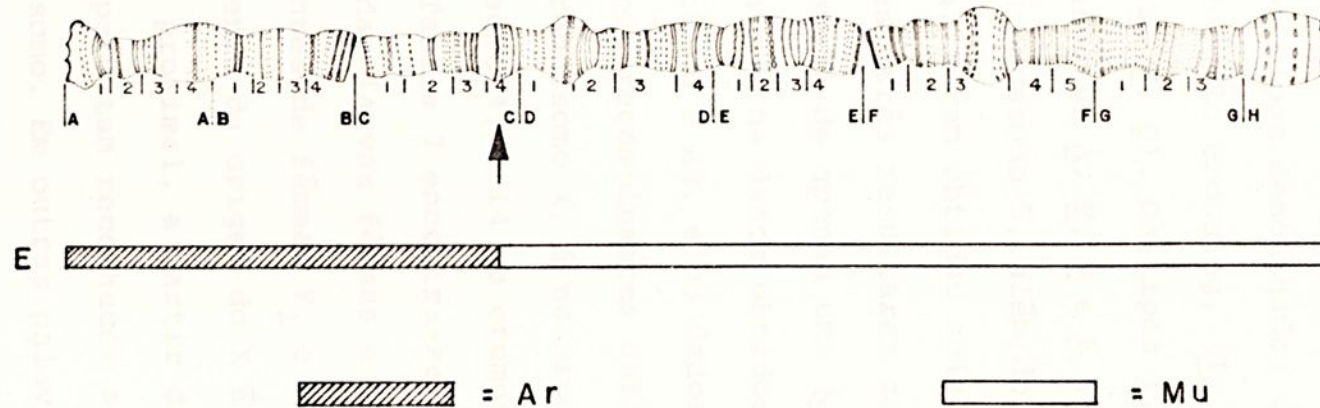


FIGURA 20. Recombinante interespecífico do cromossomo X.

simultâneas nas posições A_4 e F_6/G_1 , as quais, isoladamente, originaram os tipos A e C (Figura 21).

No cromossomo 3 foram observados os tipos C e D, descritos anteriormente, e dois novos tipos - E, F -, sendo E complementar de B, e F complementar de C (Figura 22).

No cromossomo 4 apareceram os tipos já descritos D, F e G, e 10 novos tipos denominados de I a R. Seis dos novos tipos resultaram de duplo crossing, (I, J, M, O, P, R) e 4 de um só crossing (K, L, N, Q). Os tipos I, J, M e N são respectivamente complementares de A, F, B e E (Figura 23).

No cromossomo 5, além dos tipos A, D e G, detectados anteriormente, foram obtidos seis novos tipos, denominados de I a N. Destes, três resultaram de 2 quebras simultâneas (I, M e N), e os demais de apenas uma (J, K e L) (Figura 24).

Reunindo os dados obtidos no primeiro teste de retrocruzamentos com MU e AR, e os dados deste segundo teste, o número total de tipos recombinantes obtidos, por cromossomo, foi o seguinte: 5 no cromossomo X, 5 no cromossomo 2, 6 no cromossomo 3, 18 no cromossomo 4, e 14 no cromossomo 5.

Na Tabela 7 encontra-se a origem específica dos cromossomos X e 6 das larvas fêmeas e machos analisadas no segundo teste, descendentes de fêmeas F_1 e machos arizonensis. Nos machos, o reconhecimento da origem do X é apenas parcial, isto é, refere-se à região proximal, a partir da banda marcadora. Não há marcadores que permitam reconhecer a origem específica do restante do cromossomo. Em outras palavras, não se pode detectar recombinantes do cromossomo X nos machos. A classificação desses cromossomos como oriundos de uma ou outra espécie, refere-se, portanto, apenas à extremidade proximal.

Entre as nove fêmeas analisadas, havia três homozigotas para os cromossomos X e 6, uma homozigota para o X e he

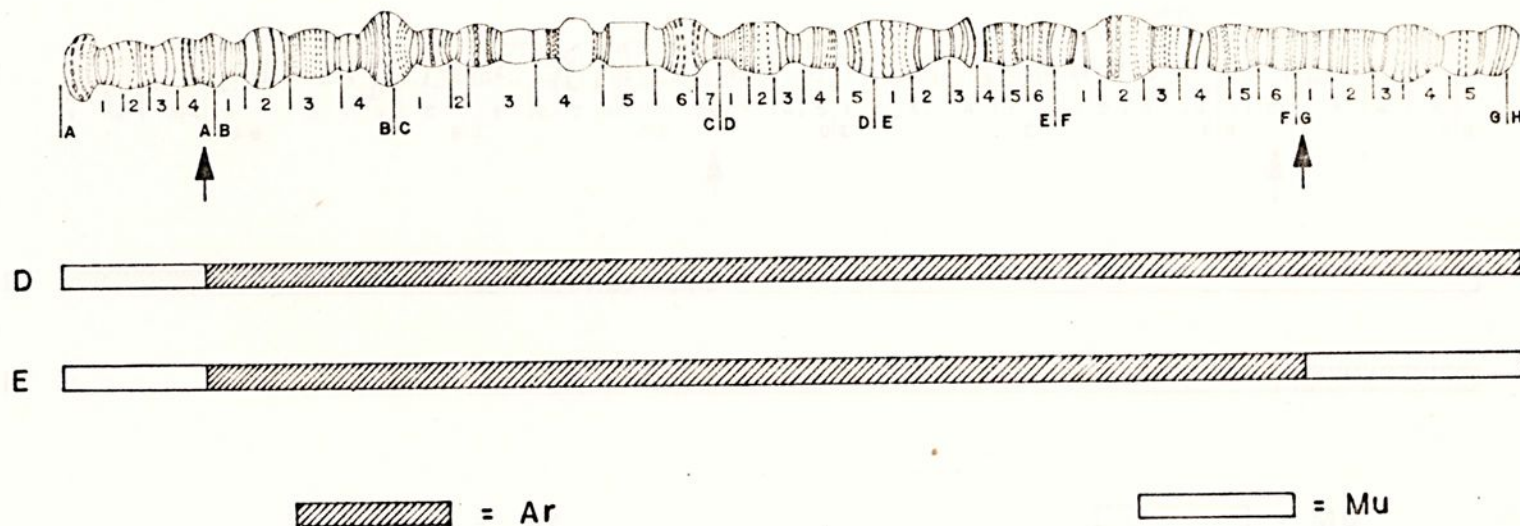


FIGURA 21. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 2.

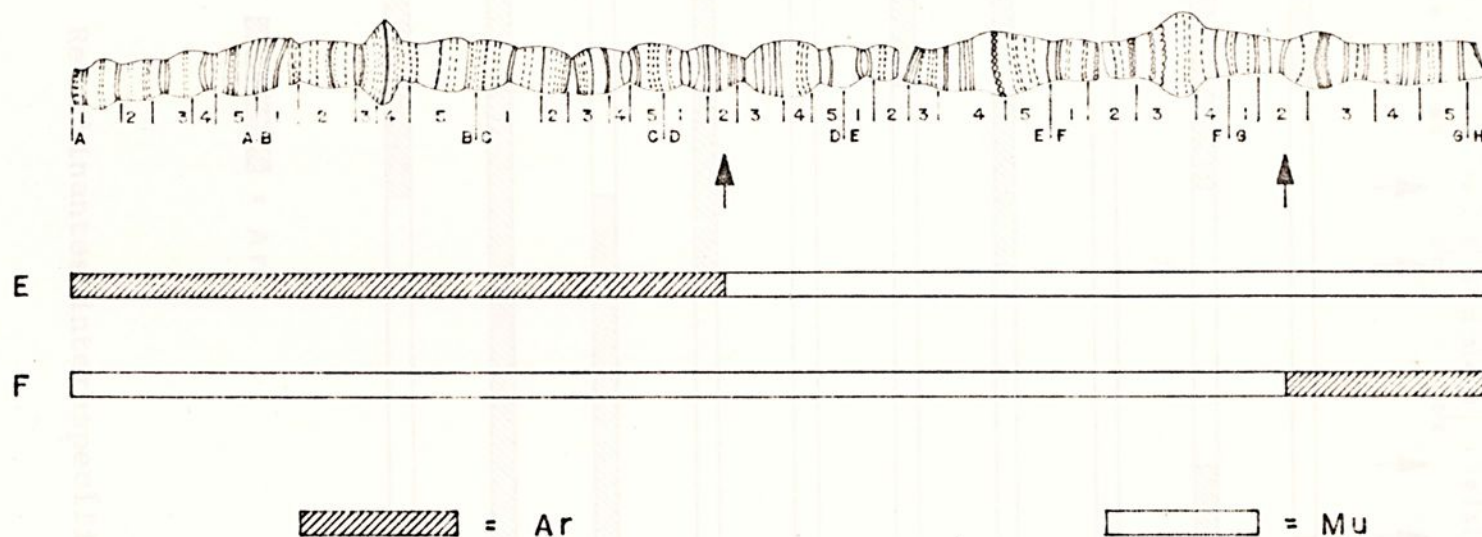


FIGURA 22. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 3.

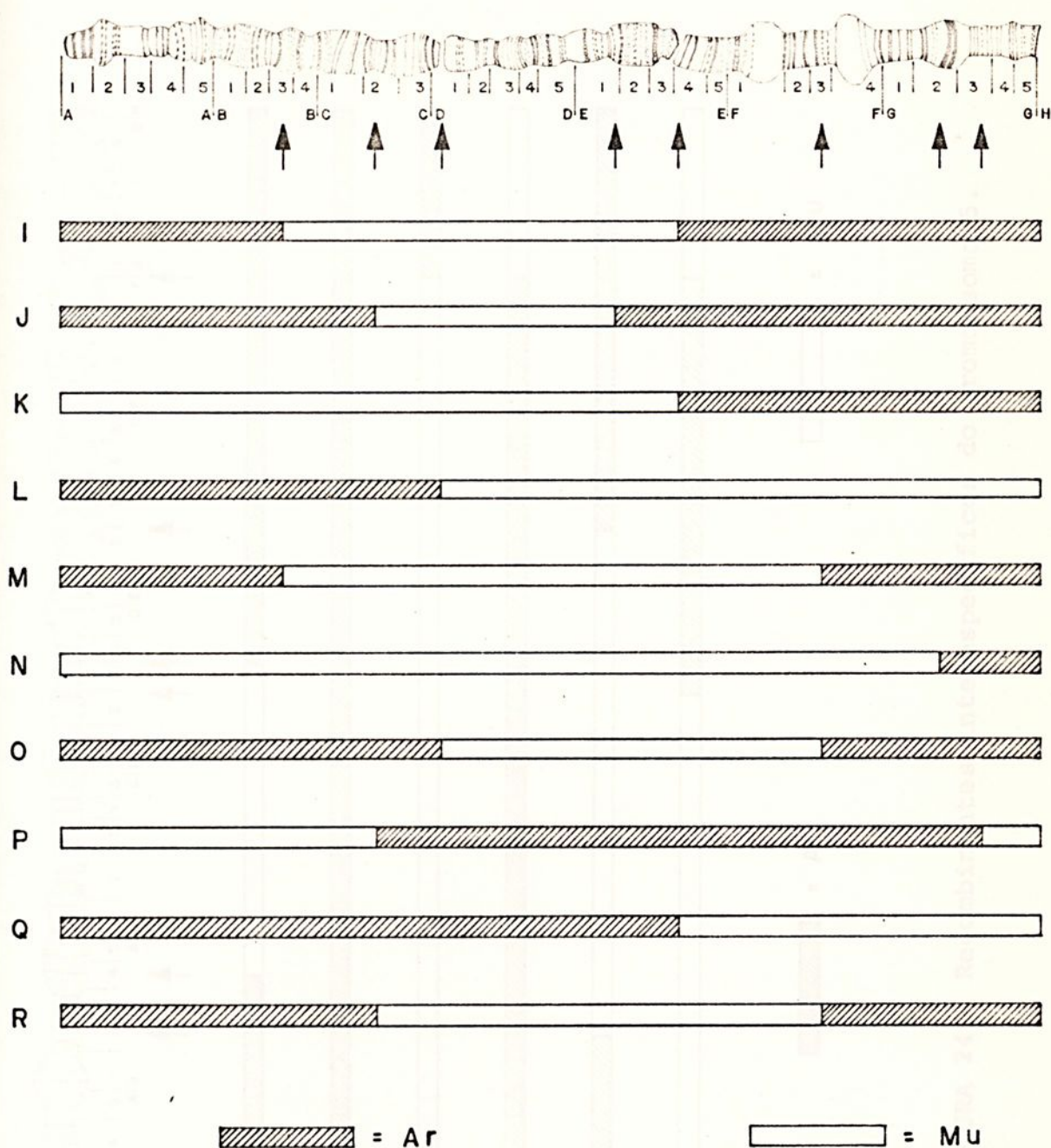


FIGURA 23. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 4.

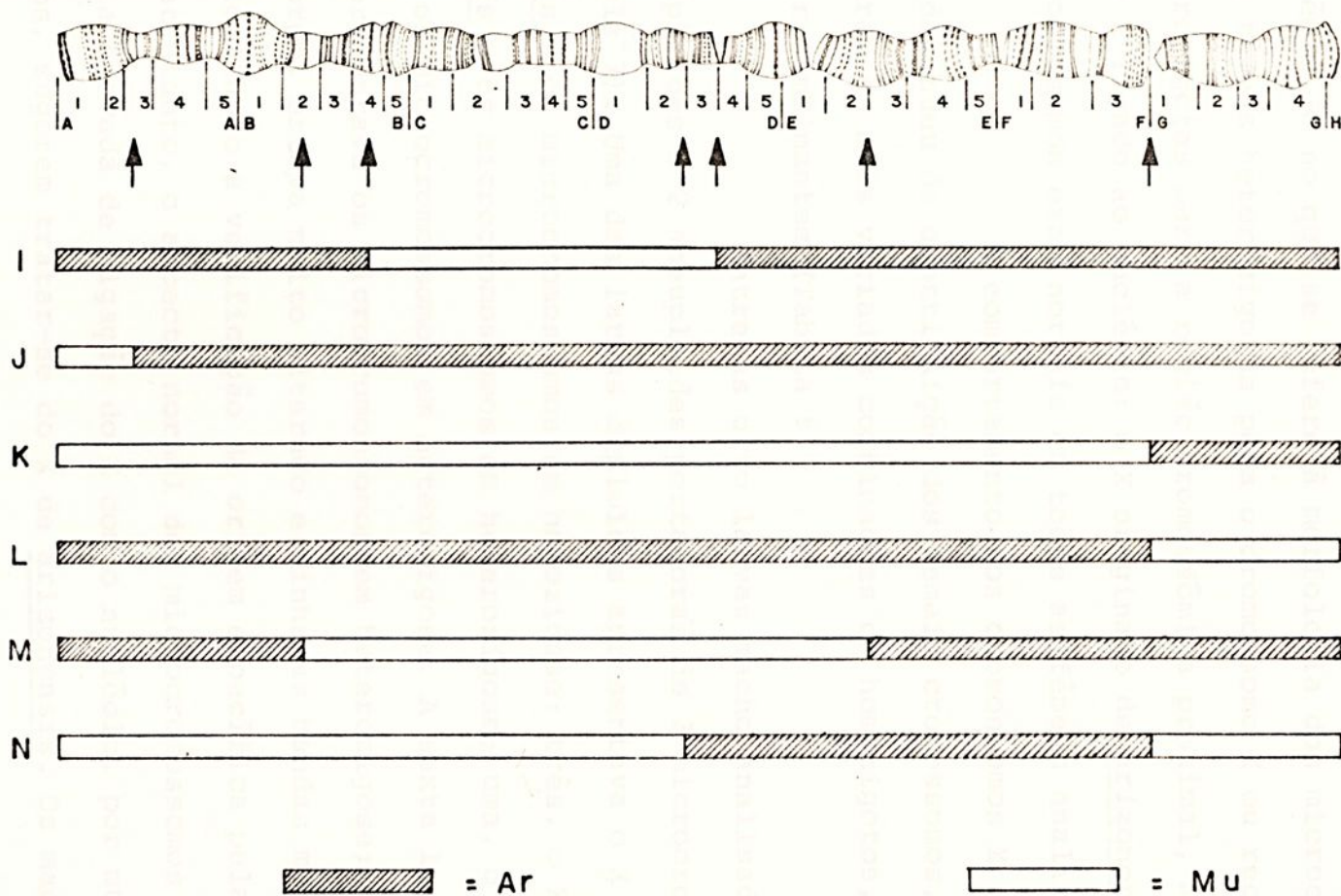


FIGURA 24. Recombinantes interespecíficos do cromossomo 5.

terozigota para o 6, duas heterozigotas para o X e para o 6, e três portadoras de cromossomos X recombinantes (heterozigotos para a região proximal) e de cromossomos 6 em homozigose.

Essas fêmeas confirmaram as observações anteriores no que se refere à associação entre o cromossomo X e o nucléolo, e no que se refere à morfologia dos microcromossomos. As fêmeas heterozigotas para o cromossomo X ou recombinantes heterozigotas para a região cromossômica proximal, mostraram um só X ligado ao nucléolo: o X originado de arizonensis. Os microcromossomos eram normais em todas as fêmeas analisadas.

O comportamento dos cromossomos X e 6, portanto, independeu da constituição dos demais cromossomos, que apresentaram as mais variadas combinações de homozigotos, heterozigotos e recombinantes (Tabela 8).

Entre as oito larvas macho analisadas, havia 6 diploides e 2 aneuploides portadoras de 3 microcromossomos (Tabela 7). Uma das larvas diploides apresentava o X de arizonensis e os microcromossomos em homozigose; três, o X de arizonensis e os microcromossomos em heterozigose; uma, o X de mulleri e os microcromossomos em heterozigose. A sexta larva diploide apresentava os microcromossomos em heterozigose; o cromossomo X, porém, estava muito alterado e tinha as bandas muito tênues, dificultando a verificação da origem específica pela morfologia. Entretanto, o aspecto normal dos microcromossomos e a frequência elevada de ligação do X com o nucléolo, por muitos filamentos, sugerem tratar-se do X de arizonensis. Os machos aneuploides eram portadores de cromossomos X de arizonensis e três microcromossomos, sendo dois de arizonensis e um de mulleri. A dedução quanto à origem dos microcromossomos, nos aneuploides, foi baseada na constituição cromossômica dos pais (fêmea heterozigota e macho arizonensis) e no pareamento dos microcromossomos.

TABELA 7. Constituição, quanto aos cromossomos X e microcromossomos, das larvas analisadas no segundo experimento de retrocruzamentos de fêmeas F_1 (mulleri X arizonensis) com machos arizonensis. A, C, E = tipos recombinantes. Demais símbolos como na Tabela 6.

Sexo das larvas	Cromossomos X	Cromossomos 6	Número de larvas
Fêmeas	AR AR	AR AR	3
	AR AR	AR MU	1
	AR MU	AR MU	2
	AR (<u>A</u> , <u>C</u> , <u>E</u>)	AR AR	3
Machos	AR	AR AR	1
	AR	AR MU	3
	MU	AR MU	1
	AR (?)	AR MU	1
	AR	AR MU AR	2



TABELA 8. Constituição cromossômica das fêmeas obtidas no segundo experimento de retrocruzamentos (fêmeas F_1 X machos arizonensis). A a L = tipos recombinantes. Demais símbolos como na Tabela 6.

Fêmeas	Cromossomos					
	X	2	3	4	5	6
1	AR <u>C</u>	AR MU	AR <u>E</u>	AR <u>I</u>	AR AR	AR AR
2	AR MU	AR MU	AR MU	AR <u>J</u>	AR MU	AR MU
3	AR AR	AR AR	AR AR	AR <u>K</u>	AR <u>I</u>	AR AR
4	AR AR	AR <u>C</u>	AR AR	AR <u>D</u>	AR AR	AR MU
5	AR AR	AR MU	AR AR	AR MU	AR AR	AR AR
6	AR <u>A</u>	AR <u>D</u>	AR MU	AR <u>G</u>	AR MU	AR AR
7	AR AR	AR AR	AR <u>D</u>	AR MU	AR <u>J</u>	AR AR
8	AR MU	AR <u>A</u>	AR AR	AR <u>L</u>	AR <u>K</u>	AR MU
9	AR <u>E</u>	AR MU	AR <u>C</u>	AR <u>F</u>	AR <u>G</u>	AR AR



A constituição cromossômica completa dos machos analisados encontra-se na Tabela 9. Os machos, como as fêmeas, apresentavam constituição cromossômica variável.

Nos machos portadores de cromossomo X e microcromossomos de arizonensis, os microcromossomos eram normais. Os machos portadores de X de arizonensis e cromossomos 6 em heterozigose mostraram microcromossomos alterados quanto à organização das bandas, em várias células, mas sem amplificação (Figura 25). Em ambos os casos, o cromossomo X associava-se ao nucléolo na maioria das células.

O macho portador de X de mulleri e microcromossomos em heterozigose apresentou alteração do aspecto das bandas de ambos os microcromossomos na maioria das células. Amplificação evidente, porém, foi vista em algumas células apenas (Figura 26). A associação do X e de um microcromossomo, ao nucléolo, foi observada em várias células desse macho.

Nos machos aneuploides, dois dos três microcromossomos eram normais, e o terceiro apresentava um aspecto peculiar, heterocromatinizado, como uma rede fortemente corada. Esse microcromossomo destacava-se no conjunto cromossômico de todas as células pela estrutura e pela intensidade de coloração. Em algumas células parecia amplificado, correspondendo pelo menos ao dobro do tamanho de um único microcromossomo (Figura 27).

A Figura 28 mostra um mesmo microcromossomo heterocromatinizado, observado em dois planos focais diferentes. À esquerda, apenas a estrutura em rede é visível. À direita, em plano focal inferior, observa-se o padrão de bandas quase normal, sugerindo que a alteração é superficial, como uma cobertura.

Em um dos machos aneuploides, os dois microcromossomos normais encontravam-se despareados, indicando origem espe

TABELA 9. Constituição cromossômica dos machos descendentes do segundo experimento de retrocruzamentos (fêmeas F_1 X machos arizonensis). A a R = tipos recombinantes. Demais símbolos como na Tabela 6.

Machos	Cromossomos					
	X	2	3	4	5	6
1	AR	AR <u>E</u>	AR <u>E</u>	AR <u>M</u>	AR <u>A</u>	AR MU
2	MU	AR <u>D</u>	AR MU	AR <u>N</u>	AR <u>L</u>	AR MU
3	AR	AR AR	AR MU	AR <u>O</u>	AR <u>M</u>	AR MU
4	AR	AR AR	AR MU	AR AR	AR <u>L</u>	triplo-6
5	AR	AR <u>A</u>	AR <u>D</u>	AR <u>R</u>	AR AR	AR AR
6	AR	AR MU	AR MU	AR <u>Q</u>	AR <u>D</u>	AR MU
7	AR	AR <u>D</u>	AR <u>F</u>	AR <u>Q</u>	AR <u>G</u>	triplo-6
8	AR(?)	AR <u>E</u>	AR MU	AR <u>P</u>	AR <u>N</u>	AR MU



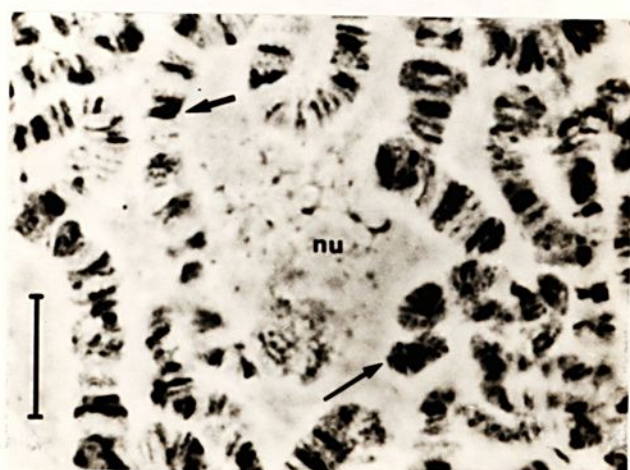


FIGURA 25. Macho descendente de retrocruzamento entre fêmea F_1 (mulleri/arizonensis) e macho arizonensis, portador de cromossomo X de arizonensis (a seta curta aponta sua banda marcadora) e microcromossomos em heterozigose, não amplificados (apontados pela seta longa). O cromossomo X está associado ao nucléolo.

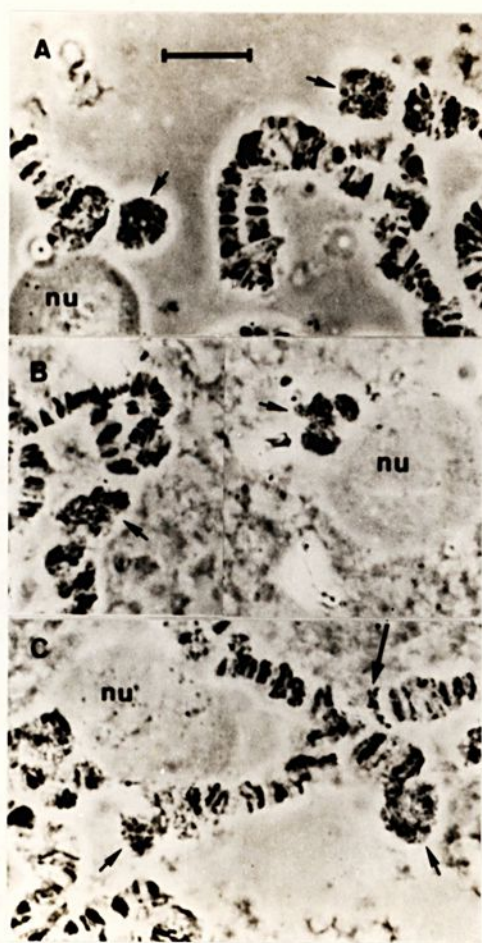


FIGURA 26. A, B, C. Células de um mesmo macho, descendente de fêmea F_1 X macho arizonensis, portador de cromossomos X de mulleri e microcromossomos em heterozigose. Alguma amplificação diferencial de um dos homólogos do par de microcromossomos (apontados pela seta curta) parece caracterizada em B e C. O cromossomo X liga-se ao nucléolo em A e C (nesta última, a seta longa indica a banda marcadora do X de mulleri), e um dos microcromossomos liga-se ao nucléolo em A, B e talvez em C.



FIGURA 27. Conjunto cromossômico de macho aneuploide (triplo 6), mostrando o microcromossomo alterado (apontado pela seta maior) associado a um cromossomo 6 normal. O terceiro cromossomo 6 aparece à direita, apontado pela seta menor. Observe-se que o microcromossomo alterado destaca-se, no conjunto cromossômico, pela intensidade de coloração e pelo tamanho avantajado em relação aos outros microcromossomos.

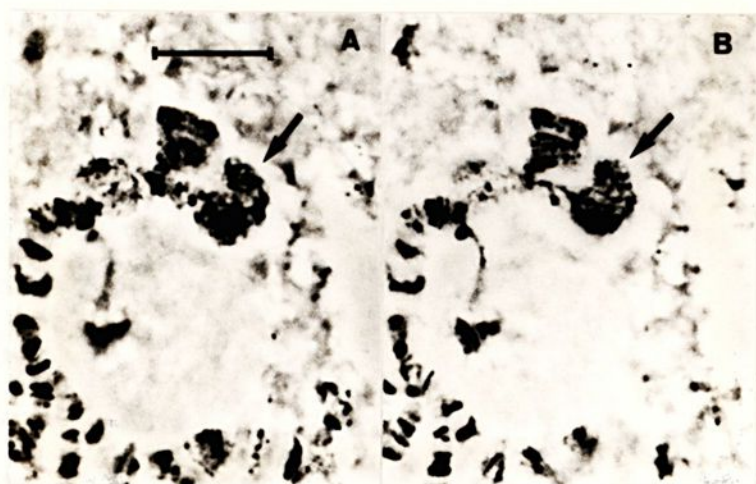


FIGURA 28. A, B. Microcromossomos de um macho aneuploide (triplo 6), vistos em dois planos focais. O cromossomo heterocromatinizado (apontado pela seta) mostra duas estruturas diferentes: estrutura em rede, em plano superior (A), e estrutura diferenciada em bandas, em plano inferior (B).

cífica diferente, isto é, um proveniente de mulleri e outro de arizonensis (Figura 29A, B, C). No outro macho, os dois microcromossomos normais encontravam-se pareados, sendo ambos, portanto, originados de uma mesma espécie; no caso, arizonensis (Figura 29D, E, F). Como os retrocruzamentos foram feitos entre fêmeas híbridas F_1 e machos arizonensis, presume-se que ambos os machos aneuploides continham dois cromossomos de arizonensis (originados um de cada pai) e um de mulleri (originado da mãe). Isto indica que o microcromossomo heterocromatinizado, no primeiro macho, era de arizonensis, e, no segundo, de mulleri.

O macho portador do cromossomo de arizonensis heterocromatinizado apresentava uma anomalia morfológica: apenas um de seus espiráculos anteriores tinha a coloração amarela escura que caracteriza o 3º estágio adiantado, enquanto o outro era totalmente branco, como das larvas de fases anteriores.

Em ambos os machos aneuploides, o cromossomo X apresentou-se frequentemente associado ao nucléolo. O microcromossomo heterocromatinizado, porém, não mostrou essa associação.

2. Em lâminas de híbridos F_1 (mulleri/arizonensis) e espécies parentais, submetidas à hibridação "in situ" com RNA r.

A hibridação citológica DNA/RNA r foi realizada com o objetivo de confirmar a localização de cistrons DNA r no cromossomo X e no microcromossomo, previamente deduzida pela associação desses cromossomos com o nucléolo. Esse processo foi aplicado a lâminas de glândulas salivares e cérebro de larvas mulleri e arizonensis e de seus híbridos.

As lâminas de cérebro não mostraram incorporação. Entretanto, algumas das lâminas de glândulas salivares apresentaram resultados satisfatórios (Figura 30). Nessas lâminas, os

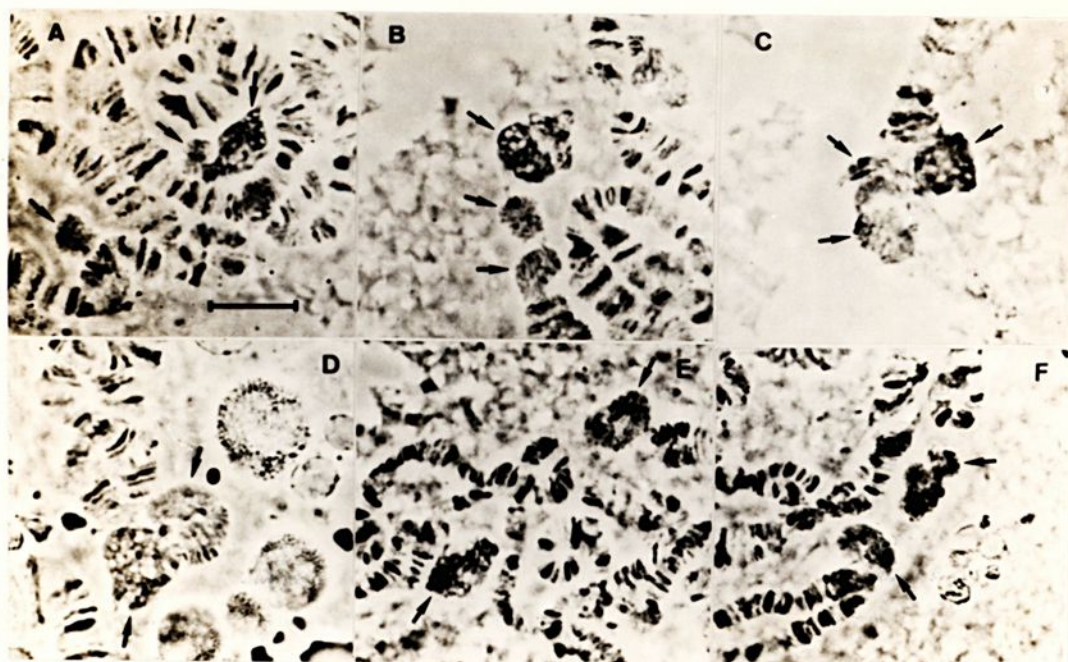


FIGURA 29. Machos aneuploides (triplo 6). A, B, C. Células de um mesmo macho mostrando heterocromatinização do microcromossomo de arizonensis. Neste macho os outros cromossomos 6 não pareiam. D, E, F. Células de um mesmo macho mostrando heterocromatinização do microcromossomo de mulleri. Os cromossomos 6 normais pareiam, neste macho.



grãos de prata, denotando hibridação, foram encontrados predominantemente nos nucléolos, tanto em fêmeas e machos das espécies parentais como nos híbridos. A granulação era mais intensa nos nucléolos dos machos híbridos (Figura 30D) que nos nucléolos das fêmeas e machos parentais e das fêmeas híbridas.

Quanto aos microcromossomos, um pequeno número de grãos foi observado sobre os mesmos e ao longo dos filamentos que os uniam ao nucléolo, em fêmeas e machos arizonensis e em fêmeas híbridas (Figura 30A, B, C). Dada a quase completa inexistência de grãos no "back ground" dessas células e a frequência com que o fenômeno foi observado nos indivíduos analisados, acreditamos que a presença desses grãos indique a existência de cistrons ribossômicos no microcromossomo desses indivíduos.

Não foi possível determinar se a amplificação do microcromossomo do macho híbrido envolve os cistrons ribossômicos. Nas células examinadas, os microcromossomos estavam apostos ao nucléolo e a granulação aparecia apenas neste último. Contudo a maior quantidade de grãos nos nucléolos dos machos híbridos pode estar associada a essa amplificação.

Quanto ao cromossomo X, foram encontradas duas situações: (a) inexistência de grãos na região proximal do filamento que une esse cromossomo ao nucléolo (Figura 30C, E); (b) grãos presentes sobre o cromossomo (Figura 30F).

Esse experimento foi repetido em um segundo lote de lâminas por nós encaminhado ao Dr. R. H. RICHARDSON, em 1977. Nesse segundo experimento, foi utilizada uma emulsão de grãos mais finos e a exposição foi 30 dias mais longa que a primeira. Embora a maior parte das lâminas tenha sido quebrada ou danificada na viagem de retorno, algumas puderam ser examinadas e mostraram os mesmos resultados do primeiro teste.

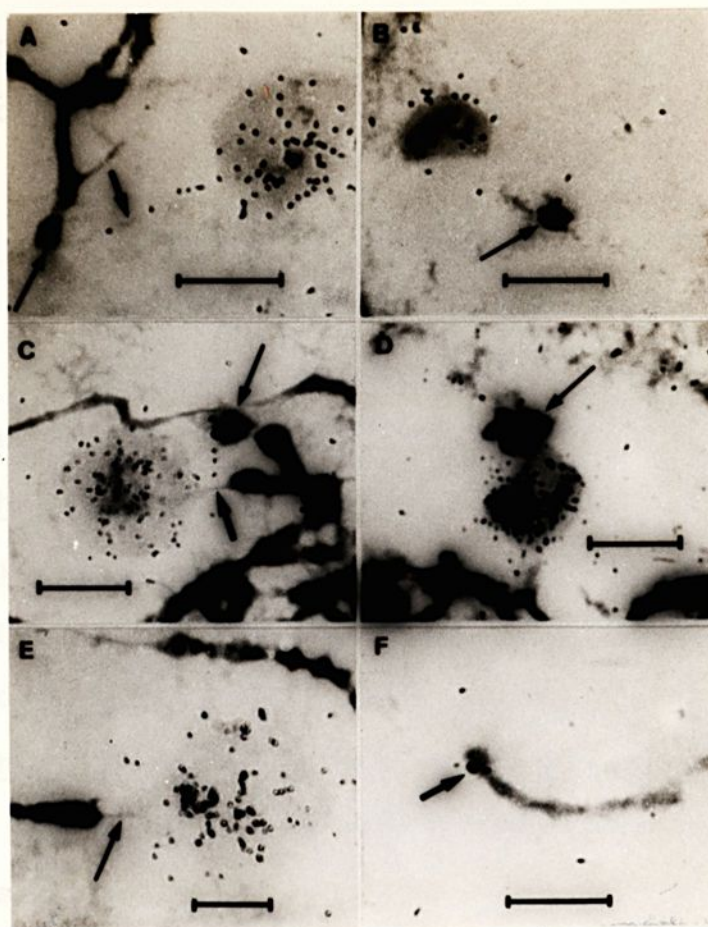


FIGURA 30. Hibridação "in situ" DNA/RNA r. A. Fêmea híbrida MU/AR. Grãos no nucléolo e no filamento (seta curta) que o associa a um microcromossomo (seta longa). B. Fêmea AR. Grãos no nucléolo, no microcromossomo (seta longa) e nos filamentos que partem dele. C. Fêmea híbrida MU/AR. Grãos no nucléolo, no microcromossomo (seta longa) e no filamento que o associa ao nucléolo. O filamento (seta curta) que liga um dos cromossomos X ao nucléolo é desprovido de grãos. D. Macho híbrido MU/AR. Microcromossomo amplificado (seta), associado ao nucléolo que apresenta grande concentração de grãos. E. Fêmea MU. Ausência de grãos na região proximal do filamento (seta) que associa o X ao nucléolo. F. Macho MU. Alguns grãos (seta) presentes sobre o cromossomo X.

C. Estudo da relação morfológica entre cromossomos e nucléolos abrangendo outras espécies do complexo mulleri e alguns de seus híbridos

1. Observações em lâminas não coradas ou coradas pelo método da orceína lacto-acética.

O estudo da ligação entre cromossomos e nucléolos foi realizado em glândulas salivares de fêmeas e machos de mojavensis, aldrichi, wheeleri, navajoa e, para efeito de comparação, de mulleri e arizonensis que já haviam sido analisadas previamente (BICUDO & RICHARDSON, 1977). O mesmo problema foi estudado nos híbridos mulleri/mojavensis, arizonensis/mojavensis, mulleri/aldrichi, mulleri/navajoa e mulleri/wheeleri.

Nas glândulas salivares das 6 espécies, a maioria das células mostra o nucléolo associado ao cromossomo X, nas fêmeas e nos machos. Na Figura 31A, B, são mostradas, respectivamente, uma célula de fêmea e de macho de mojavensis, onde essa associação pode ser vista. O aspecto é basicamente o mesmo nas demais espécies.

Nos híbridos aparecem novas facetas na associação entre cromossomos e nucléolo, envolvendo, além do cromossomo X, o par de microcromossomos. BICUDO & RICHARDSON (1977) observaram, nos machos híbridos mulleri/arizonensis, amplificação de um dos microcromossomos e associação desse microcromossomo amplificado ao nucléolo, enquanto nas fêmeas, só o X de arizonensis apresentava essa ligação.

A associação dos microcromossomos ao nucléolo foi também observada intraespecificamente. Em 5 das 6 espécies analisadas neste trabalho, essa associação apareceu em poucas células de alguns indivíduos do sexo masculino. As 5 espécies são mulleri, aldrichi, wheeleri, arizonensis e navajoa. Por



FIGURA 31. Associação entre o cromossomo X, o microcromossomo e o nucléolo em mojavensis. A. Macho. B. Fêmea. Em ambos, o cromossomo X está ligado ao nucléolo. C. Macho mostrando associação entre o microcromossomo e o X, e associação de ambos ao nucléolo. D. Fêmea. O microcromossomo está ligado ao nucléolo.

exemplo, em D. mulleri, foi vista três vezes, em células de machos, em mais de 400 células analisadas de 30 indivíduos de ambos os sexos. Nas outras espécies a frequência foi da mesma ordem.

Drosophila mojavensis, porém, foi mais constante quanto a esse aspecto, no sentido de que poucas células mas de vários indivíduos analisados (inclusive fêmeas), exibiam associação do nucléolo ao microcromossomo. Entretanto, como nessa espécie o microcromossomo liga-se com muita frequência à região proximal do cromossomo X (que por sua vez encontra-se ligada ao nucléolo) nem sempre é possível verificar com certeza se há verdadeira associação do microcromossomo ao nucléolo ou se sua posição em relação a este é apenas consequência da ligação com o X. Em algumas células, porém, pode-se ver um delgado filamento unindo o microcromossomo ao nucléolo. A impressão que se tem, embora haja pareamento normal dos microcromossomos, é de que um só elemento do par mostra a associação mencionada (Figura 31C, D).

Segue-se a descrição das observações realizadas nos híbridos interespecíficos.

a. Híbridos mulleri/mojavensis

Nos machos híbridos dessas duas espécies, o cromossomo que mais frequentemente mostra associação ao nucléolo é o X. Segue-se, com frequência bem menor, o cromossomo 6, e neste caso, um só dos membros do par estabelece essa ligação. Em alguns machos (e em mais de uma célula das glândulas salivares) estava presente, além do nucléolo de aparência normal, um corpúsculo semelhante ao nucléolo, porém de tamanho menor. Em todos os casos observados, esse corpúsculo estava associado ao cromossomo X. Em uma das células, o X associava-se simultaneamente ao nucléolo normal e ao corpúsculo. Nesses machos híbridos não

ocorre amplificação do microcromossomo, embora seja frequente um dos elementos do par apresentar alteração de seu padrão de bandas. Em várias células foi observada a associação do microcromossomo à extremidade proximal do X, aparentando, em duas delas, pareamento de bandas homólogas.

Os fenômenos descritos para os machos podem ser observados na Figura 32.

Nas fêmeas predominou a situação em que um só dos cromossomos X apresentava ligação ao nucléolo e na maioria das células esse X era claramente o originado de mojavensis. Entretanto, em uma mesma glândula, foram também encontradas células em que ambos os cromossomos X estavam ligados entre si pela extremidade proximal, deixando dúvida sobre qual cromossomo ou se ambos os cromossomos associavam-se ao nucléolo. Associação incontestável envolvendo o X de mulleri foi observada em duas fêmeas, em uma única célula.

Nas fêmeas mulleri/mojavensis, os dois microcromossomos podem ter seu padrão de bandas normal ou um deles pode apresentar uma ligeira desorganização desse padrão. Também nesse caso, a associação do nucléolo estabelece-se aparentemente com um só dos microcromossomos. Uma das fêmeas analisadas mostrou, em uma das células salivares, além do nucléolo normal, um corpúsculo semelhante ao nucléolo, de tamanho menor como nos machos, porém associado aos microcromossomos.

Os fenômenos descritos para as fêmeas podem ser observados na Figura 33.

b. Híbridos arizonensis/mojavensis

Estes foram os únicos híbridos obtidos nas duas direções de cruzamento, analisados neste trabalho. Entretanto, os fenômenos observados, quanto ao problema em estudo, indepen



FIGURA.32. Machos híbridos mulleri/mojavensis. A. Cromossomo X e um microcromossomo (apontado pela seta) associados ao nucléolo. B, C. Corpúsculos semelhantes ao nucléolo associados ao cromossomo X. D, E, F. Microcromossomos. Em D, ligeiramente dissociados, em E, normais; em F há um aparente pareamento entre a região proximal do cromossomo X e o microcromossomo apontado pela seta.

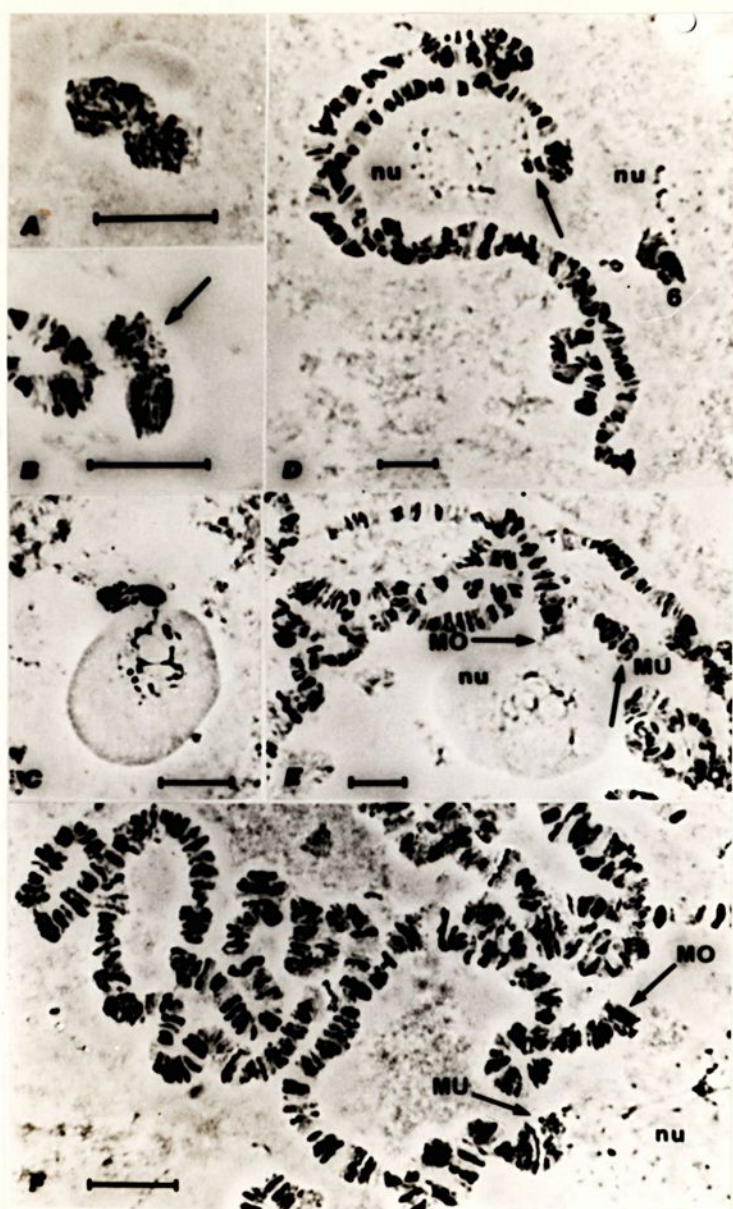


FIGURA 33. Fêmeas híbridas mulleri/mojavensis. A, B, C. Micro cromossomos. Em A a estrutura dos dois homólogos é normal. Em B, o homólogo apontado pela seta mostra alguma alteração estrutural. Em C um dos homólogos associa-se ao nucléolo. D, E, F. Associação de um cromossomo X ao nucléolo. Em D aparece também um corpúsculo semelhante ao nucléolo associado ao par de microcromossomos. Em E o cromossomo ligado ao nucléolo é o originado de mojavensis, e em F, é o originado de mulleri.

deram da direção de cruzamento que produziu esses híbridos.

Nos machos, os microcromossomos preservam seu padrão de bandas e não sofrem amplificação. Neles predomina a ligação do cromossomo X ao nucléolo, embora em algumas poucas células um dos homólogos do par 6 também mostre essa associação.

As fêmeas híbridas dessas espécies também têm microcromossomos morfológicamente normais. Nessas fêmeas, os cromossomos X podem encontrar-se totalmente pareados ou apenas ligados entre si pela região heterocromática terminal. Dessa forma, ambos os X aparentam estar ligados ao nucléolo na maioria das células. Entretanto, em algumas lâminas, foram vistas várias células em que um único X apresentava essa ligação. Dada a impossibilidade de reconhecer a origem do X pelo padrão de bandas, e devido ao fato de que a banda marcadora de arizonensis não mostra atividade diferencial nessas fêmeas, não se pode dizer se a ligação envolve preferencialmente o cromossomo de uma das espécies ou não. Nas fêmeas, como nos machos, algumas células mostraram um dos homólogos do par 6 associado ao nucléolo.

As Figuras 34 e 35 mostram, respectivamente, para machos e fêmeas, os fenômenos descritos.

c. Híbridos mulleri/aldrichi

Nos machos híbridos dessas duas espécies o cromossomo X associa-se normalmente ao nucléolo. Os microcromossomos não sofrem amplificação, embora possam também apresentar alguma desorganização do padrão de bandas. Um dos elementos do par foi visto em associação com o nucléolo em alguns indivíduos, com frequência baixa (2 ou 3 células por indivíduo) (Figura 36).

Nas lâminas de fêmeas híbridas foram observadas 3 situações diferentes quanto à associação do cromossomo X com o nucléolo: (1) apenas o X de mulleri associado ao nucléolo (Fi

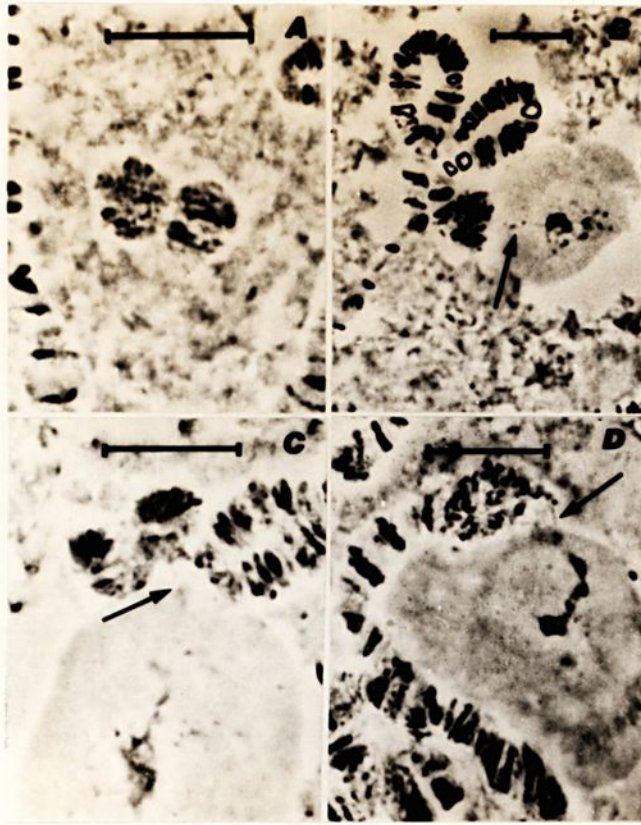


FIGURA 34. A, B. Machos descendentes de fêmeas arizonensis X machos mojavenis. A. Microcromossomos. B. Cromossomo X associado ao nucléolo. C, D. Machos descendentes de fêmeas mojavenis X machos arizonensis. C. Microcromossomos; um deles mostra associação com o nucléolo. D. Cromossomo X associado ao nucléolo. Em B, C, D, a seta aponta o filamento através do qual se estabelece a ligação cromossomo-nucléolo. Na foto B, o "vacúolo" cromossômico à direita, superior, corresponde à banda marcadora espessa e sua vizinha, vistas em contraste de fase, nesse cromossomo X arizonensis.

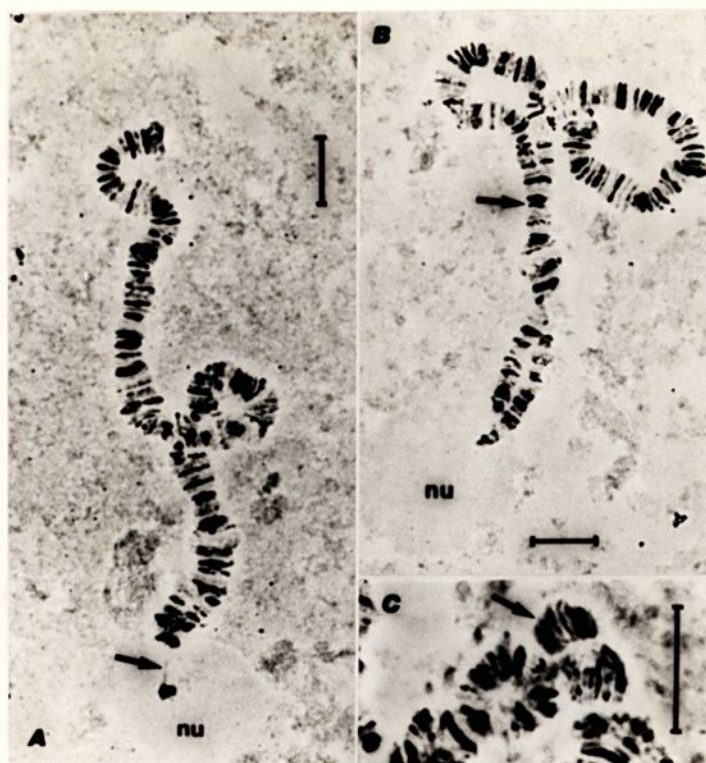


FIGURA 35. A-C. Fêmeas descendentes de fêmeas mojavensis X machos arizonensis. A. Aparente ligação dos dois cromossomos X ao nucléolo. A seta aponta o filamento cromossômico que estabelece a ligação. B. Extremidade proximal dos cromossomos X despareada e aparente ligação de um só X ao nucléolo. A seta aponta a banda marcadora que, neste caso, não permite diferenciar o X das duas espécies. C. Microcromossomos normais.

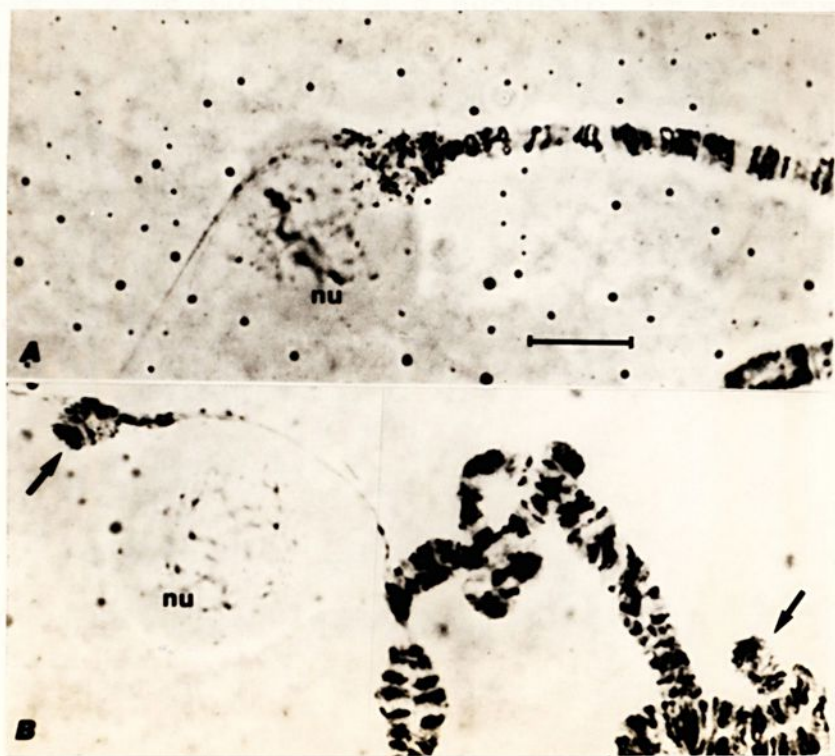


FIGURA 36. Machos híbridos mulleri/aldrichi. A. Cromossomo X associado ao nucléolo. B. Microcromossomos morfologicamente normais.

gura 37A); (2) ambos os cromossomos associados ao nucléolo (Figura 37C); (3) apenas o X de aldrichi associado ao nucléolo (Figura 37D). A proporção de células que se apresentavam dessas 3 maneiras era de aproximadamente 4:2:1. Em todas as células analisadas, o número de filamentos ou a espessura do feixe de filamentos que prendia o X de mulleri ao nucléolo era maior que na ligação entre o X de aldrichi e o nucléolo. Em algumas células foi observado um nucléolo de tamanho aparentemente normal ligado ao X de mulleri e um corpúsculo semelhante ao nucléolo, porém pequeno, ligado ao X de aldrichi (Figura 37B). Nessas fêmeas também foi observada a ligação de um dos microcromossomos ao nucléolo, embora essa associação seja menos frequente que a observada entre o X e o nucléolo (Figura 38B).

d. Híbridos mulleri/navajoa

Os híbridos mulleri/navajoa mostraram um comportamento semelhante ao observado nos híbridos mulleri/arizonensis, quanto aos cromossomos X e microcromossomos.

Na maioria das células dos machos ocorre alteração morfológica dos microcromossomos acompanhada por aumento do tamanho. As modificações morfológicas podem atingir ambos ou apenas um dos elementos do par. No primeiro caso, um deles apresenta sempre modificações mais acentuadas que o outro, chegando a ter um tamanho correspondente a aproximadamente 3 vezes o do seu homólogo. Além do aumento do tamanho, as modificações incluem alteração da forma original e perda do padrão de bandas. O cromossomo apresenta-se frequentemente diferenciado em partes que absorvem o corante com intensidade variável. A cromatina mostra, portanto, compactação variável nas diferentes regiões do cromossomo. As partes mais compactas coram-se fortemente pela orceína lacto-acética, fazendo com que o microcromossomo se desta

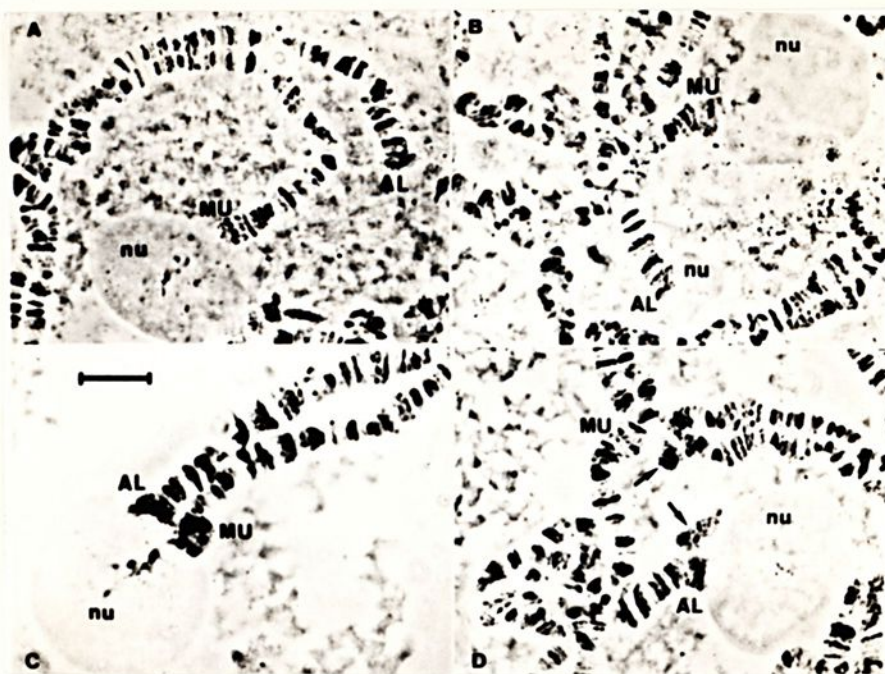


FIGURA 37. Fêmeas híbridas mulleri/aldrichi. A a D. Associação dos cromossomos X ao nucléolo, envolvendo, em A e B, o X de mulleri, em C, o X de mulleri e o de aldrichi, e em D, o X de aldrichi. Em B, o X de aldrichi associa-se a um corpúsculo semelhante ao nucléolo. Em D, as setas apontam os microcromossomos.



FIGURA 38. Fêmeas híbridas mulleri/aldrichi. A, B. Microcromosomos. Em B, um dos elementos do par está ligado ao nucléolo.

que, no conjunto cromossômico de muitas células, pelo grau de coloração, enquanto seu homólogo preserva, na maioria dos casos, pelo menos resquícios do padrão de bandas. Essa condensação do microcromossomo pôde ser detectada mesmo em indivíduos cujos demais cromossomos encontravam-se quase que totalmente desintegrados. A Figura 39 mostra as alterações morfológicas descritas.

Um total variável entre 40 e 90% das células das glândulas salivares dos machos analisados mostrou associação entre o microcromossomo de maior tamanho e o nucléolo. Nas demais células, o nucléolo apareceu ligado apenas ao cromossomo X, ou sem conexão com qualquer cromossomo. Portanto, embora o cromossomo X possa ser encontrado associado ao nucléolo, sozinho, ou com o microcromossomo, com muito maior frequência encontra-se unicamente o microcromossomo nessa associação (Figuras 39 e 40).

Oito larvas macho de espiráculos anteriores brancos, de tamanho grande, mas visivelmente anormais pela pequena mobilidade, mostraram citoplasma das glândulas salivares rico em gotas de algum material sintetizado pelas células. As gotas apresentavam tamanho variável, sendo algumas claras e outras escuras. Essas observações foram feitas em contraste de fase em lâminas sem coloração, ou em lâminas coradas com orceína lactoacética. Em uma das lâminas coradas com orceína, cada gota apresentava uma ou duas diferenciações semelhantes a um opérculo, de coloração mais intensa (Figura 41A). Os cromossomos X desses machos eram difusos e tinham diâmetro bastante avantajado em comparação com os autossomos da mesma célula ou com o X dos machos híbridos normais (Figura 41B). Esse X morfológicamente alterado apresentava-se associado ao nucléolo em algumas células. Os demais pares de cromossomos desses machos mostravam-se também modificados em sua morfologia. Sob esse aspecto, o cromossomo 5 era o melhor preservado. A alteração cromossômica morfológica,

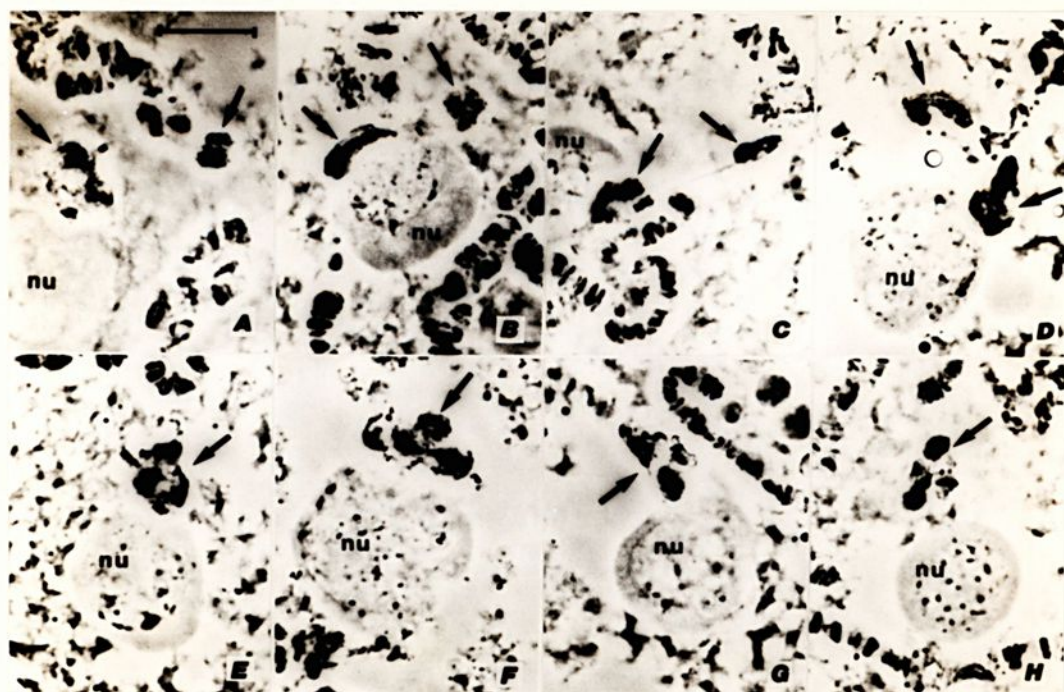


FIGURA 39. Machos híbridos mulleri/navajoa. A a D. Pares de microcromossomos mostrando alteração morfológica de um ou de am bos os seus membros. E a H. Diferentes aspectos do cromossomo amplificado. Observem-se as regiões cromossômicas mais condensa das, intercaladas com outras menos densas. Nas 8 fotos, o cromos somo amplificado apresenta ligação ao nucléolo.

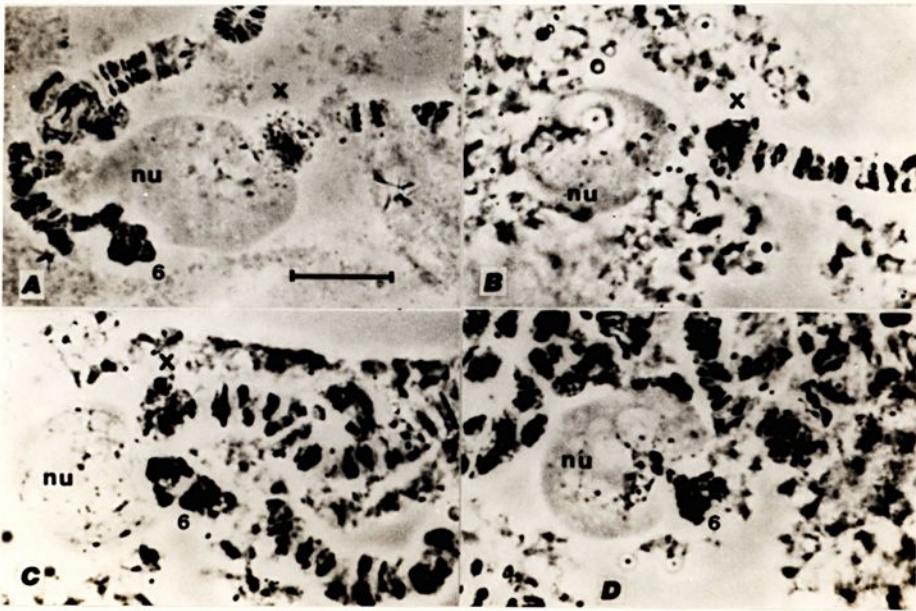


FIGURA 40. Machos híbridos mulleri/navajoa. A a D. Associação dos cromossomos X e 6 ao nucléolo.

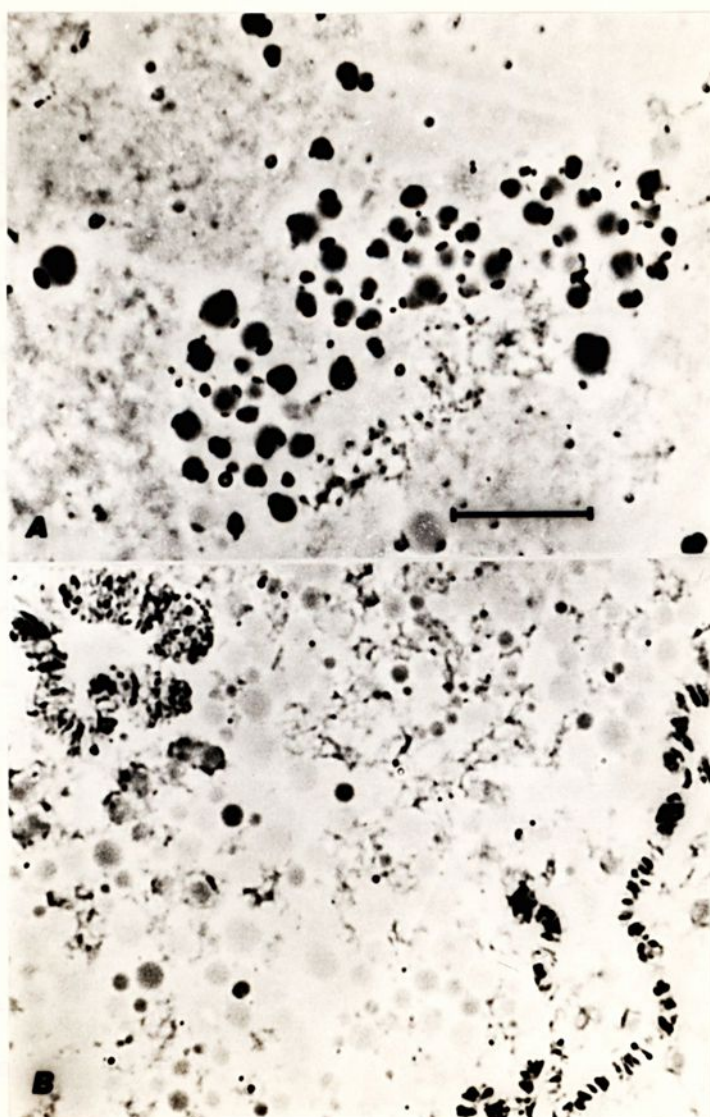


FIGURA 41. Machos híbridos anormais mulleri/navajoa. A. Material citoplasmático em lâmina corada com orceína. B. Lâmina sem coloração, observada em contraste de fase. O cromossomo X (à esquerda) é muito alargado em comparação com os autossomos (à direita).

aliada à grande quantidade de inclusões existentes nas células, tornava difícil encontrar o microcromossomo. Nas poucas células em que foi visto, seu tamanho era aparentemente normal e estava associado ao nucléolo.

Nas fêmeas híbridas, a região proximal dos dois cromossomos X apresenta-se totalmente despareada ou em alguns casos, ligada pela última faixa. Apenas um dos cromossomos X as socia-se ao nucléolo na maioria das células dessas fêmeas. Esse X é predominantemente (em cerca de 80% das células) o X originado de navajoa (Figura 42A). Entretanto, quando os dois cromossomos ligam-se pela extremidade proximal, ambos aparentam estar associados ao nucléolo. Às vezes, uma análise cuidadosa revela a inexistência de filamentos associando o X de mulleri ao nucléolo (Figura 42B). Outras vezes, porém, é possível encontrar ligação do X originado dessa espécie ao nucléolo. É o caso da célula vista na Figura 42C e D, na qual a observação, em planos focais diferentes, mostrou a existência de um delgado filamento estabelecendo a associação. Mas, em casos como esse, o feixe de filamentos que une o X de navajoa ao nucléolo é geralmente mais espesso que o de mulleri. Outra situação encontrada em frequência baixa, mostra o X de mulleri associado sozinho ao nucléolo. Contudo, na maioria das células analisadas nessas condições, a associação do X de mulleri não podia ser considerada inequívoca, como no exemplo apresentado na Figura 42C e D, em que parece estar havendo uma superposição dos dois cromossomos X e nesse caso, o feixe de filamentos visíveis pode ser de navajoa e não de mulleri.

Os microcromossomos, nas fêmeas, são morfologicamente normais.

e. Híbridos mulleri/wheeleri



FIGURA 42. Fêmeas híbridas mulleri/navajoa. A a F. Associação do cromossomo X ao nucléolo. Em todas as fotos, a seta longa indica a ligação do X de navajoa ao nucléolo, e a curta indica o X de mulleri. Em A, os cromossomos X estão separados e há associação exclusiva do X de navajoa ao nucléolo. Em B, os dois cromossomos X estão ligados pela extremidade proximal, mas apenas o de navajoa emite filamentos no interior do nucléolo. Em C e D, observa-se uma mesma célula em planos focais diferentes: em C, apenas o filamento que associa o X de navajoa ao nucléolo é visível; em D, vê-se um delgado filamento unindo também o X de mulleri ao nucléolo. Em E e F observa-se outra célula em dois planos focais; embora o X de mulleri aparente associação exclusiva ao nucléolo, a superposição dos cromossomos deixa dúvida sobre qual deles estaria realmente associado ao nucléolo nessa célula.

Na maioria das células das glândulas salivares dos machos híbridos dessas duas espécies, o cromossomo X encontrava-se associado ao nucléolo e os microcromossomos eram normais. Em algumas células, porém, os microcromossomos apresentavam alteração de seu padrão de bandas e, em outras ainda (3 a 5 células salivares em 30% dos indivíduos analisados), amplificação de um dos elementos do par. Entretanto, o grau dessa amplificação era menor que o dos machos híbridos mulleri/arizonensis ou mulleri/navajoa, correspondendo, o cromossomo amplificado, a aproximadamente o dobro de seu homólogo. Os cromossomos amplificados encontravam-se, às vezes, parcialmente subdivididos em 2 ou mais partes que se mantinham ligadas, da maneira verificada nos híbridos mulleri/arizonensis. Na maioria das células em que foram encontrados, esses cromossomos amplificados achavam-se associados ao nucléolo.

A Figura 43 mostra os fenômenos descritos para os machos.

Nas fêmeas híbridas dessas espécies também predominou a situação em que um único X associava-se claramente ao nucléolo. Nos indivíduos analisados esse X era o de mulleri, na maioria das células (Figura 44A). Poucas células sugeriam uma possível ligação do X de wheeleri ou de ambos os cromossomos simultaneamente, ao nucléolo (Figura 44B, C). Um pequeno corpúsculo semelhante a um nucléolo foi visto em algumas células associado a um dos cromossomos X, diagnosticado como sendo o de wheeleri (Figura 44D).

Os microcromossomos das fêmeas eram normais, podendo-se observar associação de um dos elementos do par ao nucléolo em algumas células (Figura 45).

2. Observações em lâminas submetidas aos métodos de

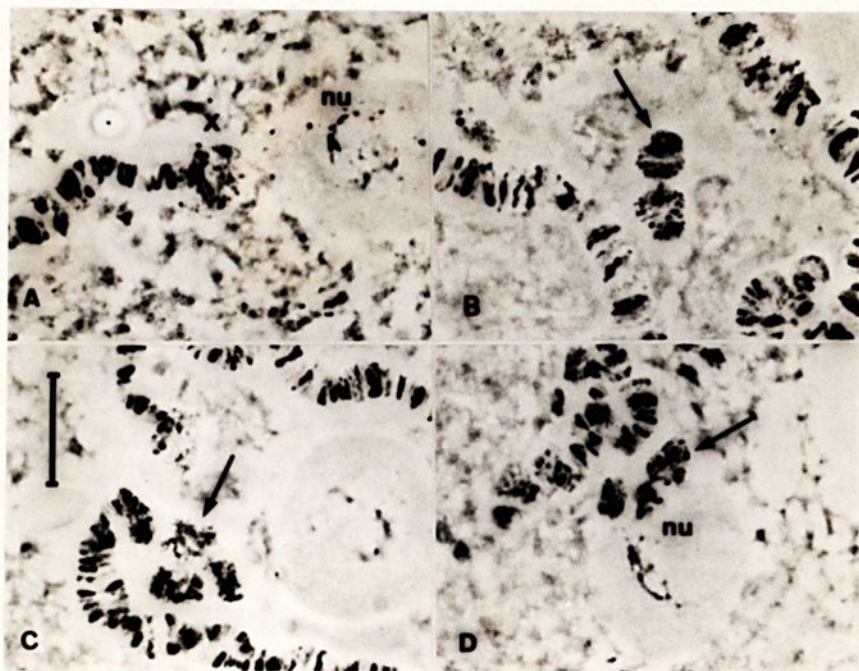


FIGURA 43. Machos híbridos mulleri/wheeleri. A. Cromossomo X associado ao nucléolo. B. Par de microcromossomos normais. C, D. Microcromossomos amplificados. Em D, o referido cromossomo está associado ao nucléolo.

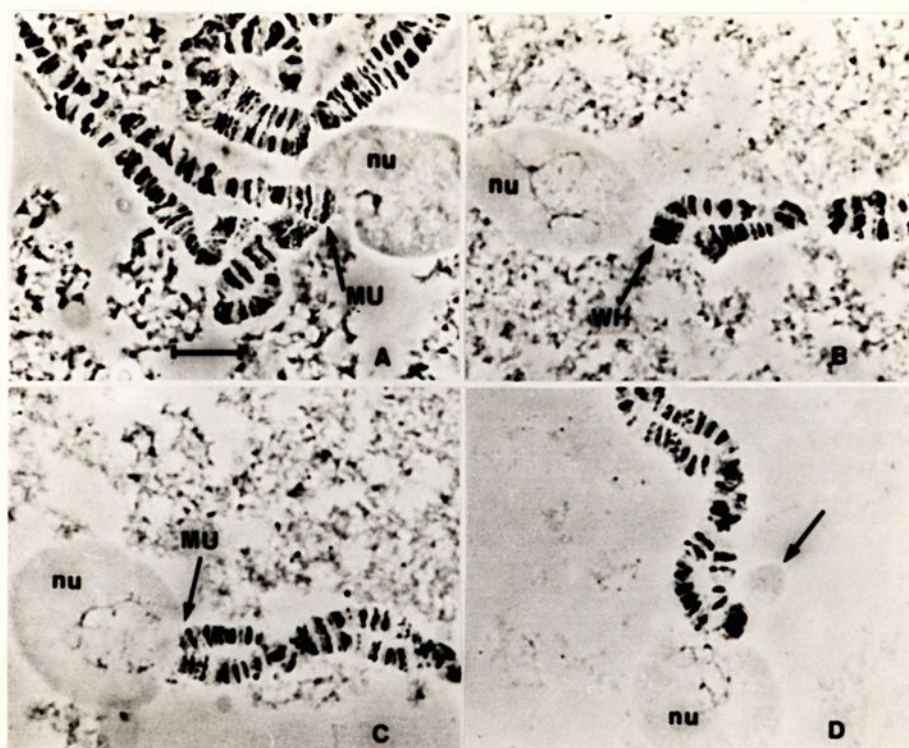


FIGURA 44. Fêmeas híbridas mulleri/wheeleri. A, B, C. Associação do cromossomo X ao nucléolo, envolvendo, em A, o X de mulleri, em B, aparentemente o X de wheeleri, e em C, aparentemente ambos os cromossomos. D. Os cromossomos X associam-se ao nucléolo e a uma pequena formação semelhante ao nucléolo. Esta parece estar ligada à base do X de wheeleri.

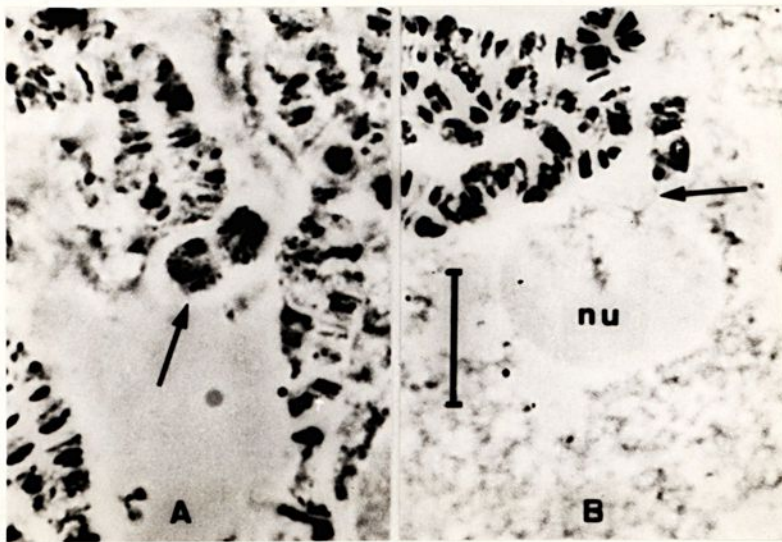


FIGURA 45. Fêmea híbrida mulleri/wheeleri. A, B. Microcromosomos. Em B, um dos elementos do par associa-se ao nucléolo por um filamento apontado pela seta.

coloração AG-AS e AG-I.

A aplicação dos métodos AG-AS (GOODPASTURE & BLOOM, 1975) e AG-I (BLOOM & GOODPASTURE, 1976) aos cromossomos salivares das espécies de Drosophila analisadas e seus híbridos, apresentou resultados variáveis. Na maioria das lâminas, apenas o nucléolo adquiriu a coloração que caracteriza os organizadores nucleolares nos cromossomos de mamíferos tratados por essas técnicas. Em algumas lâminas, coraram-se apenas os cromossomos. E, em outras, ainda, coraram-se as bandas e o nucléolo. Essa variação de resultados, não decorreu da utilização de uma ou outra das técnicas, mas, a causa não pôde ser determinada.

Portanto, o nitrato de prata aplicado às glândulas salivares não corou bandas especificamente. Porém, em muitas células em que a base do X não se apunha ao nucléolo, mas ligava-se a ele por um filamento ou um feixe de filamentos, foi possível verificar que esses filamentos (alguns dos quais apresentavam diferenciação característica em cromômeros ou bandas), coravam-se com a mesma intensidade que o nucléolo. Essa observação foi feita em híbridos e espécies parentais (Figura 46).

As lâminas coradas pelo nitrato de prata permitiram também que fossem feitas algumas observações quanto ao número de nucléolos por célula das glândulas salivares. Qualquer das espécies analisadas apresenta normalmente um só nucléolo. Entre tanto, algumas lâminas feitas com larvas tomadas dos estoques e coradas pelo nitrato de prata, mostraram uma ou duas células das glândulas salivares contendo um nucléolo aparentemente normal e um de tamanho pequeno. O nucléolo adicional, embora seja sempre menor, em comparação com o normal, tem tamanho variável e pode ser encontrado em fêmeas ou machos de qualquer das espécies. A Figura 47 mostra, como exemplo, duas células de uma mesma glândula de fêmea mulleri, uma das quais portadora de nucléo

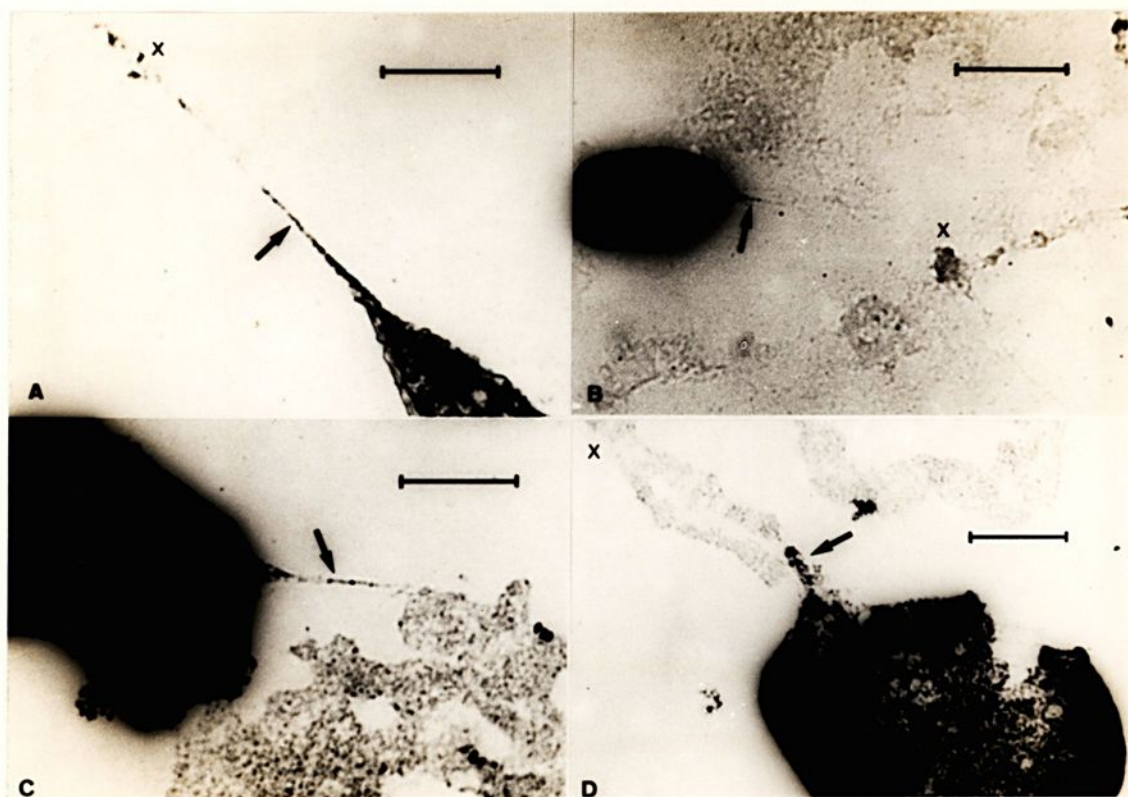


FIGURA 46. Coloração pela prata. A. Macho wheeleri. B. Macho mulleri. C, D. Fêmea mulleri/navajoa. Em A a D, a seta aponta o feixe de filamentos que liga o nucléolo ao cromossomo X, e que, como o nucléolo, cora-se em marrom escuro por essa técnica.

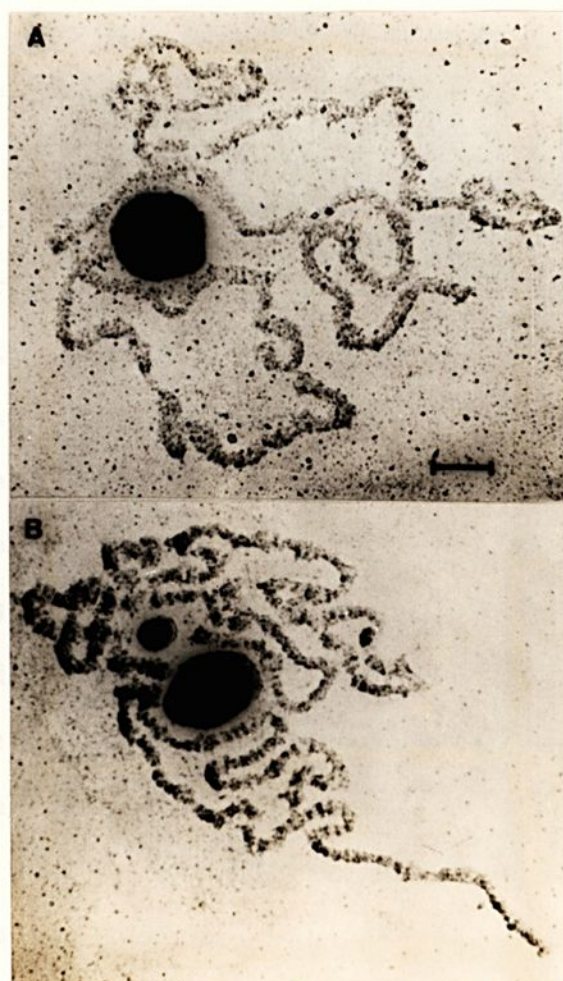


FIGURA 47. Coloração pela prata. A, B. Duas células de uma mesma glândula de fêmea mulleri. A. Célula com nucléolo único. B. Célula com um pequeno nucléolo adicional.

lo adicional.

Das 6 espécies analisadas, porém, aldrichi foi a que apresentou as porcentagens mais elevadas de núcleos contendo o pequeno nucléolo adicional: ao redor de 10% em várias larvas (Figura 48).

Nos híbridos, a frequência de células contendo nucléolos excedentes foi maior que nas espécies parentais envolvidas. Os híbridos mulleri/aldrichi foram os que apresentaram as porcentagens mais elevadas, tendo alguns indivíduos, aproximadamente 50% das células das glândulas salivares portadoras de nucléolos adicionais. Nesses híbridos foram observadas células com um ou dois nucléolos excedentes, cujos tamanhos e formas eram também variáveis (Figura 49).

Em ordem decrescente quanto à porcentagem de células com nucléolos adicionais, seguiram-se os híbridos mulleri/wheeleri (aproximadamente 10% das células em alguns híbridos). Esses híbridos apresentaram os menores nucléolos adicionais, presentes em número de um ou dois por célula (Figura 50).

Nos demais híbridos a frequência de células portadoras de nucléolos excedentes foi mais baixa (ao redor de 5%, no máximo). Em todos eles foi observado um único nucléolo adicional por célula.

Em alguns híbridos mulleri/mojavensis, os nucléolos, embora únicos, apresentavam formas bastante irregulares (Figura 51).

Com qual ou quais cromossomos se estabelece a associação dos nucléolos excedentes nem sempre foi possível reconhecer devido à alteração acentuada dos cromossomos causada pela técnica. Entretanto, esse reconhecimento foi possível em algumas células de determinados híbridos. O nucléolo excedente foi observado em associação com o microcromossomo em uma larva fê-

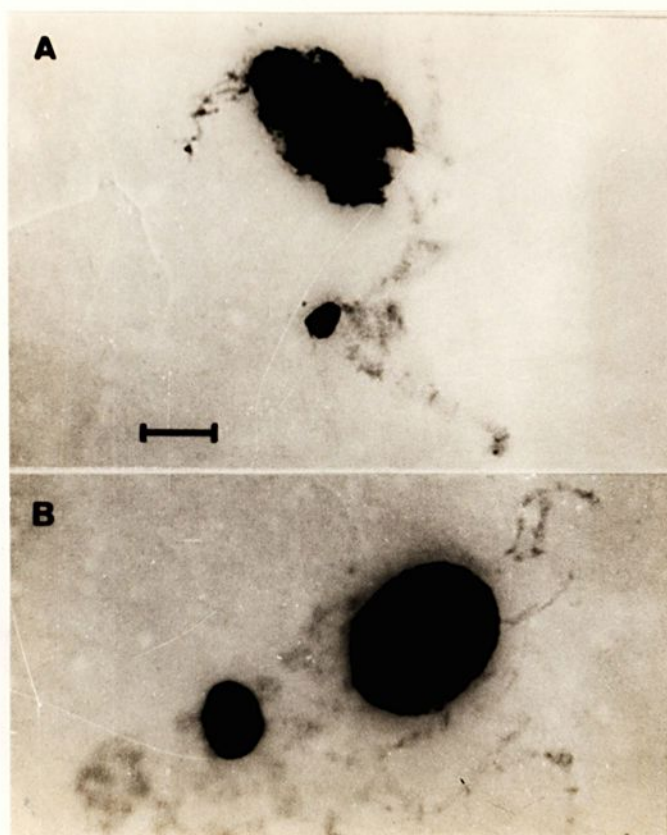


FIGURA 48. Coloração pela prata. A, B. Duas células de um macho aldrichi mostrando nucléolos adicionais de tamanhos diferentes.

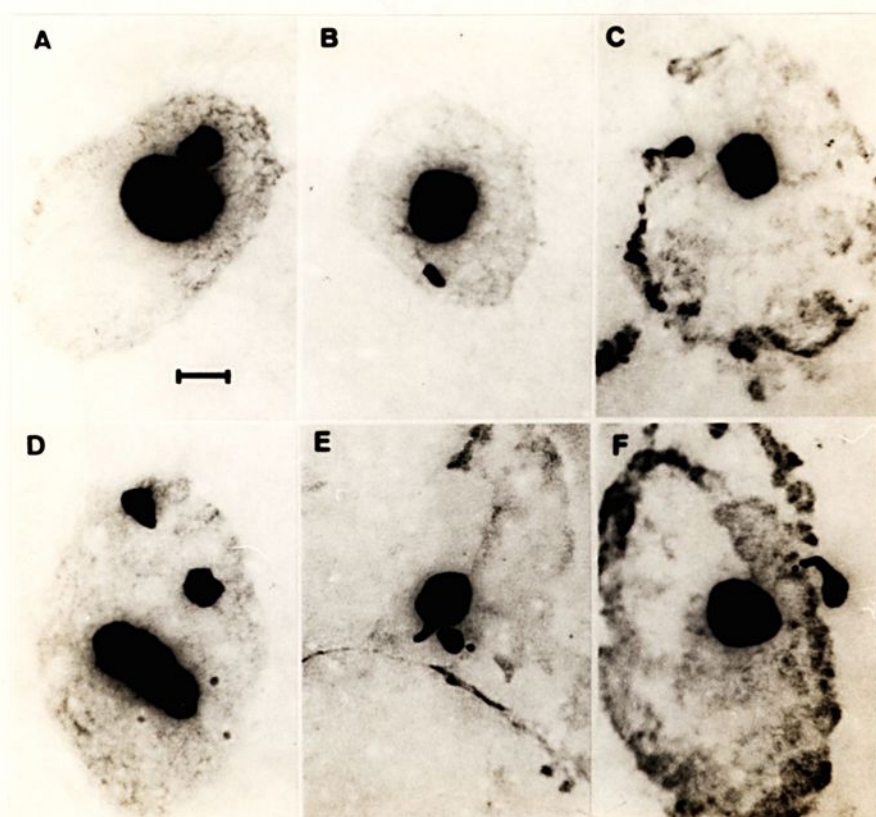


FIGURA 49. Coloração pela prata. A a F. Células de uma fêmea híbrida mulleri/aldrichi, variáveis quanto ao número, à forma e ao tamanho dos nucléolos adicionais.

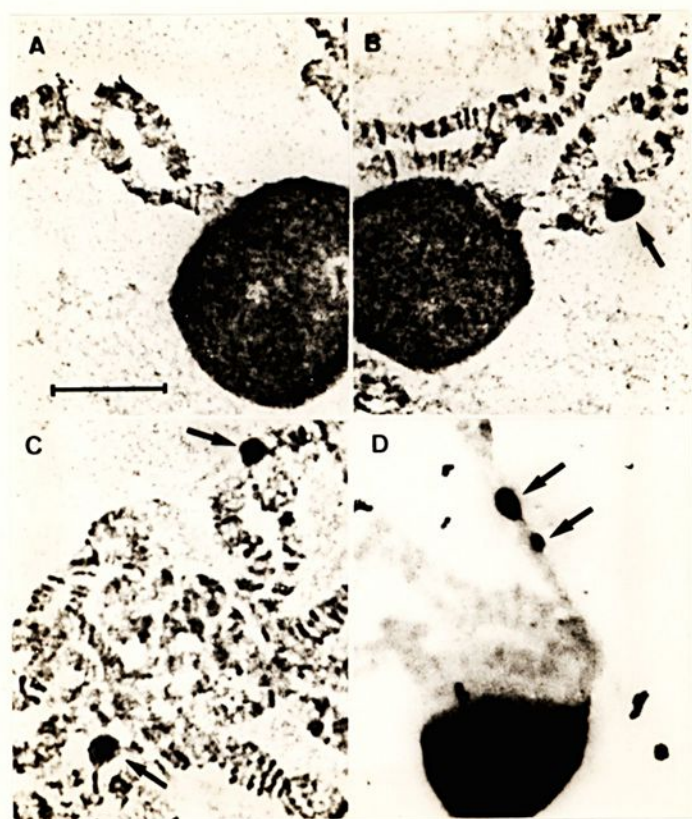


FIGURA 50. Coloração pela prata. A a D. Fêmeas híbridas mulle-ri/wheeleri. A. Célula com nucléolo único associado ao cromosso-mo X de mulleri. B. Um pequeno nucléolo adicional associado ao cromossomo X de wheeleri. C, D. Células com dois nucléolos adi-cionais.

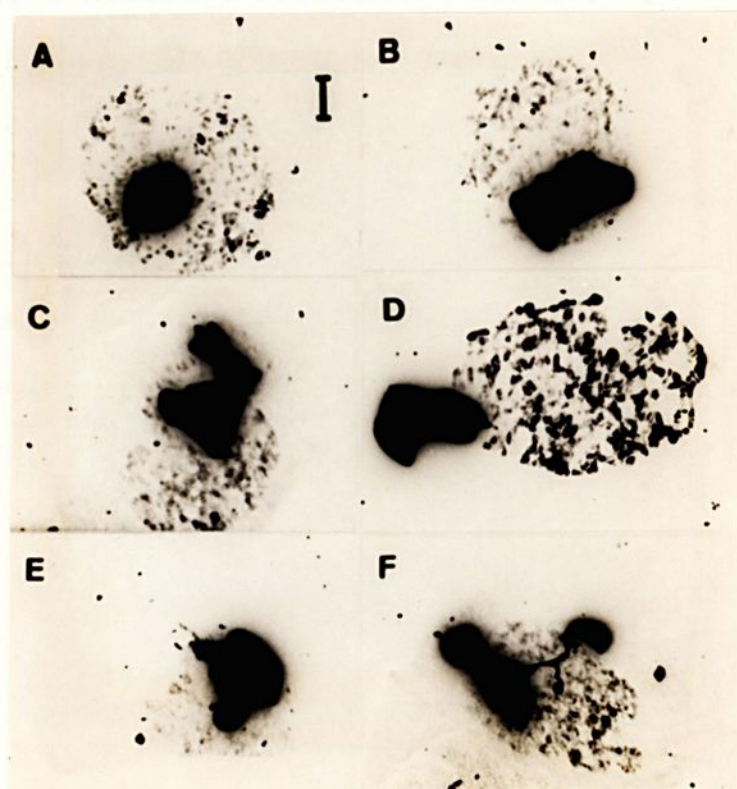


FIGURA 51. Coloração pela prata. A a F. Células de um macho híbrido mulleri/mojavensis. A. Nucléolo normal. B a F. Nucléolos de formas irregulares.

mea híbrida descendente de fêmea mojavensis X machos arizonensis e em uma larva macho do cruzamento recíproco (Figura 52), ou em associação com o cromossomo X, observada em uma larva macho descendente de mulleri X mojavensis (Figura 53).

Na fêmea híbrida mulleri/wheeleri, vista na Figura 50B, o nucléolo normal parece estar associado aos 2 cromossomos X enquanto o nucléolo adicional liga-se, aparentemente, ao X de wheeleri. Essa associação havia sido observada anteriormente (Figura 44D) em lâmina corada com orceína.

Os métodos de coloração pela prata, utilizados no presente trabalho, mesmo com algumas modificações do pH, temperatura e tempo de incubação, não coraram cromossomos mitóticos dos gânglios cerebrais, com a especificidade pretendida quanto aos organizadores nucleolares.

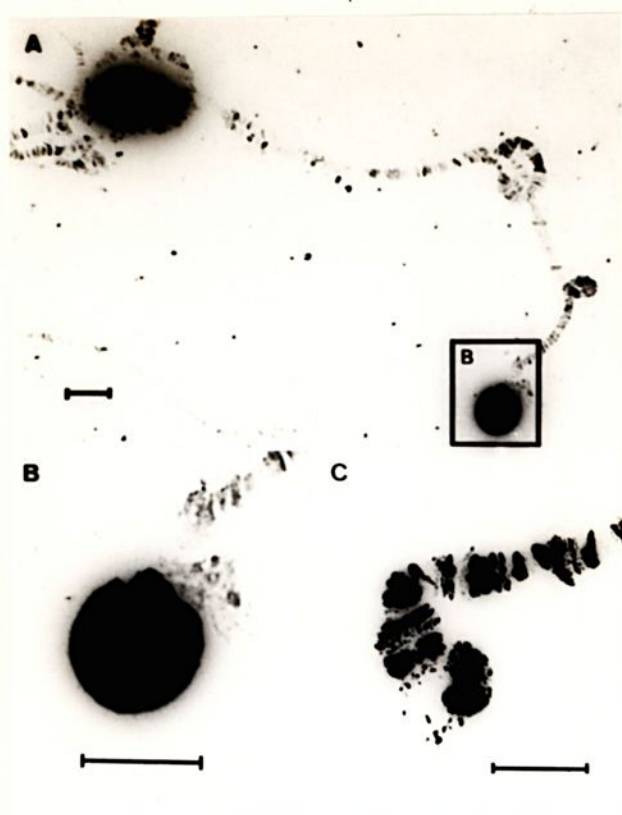


FIGURA 52. Coloração pela prata. Fêmea híbrida descendente de fêmea mojavensis X macho arizonensis. A. Conjunto mostrando o nucléolo menor associado ao cromossomo 6. B. Detalhes de A. C. Macho híbrido descendente de fêmea arizonensis X macho mojavensis; célula com pequeno nucléolo associado ao cromossomo 6. Nesta lâmina as bandas cromossômicas coravam-se em marrom escuro e o nucléolo em dourado.

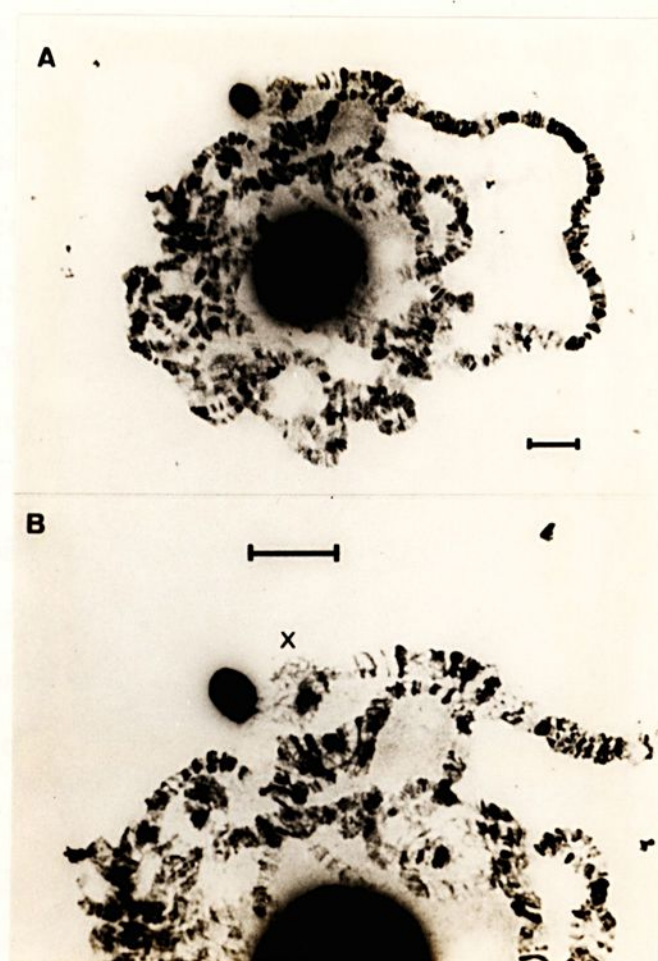


FIGURA 53. Coloração pela prata. Macho híbrido mulleri/mojaven-
sis. A. Célula mostrando pequeno nucléolo adicional associado
ao cromossomo X. B. Mesma célula vista em maior aumento.

IV. DISCUSSÃO

O gênero Drosophila foi subdividido, por Sturtevant (1942), em grupos de espécies de acordo com as características morfológicas que estas apresentam. Numerosos estudos de isolamento reprodutivo têm mostrado que espécies pertencentes a diferentes grupos não se cruzam, mas, espécies pertencentes a um mesmo grupo podem cruzar-se com sucesso variável. A produtividade dos cruzamentos interespecíficos, que, em geral difere nos cruzamentos recíprocos, pode ser quase tão elevada quanto a dos cruzamentos intraespecíficos ou pode restringir-se a uns poucos híbridos estéreis, de um só sexo.

As espécies do complexo mulleri do grupo repleta, analisadas no presente trabalho, mostram essa variedade de resultados quanto à hibridação. Drosophila arizonensis e D. mojavensis são as espécies que se inter cruzam mais facilmente, produzindo grande número de fêmeas e machos férteis na direção fêmea mojavensis X macho arizonensis, e, nos cruzamentos recíprocos, fêmeas férteis e machos estéreis, em menor, mas ainda considerável número. Os intercruzamentos de mulleri com mojavensis, arizonensis, navajoa e aldrichi têm um ponto em comum: produzem híbridos apenas na direção que envolve fêmeas mulleri. Diferem, entretanto, quanto à produtividade e quanto ao sexo e fertilidade dos híbridos. A produtividade decresce, nos intercruzamentos, segundo a ordem em que foram mencionadas as espécies. Quanto ao sexo e fertilidade dos híbridos, o cruzamento de fêmeas mulleri com machos mojavensis ou arizonensis produzem fêmeas férteis e machos estéreis, enquanto fêmeas mulleri X machos aldrichi produzem fêmeas e machos estéreis. Os cruzamentos de fêmeas mulleri com machos navajoa, por sua vez, produzem apenas fêmeas, e

estas são estéreis. Finalmente, o cruzamento de mulleri com wheeleri produz fêmeas férteis e machos estéreis na direção que envolve fêmeas mulleri, e apenas fêmeas estéreis no recíproco.

O maior ou menor sucesso de um cruzamento interespecífico depende do grau de diferenciação atingido pelas espécies envolvidas. O bloqueio do desenvolvimento em qualquer estágio, desde o zigoto à pupa, deve resultar da incapacidade de se estabelecerem as interações normais entre cromossomos, ou entre cromossomos e citoplasma, de origem específica diferente.

No caso dos híbridos mulleri/navajoa, os distúrbios gerados pela hibridação, que levam ao bloqueio do desenvolvimento, são mais drásticos nos machos que nas fêmeas, pois enquanto nenhum macho atinge a fase adulta, algumas fêmeas o conseguem. A existência de um único X, originado de mulleri, nesses machos, deve impedir interações que se processam entre o cromossomo X e os autossomos de navajoa e que são imprescindíveis ao desenvolvimento normal. Tadei (1974, 1977) mostrou que híbridos de D. prosaltans e D. saltans, portadores de cromossomos X de saltans e autossomos das duas espécies, são inviáveis, provavelmente em decorrência da falha das mesmas interações.

A hibridação também afeta fortemente o desenvolvimento das fêmeas mulleri/navajoa; sua mortalidade, especialmente na fase de pupa, é bastante acentuada. A sobrevivência de algumas fêmeas revela o efeito da variabilidade individual sobre a viabilidade, e à essa variabilidade pode estar relacionado o fenótipo semelhante ao mutante *Dichaeta*, detectado nessas fêmeas. Por outro lado, a sobrevivência de alguns machos híbridos dessas espécies até o 3º estágio larval adiantado, enquanto a maioria morre antes dessa fase do desenvolvimento deve ser também atribuída à variabilidade individual.

Quais seriam os mecanismos celulares e bioquímicos envolvidos no bloqueio do desenvolvimento desses híbridos?

De modo geral, conhece-se pouco sobre a natureza da ação gênica no desenvolvimento dos organismos. Em Drosophila, a maior parte dos trabalhos em genética do desenvolvimento têm sido realizados em linhagens portadoras de aberrações cromossômicas ou genes letais recessivos. As modificações determinadas pelas mutações, no padrão embriológico normal, podem elucidar as interações entre cromossomos, entre cromossomos e citoplasma, e os mecanismos bioquímicos responsáveis por aquele padrão (revisão em WRIGHT, 1970).

Por exemplo, a incapacidade de empupar tem sido atribuída, em alguns casos, a uma alteração na sequência biossintética do hormônio ecdisona ou sua regulação. No mutante ecd (ecdysone deficiency) de D. melanogaster, determinado por um gene letal recessivo localizado no cromossomo 3, o bloqueio da pupação é reparável pela alimentação das larvas mutantes com esse hormônio (GAREN & cols., 1977).

Por outro lado, há indicações de uma atuação da ecdisona ou hormônio da muda, na inibição da síntese do RNA r. Esse fenômeno foi evidenciado "in vitro", em glândulas salivares de Drosophila (HUGHES & KAMBYSELLIS, 1970) e "in vivo", em Sciara (DESSEN & PERONDINI, 1976). Em Sciara, a inibição da síntese de RNA r ocorre quando a larva se aproxima da pupação (PERONDINI, 1968), fase em que normalmente ocorre um rápido aumento dos níveis hormonais. A ausência do estímulo hormonal determina a manutenção da síntese de RNA r e inibe a pupação (DESSEN & PERONDINI, 1976).

Nas espécies de Drosophila analisadas neste trabalho, semelhantemente ao que ocorre em Sciara (PERONDINI, 1968), há desaparecimento do nucléolo na época da pupação, sugerindo uma diminuição da síntese de RNA r, nessa fase (nossas observações,

não publicadas). Por outro lado, sendo a atividade organizadora nucleolar bastante afetada pela hibridação de mulleri e navajoa, como demonstram os dados do presente trabalho, pode-se aventar a hipótese de que a inibição da pupação que ocorre nos machos híbridos dessas espécies seja decorrente da incapacidade dos organizadores nucleolares (ou seu sistema regulador), localizados no cromossomo X e no microcromossomo, de responder, apropriadamente, à atuação do hormônio controlado por loci gênicos autosômicos, em heterozigose interespecífica.

O estudo mais detalhado dos híbridos mulleri/navajoa poderá, assim, contribuir para o conhecimento da interação cromossômica responsável pelo fenômeno da pupação.

O bloqueio do desenvolvimento, constatado nos híbridos mulleri/navajoa, indica a existência de algum tipo de diferenciação mais acentuada entre essas espécies, que entre mulleri e as demais espécies analisadas.

A diferenciação das espécies em estudo, ao nível cromossômico, foi analisada, nas glândulas salivares, pelo maior ou menor grau de sinapse entre os cromossomos homólogos, e por diferenças entre os homólogos quanto ao padrão das bandas.

Sabe-se, há longo tempo, que nos híbridos interespecíficos o pareamento cromossômico é incompleto, enquanto intraespecificamente ele ocorre, normalmente, ao longo de todo o par de homólogos. Essa dificuldade de pareamento dos homólogos nos híbridos interespecíficos foi atribuída a pequenos rearranjos ao longo dos cromossomos ou a mutações gênicas (respectivamente, DOBZHANSKY & TAN, 1936 e KERKIS, 1936, em EVGENEV, 1971) que dificultariam a atração cromossômica.

De fato, regiões cromossômicas homólogas, despareadas, analisadas em glândulas salivares de híbridos, mostram síntese diferencial de DNA. Esse fenômeno foi observado em hí-

bridos entre as subespécies Chironomus thumi thumi e Chironomus thumi piger (HAGELE, 1970), tendo, a síntese diferencial, sido observada em segmentos homólogos estruturalmente diferentes devido à presença de bandas com diferente conteúdo de DNA. Em híbridos de Anopheles atroparvus e A. labranchiae, por sua vez, a síntese diferencial foi observada tanto em regiões assinápticas com padrão de bandas diferente, como em regiões com padrão de bandas idêntico (TIEPOLO & cols., 1974).

De qualquer modo, o maior grau de pareamento deve refletir uma menor diferenciação interespecífica. No presente trabalho, o melhor pareamento foi apresentado pelos híbridos arizonensis/mojavensis, nos quais o despareamento é constante apenas nas extremidades proximais dos pares de homólogos e nos microcromossomos. Os demais híbridos apresentaram pareamento fraco.

Quanto ao padrão de bandas, as modificações ocorridas no processo de diferenciação das espécies estudadas foram causadas por inversões, analisadas por WASSERMAN (1954, 1960, 1962) e por alterações estruturais localizadas, descritas no presente trabalho.

As alterações estruturais detectadas na secção A_1 do cromossomo 4 permitem separar as espécies analisadas em dois conjuntos básicos: mulleri, aldrichi, wheeleri e navajoa, de um lado, e arizonensis e mojavensis, de outro. A diferença morfológica entre os dois conjuntos de espécies, decorre fundamentalmente da presença, no local, de duas bandas no primeiro conjunto e tres bandas, no segundo.

Entretanto, dentro de cada conjunto há alguma diferenciação entre as espécies. Drosophila mulleri pode ser diferenciada das demais espécies que compõem o mesmo conjunto porque suas duas bandas apresentam-se fundidas na maioria dos indivíduos analisados. No outro conjunto, arizonensis e mojavensis di

ferenciam-se pela espessura da terceira banda (proximal em relação às outras duas), da região considerada. Essa diferença de espessura pode ser devida a um conteúdo de DNA variável entre as espécies, do tipo analisado por KEYL (1965) em subespécies de Chironomus thummi.

Modificações quanto ao padrão de bandas foram também verificadas na região proximal do cromossomo X, (secções F₅ a H) permitindo diferenciar mulleri de todas as outras espécies utilizadas neste trabalho. Essa região não parecia nos híbridos que envolvem aquela espécie.

Um tipo especial de diferença morfológica quanto a uma banda localizada na secção F₂ do cromossomo X, foi observada em D. arizonensis. Essa diferença morfológica reflete uma diferença fisiológica, entre fêmeas e machos dessa espécie, que leva a referida banda a sofrer um espessamento nos últimos. O que torna o comportamento dessa banda do cromossomo X de arizonensis mais interessante ainda, é o fato de que o seu espessamento ocorre também nas fêmeas híbridas mulleri/arizonensis, de forma ainda mais acentuada que nos machos arizonensis.

Por um lado, esse espessamento pode constituir a visualização do fenômeno da compensação de dose, pois manifesta-se em condição hemizigótica. Por outro, é tentador admitir-se que a atividade dessa banda esteja relacionada ao sistema regulador da atividade organizadora nucleolar. Há duas informações que podem servir de base para essa suposição. A primeira, refere-se aos dados de BICUDO & RICHARDSON (1977) que mostraram a dominância do organizador nucleolar do cromossomo X de arizonensis (ou de seu sistema regulador) sobre o de mulleri, nos híbridos das duas espécies. A espessura da banda marcadora poderia refletir essa dominância nas fêmeas. A segunda, refere-se ao fato de que as quebras cromossômicas que determinaram as recombina-

nações interespecíficas detectadas no cromossomo X de fêmeas híbridas mulleri/arizonensis, nunca ocorreram depois da banda marcadora, na direção da região proximal. Em outras palavras, nenhuma das quebras separou aquela banda e a região organizadora nucleolar, embora haja um trecho, após a banda, na direção proximal do cromossomo X das duas espécies, em que as bandas são morfológicamente correspondentes e pareiam de modo semelhante ao observado no restante do cromossomo onde o crossing foi detectado.

Das espécies analisadas no presente trabalho, D. mojavis é a única que apresenta inversões intraespecíficas (METTLER, 1963; JOHNSON, 1973). Assim, sob esse aspecto, ela difere não só de sua espécie críptica D. arizonensis, como das outras espécies, adaptadas ao deserto. A causa dessa diferença tem sido atribuída à disponibilidade do substrato que essas espécies exploram (revisão em JOHNSON, 1973). Uma das espécies de cactos que D. mojavis utiliza preferencialmente, Machaerocereus gummosus, por formar grandes touceiras de até 100 metros quadrados, consegue manter-se através de todas as estações do ano, enquanto outras espécies de cactos tornam-se raras em situações climáticas desfavoráveis. Isto levaria D. mojavis a manter, continuamente, populações de tamanho grande e, nessas condições, a heteroseleção poderia levá-las a um polimorfismo balanceado, enquanto as outras espécies, por explorar cactos não perenes, passariam por flutuações de tamanho muito acentuadas que poderiam explicar a ausência de polimorfismo.

A linhagem de D. mojavis analisada neste trabalho mostrou duas inversões, uma das quais, localizada no cromossomo 3, foi descrita por METTLER (1963). A outra, no cromossomo 2, não havia sido detectada anteriormente na análise intraespecífica, mas, sua importância fundamental reside em que seus limites

parecem coincidir com os da inversão 2s, inversão homozigota, descrita por WASSERMAN (1954) na análise interespecífica dos híbridos mojavensis/arizonensis. Segundo o autor, essa inversão teria sido a terceira a ocorrer na série de inversões superpostas 2q, 2r, 2s, no processo evolutivo que originou D. mojavensis a partir de D. arizonensis. A detecção dessa inversão em heterozigose, sobre as outras duas, corrobora as idéias daquele autor.

Deficiências e duplicações são fenômenos bem menos frequentes, nas populações naturais que as inversões. Frequentemente, o material para estudo dessas aberrações estruturais é obtido por meios artificiais, como irradiação com raios X. A raridade da ocorrência natural desses fenômenos, em Drosophila, é uma das razões que justificam a descrição da adição e da deficiência detectadas na extremidade distal dos cromossomos 4 e 5 de arizonensis.

Com relação a essas aberrações descritas no presente trabalho, dois aspectos podem ser discutidos: (1) Constituem elas aberrações terminais ou subterminais? (2) Como teriam se originado?

Deficiências terminais, isto é, incluindo a região do telômero, foram descritas em alguns trabalhos com Drosophila. Entretanto, a veracidade de sua condição terminal tem sido discutida. Por exemplo, DEMEREC & HOOVER (1936 em ROBERTS, 1976) descreveram 3 deficiências terminais no cromossomo X, sendo duas determinadas por raios X e uma espontânea. ROBERTS (1969) mostrou que a espontânea era sub-terminal. Por sua vez, ROBERTS (1975) obteve também 3 deficiências na ponta do cromossomo X como decorrência de tratamento por raios X. Duas eram sub-terminais, e a 3^a, o autor chamou "terminal deletion mimic" por não ter conseguido demonstrar a existência de material cromossômico

aposto à região da quebra.

A importância de confirmar, ou demonstrar que uma deficiência tida como terminal não o é, refere-se ao conceito de telômero. MULLER e seus colaboradores acumularam dados sobre deficiências e inversões terminais, determinadas por raios X, que os levaram a propor que as extremidades de um cromossomo são cobertas normalmente por uma região específica terminal, a que se deu o nome de telômero, e que é necessária à estabilidade cromossômica (revisão em MULLER & HERSKOWITZ, 1954). A estabilidade de um cromossomo com deficiência terminal só seria possível, então, se ocorresse "cicatrização" ou reconstrução do telômero. Isto parece ocorrer no milho (MCCLINTOCK, 1941 em ROBERTS, 1975).

Por outro lado, têm sido descritos, na espécie humana, casos de fusão telomérica, envolvendo cromossomos X (por exemplo FRAISSE & cols., 1975; SINHA & cols., 1976). SINHA & cols., (1976) admitiram a possibilidade de haver fusão sem quebras anteriores como decorrência de uma variação da função do telômero em diferentes cromossomos; alguns telômeros seriam mais sensíveis à fusão que outros.

Em várias espécies de mamíferos, também foram descritos casos de fusão centrômero-telômero envolvendo dois autosomos ou um X e um autossomo (STOCK & HSU, 1973). Entretanto, ROBERTS (1975) admite que, dada a pequena dimensão da região telomérica nos cromossomos mitóticos, afirmar que as chamadas fusões teloméricas de mamíferos ocorrem entre extremidades cromossômicas não quebradas está além da resolução das técnicas atuais. Em Drosophila o mesmo autor, tendo analisado 93.457 cromossomos X irradiados, portadores de marcadores genéticos, e tendo encontrado apenas uma deleção terminal (e assim mesmo incerta), concluiu que a probabilidade de cicatrização e, portanto, de existência de deleção terminal em Drosophila é tão baixa que

pode ser desconsiderada.

No que se refere à deficiência e adição verificadas em arizonensis, embora na maioria das células parecessem terminais, em algumas células havia, aparentemente, uma faixa terminal recobrindo os dois homólogos, em ambos os casos.

Uma hipótese para explicar a origem dessas aberrações é a de que tenham surgido por translocação, talvez entre os próprios cromossomos que as apresentam. Drosophila arizonensis, como as demais espécies do complexo mulleri, mostra, nas glândulas salivares, uma tendência para pareamento ectópico da região telomérica de seus cromossomos, ou da região telomérica de um com a região centromérica de outro, formando grupos circulares de cromossomos em que, frequentemente, é difícil reconhecer os limites dos componentes. Às vezes, essa associação ocorre entre a região centromérica e a telomérica de um mesmo cromossomo. Associações dessa natureza foram anteriormente mencionadas, em outras espécies, por vários autores, e refletem a natureza heterocromática das regiões envolvidas (pequena revisão em LEFÈVRE, 1976).

O aspecto da região deficiente e da região adicional não invalidam a hipótese de translocação entre os cromossomos aberrantes: em ambos os casos trata-se de uma faixa espessa. Entretanto, para que uma associação como a descrita pudesse ter causado uma translocação, seria necessário admitir: (1) que as ligações verificadas nas glândulas salivares também ocorrem nas células germinativas e (2) a possibilidade de uma "cicatrização" posterior à translocação, nos dois cromossomos envolvidos, dada a aparente existência de uma faixa terminal, comum aos homólogos em heterozigose. Ambas as condições permanecem, porém, não demonstradas em Drosophila.

Inversões, duplicações e deficiências fazem parte da



variabilidade genética das populações e têm constituído, especialmente os dois primeiros, um substrato importante no processo evolutivo de muitas espécies de organismos. Os híbridos interespecíficos, principalmente os de Drosophila vêm sendo usados há longo tempo como material de trabalho excelente para detecção de diferenças cromossômicas estabelecidas no processo de diferenciação das espécies. O pareamento de seus cromossomos politénicos permite, numa comparação direta, visualizar mesmo pequenas diferenças cromossômicas interespecíficas.

Mais recentemente, os híbridos interespecíficos têm sido utilizados em análises genéticas e citológicas com o objetivo de detectar também modificações fisiológicas, relacionadas com os mecanismos de regulação gênica.

O interesse quanto ao conhecimento dos mecanismos de regulação gênica decorre, de um lado, de sua importância na atividade e na diferenciação celulares, e de outro, do fato de serem considerados elementos básicos na divergência interespecífica.

A idéia de que as modificações nos sistemas reguladores genéticos têm desempenhado um papel fundamental na evolução dos organismos tem sido defendida por vários autores entre os quais OHNO (1969), WILSON & cols. (1974), CARSON (1976) e AVISE & DUVAL (1977). Por exemplo, WILSON & cols., baseados em estudos de diferenças protéicas em mamíferos e anfíbios, concluíram que as principais barreiras moleculares à hibridação interespecífica são as diferenças entre os genomas parentais quanto aos sistemas reguladores.

Os genes estruturais de uma espécie devem ter sido selecionados de modo a interagir, da forma mais adequada, com seus próprios genes reguladores. Assim, nada melhor que o estudo dos híbridos para detectar modificações evolutivas dos siste

mas reguladores.

No que se refere à síntese do RNA ribossômico, os híbridos de Drosophila mulleri e D. arizonensis revelaram a existência de diferença, entre as duas espécies, quanto aos mecanismos reguladores. Colocados juntos genomas de ambas, evidenciaram-se mecanismos de reserva, relacionados ao controle da síntese nucleolar: amplificação do DNA e ativação de um organizador nucleolar secundário, aparentemente sob condições de dominância do sistema regulador de arizonensis sobre o de mulleri (BICUDO & RICHARDSON, 1977).

Os resultados dos retrocruzamentos, realizados no presente trabalho, confirmaram as observações efetuadas na geração F_1 segundo as quais, nas fêmeas portadoras de um X de mulleri e um X de arizonensis, um único X associa-se ao nucléolo, e esse X é o originado de arizonensis. Esses resultados foram confirmados em 3 fêmeas heterozigotas para o cromossomo X e 4 fêmeas recombinantes heterozigotas para a região proximal desse cromossomo, obtidas nos dois testes de retrocruzamentos.

Os retrocruzamentos permitiram verificar ainda, que nas fêmeas a repressão da atividade do organizador nucleolar oriundo de mulleri não está na dependência da origem materna ou paterna desse cromossomo. Os cruzamentos mulleri X arizonensis são possíveis na direção que envolve fêmeas mulleri e machos arizonensis. Assim, as fêmeas híbridas F_1 têm o X de mulleri proveniente da mãe e o de arizonensis do pai. Nos cruzamentos entre fêmeas F_1 e machos mulleri, porém, a situação inverte-se, pois as fêmeas heterozigotas têm o X de mulleri proveniente do pai e o X de arizonensis proveniente da mãe. Em ambos os casos a dominância do organizador nucleolar de arizonensis sobre o de mulleri manifesta-se da mesma maneira.

Por esse processo, porém, não é testada a condi-

ção recíproca (isto é, fêmeas arizonensis X machos mulleri) no que se refere à origem do citoplasma, que nas fêmeas F_1 provém de mulleri; e nas fêmeas dos retrocruzamentos provém das fêmeas híbridas F_1 . Entretanto, o fato da atividade repressora ser a mesma nos dois tipos de citoplasma testados é indicativo de que a interação, nas fêmeas, ocorre entre os cromossomos, sem interferência detectável da origem citoplasmática.

Por outro lado, a constância desses resultados, independentemente da variabilidade quanto aos demais cromossomos das fêmeas obtidas nos retrocruzamentos, sugere que a dominância do organizador nucleolar é um efeito de interação entre os próprios cromossomos X, nessas fêmeas híbridas. Corroborando ainda essa idéia, em fêmeas descendentes dos retrocruzamentos, homozigotas para o cromossomo X originado de mulleri, ou recombinantes homozigotas mulleri para a região proximal do cromossomo X, ocorre associação normal desse cromossomo ao nucléolo, indicando que ele atua como organizador nucleolar nas fêmeas, na ausência do X de arizonensis. Essa situação assemelha-se à verificada nos híbridos melanogaster/simulans por DURICA & KRIDER (1977, 1978).

Um outro aspecto mostrado pelos cromossomos X recombinantes pode ser indicativo de uma autonomia do processo de ativação ou inativação da região organizadora nucleolar do cromossomo X em relação a outras regiões do mesmo cromossomo. Se a dificuldade no pareamento cromossômico de regiões aparentemente iguais quanto ao padrão de bandas é consequência da diferenciação gênica entre as espécies, os cromossomos recombinantes interespecíficos obtidos devem transportar sequências gênicas inexistentes em qualquer das espécies parentais. Entretanto, os cromossomos X recombinantes, nas fêmeas, comportam-se, ao nível de nossas observações, como os não recombinantes. Por exemplo, o par cromossômico portador de X recombinante tipo B, obtido em cruza-

mentos F_1 X mulleri, mostrou associação de um só X ao nucléolo (o X de arizonensis) apesar de ser homozigoto mulleri para a região distal do cromossomo. Por outro lado, grandes extensões em heterozigose (subtipos C e D) aparentemente também não afetam a atividade organizadora nucleolar da região proximal homozigota.

Contudo, essa situação poderia também ser atribuída à ausência de diferenciação entre as espécies quanto a possíveis genes envolvidos com a atividade organizadora nucleolar, localizados além da banda marcadora, na direção distal. A dificuldade de pareamento dessa região não deve significar, obrigatoriamente, diferenciação interespecífica em todos os seus loci.

Os machos obtidos dos retrocruzamentos confirmaram a hipótese aventada a partir dos machos F_1 (BICUDO & RICHARDSON, 1977), segundo a qual a ausência do cromossomo X de arizonensis estaria associada à ocorrência de amplificação de um dos microcromossomos e sua associação ao nucléolo.

Entre os machos descendentes dos retrocruzamentos, os diploides portadores de X de arizonensis apresentaram, conforme se esperava, microcromossomos normais, isto é, sem amplificação aparente, quer estivessem em homozigose (dois microcromossomos arizonensis) ou heterozigose (um microcromossomo de cada espécie). Também conforme o esperado, o único macho portador de X de mulleri e microcromossomos em heterozigose, obtido no experimento, mostrou amplificação de um dos microcromossomos e associação do mesmo ao nucléolo. Entretanto, nenhuma das células analisadas nas glândulas salivares desse indivíduo apresentou um grau de amplificação tão elevado quanto o verificado nos híbridos F_1 . Na maioria das células, mesmo, aparentemente, não houve amplificação. O cromossomo X, nesse indivíduo, associava-se ao nucléolo, juntamente com o microcromossomo, sugerindo uma atividade apenas complementar do último cromossomo.

Duas hipóteses podem ser propostas para explicar essa situação: 1ª hipótese - A ausência do X de arizonensis pode não ser a causa exclusiva da amplificação. É possível que as condições do citoplasma do óvulo, criadas pelo genótipo materno, também estejam envolvidas no processo. Os machos F_1 provêm de fêmeas mulleri, enquanto o macho analisado, obtido dos retrocruzamentos, provêm de fêmea F_1 , portadora de um genoma mulleri e um genoma arizonensis. Espera-se, portanto, que os óvulos, nos dois casos, armazenem substâncias diferentes. Além disso, relações de dominância alélica interespecífica podem tornar ainda maior a diferença das condições citoplasmáticas dos óvulos dessas fêmeas. A influência do citoplasma do óvulo nas relações de dominância interespecífica quanto à atividade organizadora nucleolar foi observada, como já mencionamos, em híbridos Xenopus laevis/X. mulleri (HONJO & REEDER, 1973). 2ª hipótese - O cromossomo X do macho obtido dos retrocruzamentos pode ser recombinante e, portanto, portador de trechos arizonensis na região distal, posterior à banda marcadora. A presença de trechos de outra origem específica, no cromossomo X, parece não interferir na relação de dominância nucleolar (como foi indicado pelas fêmeas portadoras de cromossomo X recombinante), mas poderia interferir no grau de amplificação do microcromossomo.

A primeira hipótese parece mais provável e tem também o suporte dos resultados obtidos por WILKINSON (1944), em Salix. Nesse organismo, a dominância nucleolar manifesta-se em F_1 , mas não em F_2 .

Os retrocruzamentos mostraram, além dos aspectos referentes à atividade organizadora nucleolar, novas facetas da hibridação dessas espécies. Uma delas refere-se à constituição cromossômica dos descendentes desses retrocruzamentos.

O primeiro teste de retrocruzamentos mostrou uma acentuada predominância de descendentes homozigotos fêmeas e machos quando o indivíduo paterno foi tomado da espécie arizonensis. Como nos retrocruzamentos com machos da espécie mulleri todos os descendentes eram mistos quanto ao genótipo, a situação verificada em F_1 X arizonensis não pode ser atribuída à formação preferencial de gametas portadores de cromossomos arizonensis por parte das fêmeas F_1 . O fenômeno deve ter sido decorrente de uma seleção favorecendo os homozigotos para todos os pares de cromossomos, em ambos os sexos, e que deve ter atuado ao nível da fecundação ou nas fases iniciais do desenvolvimento, antes de atingida a fase de larva do 3º estágio. Aparentemente a seleção foi orientada pela constituição cromossômica paterna, interagindo com fatores inerentes ao óvulo.

Em trabalho recente, DANIELS & cols. (1977) mostraram a atuação de efeitos paternos e maternos na viabilidade de híbridos obtidos em intercruzamentos e retrocruzamentos de semiespécies de Drosophila paulistorum. O método por eles utilizado consistiu na verificação da proporção de ovos eclodidos. Como parte dos efeitos paternos foram incluídos, o genótipo do doador do espermatozóide e o do pai da fêmea cuja postura foi estudada. Os efeitos maternos relacionavam-se a características do ovo devidas à atuação do genótipo materno e incorporadas ao óvulo durante a ovogênese. Anomalias do desenvolvimento ocorreram em quase todas as fases da embriogênese, com reflexos acentuados na ultraestrutura normal dos embriões.

Se admitirmos que os fenômenos detectados por BICUDO & RICHARDSON (1977), nas glândulas salivares dos híbridos mulleri/arizonensis são válidos para as células gaméticas, podemos supor que o citoplasma do óvulo das fêmeas híbridas acumule

apenas RNA ribossômico procedente de arizonensis. Esse RNA ribossômico acumulado poderia ser o fator citoplasmático envolvido no processo de seleção favorecendo híbridos homozigotos. A transferência de resultados das glândulas salivares para os óvulos encontra algum suporte em dados obtidos em híbridos de Xenopus laevis e X. mulleri, os quais mostraram repressão do organizador nucleolar de mulleri em células somáticas e nos óvulos (BROWN & BLACKER, 1972; HONJO & REEDER, 1973).

Por outro lado, sabe-se que a síntese e o processamento do RNA ribossômico são fenômenos regulatórios importantes nos processos de proliferação celular e diferenciação dos tecidos. Condições que modifiquem ou alterem a síntese do RNA r comprometem seriamente as funções celulares que dependem de níveis mais elevados de síntese protéica (BYNUM & VOLKIN, 1976).

O envolvimento do RNA ribossômico nos processos de diferenciação tem sido demonstrado de várias formas. Por exemplo: (1) em híbridos de Xenopus verificou-se que a expressão nucleolar é dependente do estágio do desenvolvimento (CASSIDY & BLACKER, 1974); (2) em neuroblastoma de rato, os padrões de síntese e processamento do RNA ribossômico variam no decorrer da diferenciação celular (BYNUM & cols., 1977); (3) a diferenciação do pâncreas é acompanhada por um aumento da síntese de RNA r (WALTHERS & cols., 1974) cuja falha leva à alteração ultraestrutural da glândula (PARSA & cols., 1970, 1972 e MIZOGUCHI & cols., 1972, em BYNUM & VOLKIN, 1976).

De qualquer modo, no presente trabalho, a interação citoplasma-cromossomos, levando à seleção dos genótipos, poderia resultar de um melhor entrosamento entre substâncias (relacionadas direta ou indiretamente ao RNA ribossômico estocado no óvulo) ou genes reguladores maternos, e genes estruturais pa

ternos, da mesma espécie.

Aparentemente, o embrião começa seu desenvolvimento com apenas uma fração de seu material genético atuante. Dados de hibridação DNA/RNA obtidos em ouriço do mar mostraram que na fase de blástula o RNA mensageiro sintetizado é ainda do mesmo tipo estocado no óvulo pela mãe (WHITELEY & cols., 1966; SLATER & SPIEGELMAN, 1966; OHNO, 1969). A organogênese envolve, assim, a ativação sequencial de genes que estavam reprimidos. Por outro lado, vários experimentos têm indicado que a transcrição do DNA nucleolar está sob controle citoplasmático em ovócitos e ovos (Por exemplo, em Xenopus, WOODLAND & cols., 1972). Pode-se, assim, admitir que as interações entre substâncias reguladoras e genes de uma mesma espécie provejam aos seus portadores maior viabilidade que as decorrentes de interação entre substâncias e genes de espécies diferentes. Uma interação dessa natureza poderia ser responsável pela seleção preferencial a favor dos indivíduos homozigotos, nos retrocruzamentos entre fêmeas F_1 e machos arizonensis.

O segundo teste de retrocruzamentos de fêmeas F_1 com machos arizonensis, entretanto, apresentou resultados diferentes do primeiro, quanto à constituição cromossômica. As 19 larvas analisadas eram mistas, isto é, portadoras de pares de cromossomos em homo e heterozigose. Isto demonstra que a produção preferencial de homozigotos, verificada no primeiro teste, não é obrigatória em retrocruzamentos com arizonensis. Resta porém saber as causas determinantes dessa diferença de resultados. Variações no genótipo materno e paterno, idade das fêmeas (no 1º teste foram feitos inicialmente cruzamentos por casal que não produziram descendentes e que mais tarde foram reunidos em cruzamentos em massa, enquanto no 2º teste foram utilizadas fêmeas

jovens), condições ambientais (por exemplo, embora ambos os experimentos tenham sido mantidos em câmara de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ não houve um controle rigoroso do tempo de manutenção fora da câmara para manipulação) são possibilidades a serem testadas. Em qualquer delas a causa última ainda pode estar relacionada à síntese de RNA ribossômico. No que se refere à temperatura, pelo menos, sabe-se que é uma variável da qual a síntese de RNA r é dependente (por exemplo, SALADINO & NORTON, 1976).

Os machos aneuploides, portadores de um microcromossomo extra, produzidos pelos retrocruzamentos, trouxeram uma nova contribuição ao estudo da regulação da atividade gênica nos híbridos mulleri/arizonensis.

A origem desses aneuploides pode ser explicada por anomalia na meiose das fêmeas híbridas, levando à não-dissociação do par de microcromossomos. Em híbridos, tanto vegetais como animais, é frequente a ocorrência de anomalias do comportamento cromossômico, no processo de divisão. Como esse comportamento, na meiose, está sob controle genético (por exemplo, BAKER & cols., 1976; RAMEL & VALENTIN, 1977), pode-se compreender que a alteração das condições de equilíbrio, causada pela hibridação, determine a ocorrência de anomalias na segregação cromossômica.

Os machos aneuploides, analisados no presente trabalho, caracterizavam-se pela presença de 3 microcromossomos em todas as células das glândulas salivares. Um desses microcromossomos apresentava alteração morfológica, sugerindo um processo de heterocromatinização, pelo aspecto e pela intensidade de coloração com orceína (revisão sobre heterocromatina e heterocromatinização em BIANCHI, 1978; MELLO, 1978).

Em todas as células das glândulas salivares de

um mesmo indivíduo, a origem específica do cromossomo heterocromatinizado foi a mesma, indicando estabelecimento precoce, no desenvolvimento, do cromossomo a ser submetido ao processo.

Contudo, a origem específica do cromossomo alterado diferiu entre os indivíduos aneuploides, o que mostrou a sua não obrigatoriedade quanto a este aspecto.

A comprovação de que se trata realmente de um processo de heterocromatinização requererá o uso de técnicas adicionais. Entretanto, a possibilidade de que seja realmente um fenômeno dessa natureza, é, "a priori", muito plausível não só pelas razões morfológicas apontadas, mas também por razões de ordem fisiológica. A heterocromatinização indica, no caso em estudo, inativação de um cromossomo excedente, permitindo a manutenção do equilíbrio cromossômico do estado diploide, que é viável nesses híbridos, apesar dos problemas decorrentes da hibridação.

A inativação cromossômica nos indivíduos triplo-6 teria, portanto, função fundamentalmente semelhante à da inativação do X nas fêmeas dos mamíferos (revisão em LYON, 1972; GARTLER & ANDINA, 1976). Nas fêmeas dos mamíferos, a heterocromatinização elimina os efeitos aneuploides entre fêmeas e machos, nos tecidos somáticos. Resulta uma "compensação de dose" de tal forma que a fêmea com dois X e o macho com um, produzem a mesma quantidade de produtos gênicos ligados a esse cromossomo.

A expressão "compensação de dose" foi criada para referir-se, em Drosophila, a características que, embora determinadas por genes localizados no cromossomo X, mostram o mesmo fenótipo em machos e fêmeas (MULLER & cols., 1931, em MARONI & PLAUT, 1973). Nesse organismo, o mecanismo de compensação proposto foi o de hiperatividade transcricional do cromossomo X.



nos machos. Evidência dessa hiperatividade foi apresentada em várias espécies de Drosophila (pequena revisão em MUKHERJEE & CHATTERJEE, 1975). Por exemplo, o exame da atividade de enzimas codificadas pelo cromossomo X, em fêmeas e machos de D. melanogaster (entre outros, KOMMA, 1966; SEECOF & cols., 1969), e de D. pseudoobscura (ABRAHAM & LUCCHESI, 1973) mostrou resultados idênticos nos dois sexos.

Os mecanismos de "compensação de dose" são, portanto, mecanismos reguladores que visam, de modo geral, dotar as células de um nível ótimo de síntese de determinadas substâncias, que lhes assegurem uma atividade metabólica normal. No que se refere ao cromossomo X de fêmeas e machos de mamíferos ou de Drosophila, os mecanismos compensam as falhas criadas por um sistema selecionado no processo evolutivo para determinação do sexo.

Contudo, nos híbridos de Drosophila em estudo neste trabalho, o processo (admitindo-se que se trata realmente de um processo de "compensação de dose") difere pelo fato de ser um mecanismo de reserva, não utilizado normalmente por qualquer das espécies envolvidas, no estado diploide; e também por atuar sobre um autossomo.

Por outro lado, a confirmação da disponibilidade de um mecanismo de inativação por heterocromatinização mostrará que a compensação de dose em Drosophila pode também ser produzida por outro processo além da equivalência transcricional do único X dos machos, aos dois X da fêmea.

A inativação por heterocromatinização ocorre também em outros organismos. Nos coccídeos, esse processo está associado ao desenvolvimento sexual, atingindo um lote cromossômico completo dos machos, ou à inativação de conjuntos cromossômi-

cos supernumerários em tecidos poliploides de embriões fêmeas e machos (revisão em BROWN & NUR, 1964).

O mecanismo detectado nos híbridos aneuplóides mulleri/arizonensis, não parece ser geral para híbridos de Drosophila, trissômicos para o microcromossomo. Nos híbridos de D. virilis X D. littoralis, portadores de microcromossomos em triplicata nas glândulas salivares, esses cromossomos eram morfológicamente normais (EVGENEV & SIDOROVA, 1976).

A alteração morfológica do microcromossomo nos machos aneuplóides parece estar associada a um processo de amplificação. Entretanto, se essa alteração for um processo de inativação, a amplificação tornar-se-á, aparentemente inútil, a menos que a inativação não atinja todo o cromossomo. Na maioria das células, porém, a alteração morfológica parece abranger todo o cromossomo e até mesmo os filamentos que o associam ao X ou a outro cromossomo.

De fato, a amplificação verificada paralelamente à heterocromatinização não parece, pelo menos, associada à atividade organizadora nucleolar; o microcromossomo alterado não se associa ao nucléolo como ocorre com os microcromossomos amplificados nos híbridos F_1 e nos descendentes de retrocruzamentos. Além disso, pelo menos a região proximal do cromossomo X, a partir da banda marcadora, nesses machos aneuplóides, é arizonensis, e associa-se normalmente ao nucléolo, podendo "dispensar" a amplificação do microcromossomo, de acordo com as observações efetuadas nos híbridos diplóides.

É possível que o aumento de tamanho do cromossomo heterocromatinizado seja decorrente do próprio processo de heterocromatinização. Como indicaram alguns desses microcromossomos, a rede heterocromática parece ser uma camada superposta

ao cromossomo, a qual deve contribuir para aumento de seu volume.

Quais seriam e como atuariam os mecanismos acionadores dessa aparente heterocromatinização em híbridos mulleri/arizonensis? É possível que, em suas linhas gerais o sistema regulador desse fenômeno seja semelhante ao do cromossomo X nos mamíferos. Nos próprios mamíferos, porém, o processo da heterocromatinização permanece desconhecido na maioria de seus aspectos regulatórios, biofísicos e bioquímicos. Por exemplo, foi só em trabalho recente que MARTIN & cols. (1978) apresentaram a primeira evidência de que a diferenciação do cromossomo X em mamíferos é um processo de inativação de um X entre dois ativos e não ativação de um X entre dois inativos.

Os híbridos triplo 6 parecem constituir material bastante promissor para o estudo de problemas visando melhor caracterizar e compreender os fenômenos de regulação envolvendo a heterocromatinização, e do próprio processo de heterocromatinização. Suas vantagens resultam, basicamente, de que o processo envolve um cromossomo politênico, o qual, mesmo sendo o menor do conjunto a que pertence, é ainda muito maior que os cromossomos de células de mamíferos; por ser um cromossomo de Drosophila, organismo conhecido e acessível a muitas formas de análise genética e citológica; e por ocorrer em espécies nas quais outros mecanismos de regulação começam a ser descobertos e podem ser relacionados.

Um conhecimento mais profundo desses mecanismos talvez possa ter implicações ainda mais amplas, tais como na compreensão dos fenômenos de heterocromatinização que ocorrem em determinadas formas de câncer (SUSS & cols., 1973).

A possibilidade de inativação por heterocromati-



nização é mais um mecanismo regulador de reserva que aponta a importância da atividade do pequeno cromossomo 6 no conjunto cromossômico dessas espécies. Em diferentes circunstâncias, ele é passível de amplificação correspondente a até 7 vezes seu tamanho normal, de ativação como um organizador nucleolar secundário e de inativação quando em dose excessiva.

Vários trabalhos têm demonstrado a existência de homologia entre o cromossomo X e o microcromossomo (cromossomo 4) de D. melanogaster (SANDLER & NOVITSKI, 1956; KAUFMANN & GAY, 1969; pequena revisão em HOCKMAN, 1976). KAUFMANN & GAY (1969), por exemplo, apresentaram evidência citológica do fenômeno, pela observação de um pareamento mais frequente entre a extremidade distal do cromossomo 4 e a do X, que entre aquele cromossomo e qualquer outro autossomo. Também foi mencionada a existência de homologia entre o microcromossomo de D. melanogaster e a região eucromática proximal do cromossomo X de D. busckii (KRIVSHENKO, 1959); o autor encontrou mutantes para os mesmos caracteres em ambos os cromossomos.

Nas espécies do complexo mulleri, foi observada, pelo menos em D. mojavensis, uma associação mais frequente do cromossomo 6 ao X do que a outro autossomo, aparentando, algumas vezes, inclusive um pareamento faixa com faixa. Essa observação pode ser indicativa de homologia entre aqueles cromossomos. Por outro lado, o envolvimento de ambos na síntese nucleolar mostra semelhança genética entre eles.

Diante desses resultados pode-se conjecturar se essa capacidade de heterocromatinização do cromossomo 6 não seria remanescente de um mecanismo estabelecido precocemente no processo evolutivo, em relação ao cromossomo X, do qual o microcromossomo teria se originado.

De longa data, a frequente associação de um mesmo cromossomo ao nucléolo tem sido tomada como indicativa de que esse cromossomo é organizador nucleolar. Entretanto, a aplicação da técnica da hibridação "in situ" com RNA ribossômico, a mulleri, arizonensis e seus híbridos, foi feita com o objetivo, já mencionado, de comprovar, pelo método considerado o mais adequado, a localização dos cistrons ribossômicos no cromossomo X e no microcromossomo daquelas espécies.

Os resultados da aplicação da hibridação aos cromossomos politênicos mostraram 3 aspectos principais: (1) a predominância de grãos no DNA localizado no interior do nucléolo, (2) a presença de grãos na região proximal do microcromossomo e no filamento que o associa ao nucléolo, e (3) a marcação mais acentuada nos nucléolos dos machos híbridos que nos nucléolos das espécies parentais e das fêmeas híbridas.

O primeiro aspecto havia sido observado previamente em cromossomos politênicos de D. hydei, por PARDUE & cols. (1970); esses autores utilizaram RNA r de Xenopus para hibridação, observando marcação exclusiva no interior do nucléolo, embora se saiba que aquela espécie de Drosophila apresenta um organizador nucleolar no cromossomo X (HEITZ, 1934, em PARDUE & cols., 1970). O segundo aspecto é indicativo da presença de cistrons ribossômicos no microcromossomo, e o terceiro pode estar associado à amplificação do DNA r nos microcromossomos dos machos híbridos.

O envolvimento do cromossomo X e do microcromossomo na atividade organizadora nucleolar, comprovado pela hibridação "in situ" DNA/RNA ribossômico, nos híbridos mulleri/arizonensis, mostrou ser verdadeiro também para os demais híbridos analisados.

O estudo da atividade organizadora nucleolar desses híbridos, pela associação dos cromossomos ao nucléolo e morfologia dos microcromossomos permitiu, porém, verificar a existência de diferenciação entre as espécies em estudo, quanto a esse aspecto: os genomas das várias espécies mostraram comportamento diferente diante do genoma de D. mulleri, nos híbridos interespecíficos.

Alguma variação ocorre também entre as células de uma mesma glândula, demonstrando a existência de uma certa independência celular quanto à expressão dessa característica. Entretanto, para cada tipo de híbrido há um comportamento celular predominante e característico.

Nas fêmeas híbridas mulleri/mojavensis o X de mojavensis é dominante. Mas o cromossomo X de mulleri pode atuar na ausência do X de mojavensis, como demonstram os machos híbridos dessas espécies. Nesses machos ocorre associação do cromossomo X de mulleri ao nucléolo e não há amplificação do microcromossomo. Nas próprias fêmeas dessas duas espécies, evidencia-se a possibilidade de atuação do X de mulleri, pela sua associação ao nucléolo, em algumas células, isolada ou juntamente com o X de mojavensis.

Nos híbridos arizonensis/mojavensis, os resultados foram iguais nas duas direções dos cruzamentos. Qualquer dos cromossomos X, de mojavensis ou arizonensis, em uma ou outra direção de cruzamento, é capaz de atuar como organizador nucleolar nos machos híbridos dessas espécies, prescindindo da amplificação do microcromossomo. Portanto, nas fêmeas, embora não se possa distinguir morfologicamente os cromossomos X das duas origens específicas, é teoricamente possível que qualquer deles, ou ambos, sejam capazes de atuar como organizadores nucleolares.

É interessante ressaltar o fato de que embora nas fêmeas híbridas arizonensis/mojavensis ou mojavensis/arizonensis não haja atividade diferencial da banda marcadora do X de arizonensis, os machos híbridos de fêmeas arizonensis X machos mojavensis mostram a banda marcadora de seu cromossomo X (recebido de arizonensis) espessa como nos próprios machos arizonensis normais. O cromossomo X de mojavensis, porém, não é dotado da capacidade de espessamento dessa banda, nem nos machos híbridos mojavensis/arizonensis, nem intraespecificamente. Portanto, essa banda encontra-se submetida a controles diferentes, em ambas as espécies.

O não espessamento da banda marcadora poderia indicar dominância de mojavensis sobre arizonensis, nas fêmeas híbridas, ou a capacidade do cromossomo X de mojavensis de responder ao mecanismo arizonensis de controle da referida banda, levando a uma situação semelhante à das próprias fêmeas arizonensis.

A comparação dos resultados obtidos nos híbridos mulleri/arizonensis e mulleri/mojavensis mostra outras diferenças entre arizonensis e mojavensis. Nos machos híbridos mulleri/arizonensis há aparentemente, uma dominância do sistema regulador de arizonensis sobre o de mulleri envolvendo amplificação do microcromossomo daquela espécie, enquanto nos híbridos mulleri/mojavensis, a dominância de mojavensis sobre mulleri só atua quando ambos os cromossomos X encontram-se presentes.

A diferença de ordem fisiológica, quanto à banda marcadora, é a única diferença visível, ao nível dos nossos experimentos, entre os cromossomos X das duas espécies. Isto talvez possa ser tomado como um reforço para a hipótese do envolvimento daquela banda em alguma forma de controle da atividade organizadora nucleolar.

Nos híbridos mulleri/aldrichi a direção de dominância inverte-se. O cromossomo X de mulleri mostra-se dominante na maioria das células das fêmeas. Consequentemente, nos machos, esse cromossomo atua como organizador nucleolar.

Nas fêmeas, porém, o X de aldrichi mostra, em algumas células, a capacidade de atuar junto com o X de mulleri (embora de forma aparentemente menos ativa), ou mesmo isolada-mente.

O comportamento dos híbridos mulleri/wheeleri, quanto ao aspecto em exame, é semelhante ao de mulleri/aldrichi. Nas fêmeas predomina associação do X de mulleri ao nucléolo, su-gerindo dominância desse cromossomo sobre o X de wheeleri. No entanto, algumas células de machos mostram alguma amplificação do microcromossomo e associação do mesmo ao nucléolo indicando ati-vidade deficiente do X de mulleri, como organizador nucleolar.

Os híbridos mulleri/navajoa apresentaram resulta-dos semelhantes aos observados nos híbridos mulleri/arizonensis. Nas fêmeas o X de navajoa domina sobre o de mulleri. Nos machos ocorre amplificação do microcromossomo e ativação como organiza-dor nucleolar secundário. Contudo há duas diferenças básicas, entre os híbridos mulleri/arizonensis e mulleri/navajoa, talvez relacionadas entre si: (1) nos machos híbridos mulleri/navajoa ocorre associação do X de mulleri ao nucléolo, sugerindo alguma atividade deste como organizador nucleolar, enquanto nos machos mulleri/arizonensis essa associação não foi observada; (2) a amplificação do microcromossomo é menos acentuada nos machos mulleri/navajoa que nos machos mulleri/arizonensis, pois enquanto nos primeiros ela é, no máximo, de 3 vezes o tamanho normal do microcromossomo, nos últimos, chega a 7 vezes. Assim, nos híbridos mulleri/navajoa a atividade do microcromossomo parece ser

de complementação da atividade do cromossomo X de mulleri. Não se pode descartar também a possibilidade de que o número de cis trons ribossômicos do microcromossomo de navajoa (admitindo-se que este seja o microcromossomo amplificado nos machos híbridos mulleri/navajoa) seja naturalmente maior que o de arizonensis (que parece ser o microcromossomo amplificado nos híbridos mulleri/arizonensis), dispensando uma amplificação mais acentuada.

O aspecto das regiões compactadas, intensamente coradas, do microcromossomo amplificado, intercaladas com regiões pouco densas, e que foi visto em machos híbridos F_1 mulleri/navajoa pode também ser decorrente de uma heterocromatinização desse microcromossomo. A heterocromatinização, que não atinge todo o cromossomo, poderia ser uma forma de correção de um processo de politenia adicional de todo o cromossomo. Dessa forma seriam inativados os genes "excedentes", exceto aqueles para os quais o processo de politenia adicional desencadeou-se. Seriam, portanto, nos híbridos F_1 e nos aneuplóides descendentes de retrocruzamentos, dois processos de heterocromatinização morfológicamente diferenciáveis pelo aspecto do cromossomo atingido. Mas envolvidos, em ambos os casos, com a compensação de dose.

O interesse em aplicar as técnicas de coloração pela prata no material analisado neste trabalho, resultou, principalmente da recente atribuição, a elas, da capacidade de corar apenas os organizadores nucleolares ativos e não todas as regiões portadoras de DNA ribossômico (MILLER & cols., 1976a, b, 1977; HOWELL, 1977). Essas técnicas poderiam, assim, confirmar as relações de dominância interespecífica, deduzidas por outro tipo de observação, no material que vimos analisando. Entretanto, sua aplicação aos gânglios cerebrais das espécies em estu-

do não mostrou coloração seletiva de regiões cromossômicas.

Os cromossomos politênicos, porém, apresentaram alguns resultados interessantes. Um desses resultados foi a coloração dos filamentos que associam o cromossomo X ao nucléolo e que não haviam mostrado granulação de prata nas lâminas submetidas à hibridação "in situ".

Outro mérito da aplicação das técnicas de coloração pela prata, aos cromossomos politênicos, foi o de confirmar que os "corpúsculos semelhantes ao nucléolo", detectados com alguma dificuldade nas lâminas dos híbridos, não coradas ou coradas pela orceína lacto-acética, são realmente formados de material nucleolar: esses corpúsculos coraram-se de castanho escuro ou marrom, da mesma maneira que os nucléolos normais.

A melhor visualização dos nucléolos adicionais permitiu, por sua vez, verificar que a frequência com que eles aparecem nas células das glândulas salivares dos híbridos interespecíficos é mais elevada que nas espécies parentais. Também a forma do nucléolo que é normalmente arredondada ou ovalada nas observações intraespecíficas, altera-se em muitos híbridos, assumindo frequentemente contornos bastante irregulares. O tamanho do nucléolo também parece aumentado em alguns híbridos.

Essas modificações refletem os distúrbios causados pela hibridação na síntese nucleolar, evidenciados, de outra maneira, pelo uso de mecanismos de reserva. Mesmo nos híbridos em que se estabelecem associações aparentemente normais entre o cromossomo X e o nucléolo, essas modificações numéricas e morfológicas ocorrem, revelando a inadequação das interações cromossômicas interespecíficas em outros aspectos da atividade organizadora nucleolar.

Os híbridos mulleri/aldrichi e mulleri/wheeleri (especialmente os primeiros) foram os que apresentaram as fre-



quências mais elevadas de células contendo corpúsculos nucleolares adicionais. Em ambos os casos, o cromossomo X de mulleri é dominante.

A dominância interespecífica do organizador nucleolar, observada nas fêmeas híbridas, foi deduzida da associação de um único X ao nucléolo. Nessas fêmeas, com exceção de arizonensis/mojavensis, os cromossomos X não pareiam e a origem específica de cada um deles, pode ser determinada pela morfologia.

Entretanto, despareamento do par de cromossomos X e associação de um só de seus elementos ao nucléolo, foram também observados em um número variável de células das glândulas salivares de descendentes dos retrocruzamentos F_1 X mulleri e F_1 X arizonensis, homozigotos para o cromossomo X, e em uma fêmea obtida dos estoques de aldrichi.

Entre os indivíduos obtidos dos retrocruzamentos, que mostraram o fenômeno, alguns eram homozigotos para o cromossomo X em toda sua extensão; outros eram recombinantes, porém homozigotos para a região proximal do cromossomo.

A variedade das características cromossômicas das fêmeas homozigotas, que mostraram despareamento e associação de um único X ao nucléolo, permitiu descartar de imediato algumas hipóteses explicativas desse fenômeno. Entre elas, a de que seria decorrente da situação de hibridação das fêmeas obtidas nos retrocruzamentos (uma fêmea do estoque aldrichi também apresentou o fenômeno); ou a de uma possível continuidade da repressão do cromossomo X de mulleri oriundo da fêmea híbrida F_1 , na geração seguinte (uma das fêmeas era homozigota para o X de arizonensis); ou a de um possível efeito de trechos heterozigotos distais sobre a região proximal homozigota dos cromossomos X re

combinantes (o fenômeno foi observado não só em recombinantes como também em cromossomos X homozigotos em toda sua extensão e, além disso, a não interferência das regiões do cromossomo X envolvidas em recombinação, sobre o organizador nucleolar já havia sido indicada neste trabalho).

Poderia então a associação unicromossômica do X ao nucléolo nessas fêmeas, ser consequência do despareamento? ASHBURNER (1967), baseado em um estudo de pufes de D. melanogaster propôs a hipótese de que a atividade de genes em cromossomos homólogos é influenciada pelo seu grau de sinapse. Entretanto, no presente trabalho, o despareamento não permite explicar o fenômeno da dominância do organizador nucleolar de uma das espécies sobre o da outra, observada nos casos de hibridação interespecífica. Além disso, foram vistos filamentos unindo um só cromossomo X ao nucléolo, em pares de cromossomos em sinapse.

Diante disto, pode-se admitir que o despareamento seja apenas o fenômeno que permite visualizar a associação unicromossômica do X ao nucléolo, nas fêmeas das espécies analisadas.

Em outras palavras, é possível que a situação analisada seja indicadora de que nas espécies do complexo mulleri um único X atue como organizador nucleolar e que a observação desse fenômeno seja normalmente impedida pelo pareamento perfeito dos homólogos.

Corroborar essa idéia o fato de que um único membro do par de microcromossomos, amplificado ou não, encontra-se normalmente associado ao nucléolo, nos híbridos interespecíficos, e que filamentos unindo um único microcromossomo ao nucléolo foram também observados intraespecificamente, nas raras vezes em que essa associação se estabelece nesses indivíduos.

A inativação de um organizador nucleolar deixaria assim de ser um fenômeno exclusivo de um relacionamento cromossômico interespecífico para tornar-se um processo intraespecífico normal dessas espécies.



V. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho confirmaram as observações anteriores quanto à dominância do organizador nucleolar de arizonensis sobre mulleri, nas fêmeas híbridas. Além disso, permitiram restringir a localização dos fatores envolvidos nessa relação de dominância, à região proximal do cromossomo X, a partir da banda marcadora. Nas fêmeas, é suficiente que esse trecho esteja presente em heterozigose interespecífica para que se manifeste a dominância do organizador nucleolar de arizonensis sobre o de mulleri.

Nos machos, porém, verificou-se que a amplificação e a ativação do microcromossomo, ligados à dominância do organizador nucleolar de arizonensis, não decorre apenas de uma relação entre cromossomos X e microcromossomos. Em outras palavras, não basta a presença de microcromossomos em heterozigose e a presença do X de mulleri (ou a ausência do X de arizonensis) para que aqueles fenômenos ocorram. Os machos descendentes dos retrocruzamentos e os machos F_1 , ambos portadores dessa constituição cromossômica, mostram diferença: (1) quanto à frequência de células que manifestam os referidos fenômenos, (2) quanto ao grau de amplificação do microcromossomo e (3) quanto à inativação do cromossomo X de mulleri.

Esse afrouxamento da dominância nucleolar está provavelmente relacionado a diferenças quanto a substâncias armazenadas nos óvulos que originaram esses indivíduos, talvez relacionadas com o próprio tipo específico de RNA r estocado nesses óvulos.

O estudo de outras espécies do mesmo complexo, sugere que em todas elas a síntese nucleolar envolve os mesmos

cromossomos: o X e o microcromossomo, sendo que o segundo atua intraespecificamente como um organizador nucleolar secundário ou um "minor site" com atividade eventual.

A colocação dos genomas das diferentes espécies em confronto com o genoma de mulleri, nos híbridos interespecíficos, mostrou porém, que elas sofreram diversificações quanto aos sistemas reguladores da atividade organizadora nucleolar.

Essa diversificação manifestou-se basicamente quanto à direção da dominância interespecífica. O organizador nucleolar de mulleri é dominante sobre o de wheeleri e o de aldrichi, mas é recessivo em relação ao de arizonensis, navajoa e mojavensis. Entretanto, quer na primeira condição, quer na segunda, todos os híbridos mostraram características peculiares, comprovando diversificação evolutiva nos mecanismos de regulação gênica.

Uma diferenciação bem acentuada quanto ao sistema regulador do organizador nucleolar foi observada entre arizonensis e mojavensis, as quais apresentam pequena diferenciação interespecífica, evidenciada, entre outros aspectos, pelo excelente pareamento cromossômico, pela alta cruzabilidade em laboratório, e mesmo pela semelhança quanto às bandas diferenciadoras do cromossomo 4, descritas no presente trabalho.

Essas observações corroboram as idéias que atribuem importância básica aos mecanismos de regulação, na diferenciação de espécies próximas com pouca divergência em outros níveis.

As observações realizadas também quanto ao número e a morfologia do nucléolo indicaram que a hibridação compromete a síntese nucleolar em vários aspectos.

Os resultados obtidos evidenciaram ainda que a

ativação de um organizador nucleolar secundário e a amplificação gênica a ela relacionada são apenas alguns dos mecanismos de regulação de que dispõem as espécies analisadas. Processos de compenção de dose relacionados com a heterocromatinização de um microcromossomo excedente, ou a atividade diferencial entre os sexos quanto a uma banda do cromossomo X (talvez envolvida com a própria regulação da atividade organizadora nucleolar) são outros recursos de que as mesmas dispõem.

Essas observações permitem reafirmar que embora o processo evolutivo tenha selecionado padrões normais de comportamento celular diferentes para muitos organismos, em cada um deles podem existir, sob a forma de mecanismos de reserva, componentes que fazem parte do padrão normal de outros organismos.

VI. RESUMO

No presente trabalho foram realizados experimentos com dois objetivos principais: (1) Testar hipóteses aventadas por BICUDO & RICHARDSON sobre a regulação da atividade organizadora nucleolar, envolvendo relações interespecíficas de dominância em híbridos de D. mulleri e D. arizonensis; (2) Detectar variações interespecíficas quanto à regulação do organizador nucleolar, pelo estudo dessas e outras espécies do complexo mulleri.

Os experimentos realizados para o primeiro objetivo abrangeram: (1) retrocruzamentos de fêmeas híbridas F_1 (mulleri/arizonensis) com machos das duas espécies parentais, cujos descendentes foram analisados citologicamente, em lâminas de glândulas salivares coradas com orceína-lacto-acética; e (2) estudos de preparações citológicas de mulleri, arizonensis e seus híbridos, submetidas ao processo da hibridação "in situ" com RNA ribossômico.

Os resultados dos retrocruzamentos confirmaram a dominância do organizador nucleolar do cromossomo X de arizonensis sobre o de mulleri, nas fêmeas heterozigotas para esse par de cromossomos, e mostraram que essa dominância independe da constituição dos demais pares de cromossomos quanto à origem específica, não sofre a interferência da presença de certos trechos de origem específica diferente no cromossomo X e nem da procedência materna ou paterna dos cromossomos X.

Nos machos descendentes dos retrocruzamentos, portadores de cromossomo X de mulleri, foi detectada a amplificação e a ativação de um microcromossomo. Entretanto, o número de células das glândulas salivares que apresentaram esses fenômenos,



e o grau de amplificação do microcromossomo, foram bem menores que nos machos F_1 , indicando a existência de outros fatores relacionados ao controle dos processos referidos, além da presença do cromossomo X de mulleri e microcromossomos em heterozigose. Esse afrouxamento da dominância da atividade organizadora nucleolar foi atribuído a possíveis diferenças citoplasmáticas quanto a substâncias armazenadas nos óvulos que produziram os híbridos F_1 e os descendentes dos retrocruzamentos.

Os resultados da hibridação "in situ" DNA/RNA r foram interpretados como indicativos da presença de cistrons ribossômicos nos microcromossomos, previamente deduzida pela associação desses cromossomos ao nucléolo.

Os experimentos realizados para detectar diferenças interespecíficas quanto aos mecanismos reguladores da atividade organizadora nucleolar abrangeram estudos citológicos das espécies D. mulleri, D. arizonensis, D. navajoa, D. mojavenensis, D. aldrichi e D. wheeleri, e alguns de seus híbridos. Foram analisadas lâminas coradas pela orceína-lacto-acética e pela prata. Os resultados desses experimentos revelaram a existência de diferenciação, quanto ao aspecto abordado, entre todas as espécies analisadas, inclusive entre as espécies crípticas mojavenensis e arizonensis, cuja proximidade biológica havia sido demonstrada de muitas formas.

Embora em todas as espécies o cromossomo X e o microcromossomo estejam envolvidos na atividade organizadora nucleolar, a comparação dos híbridos obtidos do cruzamento de fêmeas mulleri com machos das demais espécies mostrou variação em ambos os sexos: nas fêmeas, quanto à origem específica do organizador nucleolar dominante, e nos machos, pela ocorrência ou

não de amplificação e ativação do microcromossomo como um organizador nucleolar secundário, e pelo grau dessa amplificação.

A coloração pela prata, aplicada às glândulas salivares, mostrou que a hibridação determina também alterações morfológicas e numéricas dos nucléolos.

Paralelamente, outras observações nessas espécies e seus híbridos indicaram a existência de mecanismos de compensação de dose, configurados: (1) na atividade diferencial, entre fêmeas e machos arizonensis, de uma banda localizada no cromossomo X e (2) em um processo de heterocromatinização de um dos microcromossomos (cromossomo 6), em híbridos mulleri/arizonensis aneuploides triplo-6. Foram apresentados elementos que permitem supor um envolvimento da banda que apresenta atividade diferencial, no controle da atividade organizadora nucleolar das espécies analisadas.

A possibilidade de que a própria associação de um único X ao nucléolo, evidenciada nas fêmeas híbridas interespecíficas, constitua um mecanismo de compensação normal intraespecífico, foi também discutida.



VII. SUMMARY

The experiments in the present paper were carried out intending basically (1) to check some hypothesis advanced by BICUDO & RICHARDSON on the regulation of the nucleolar organizer activity involving interspecific dominance in D. mulleri/D. arizonensis hybrids; and (2) to detect interspecific variation in the regulatory mechanisms of the nucleolar organizer, by studying 6 species in the mulleri complex.

The first experiments included: (1) Backcrosses of mulleri/arizonensis F_1 females to males from both parental species, the progeny of which was cytologically analyzed in salivary gland squashes stained by lacto-acetic orcein; and (2) Analyses of salivary gland squashes of mulleri, arizonensis and their hybrids, submitted to the in situ hybridization with ^{125}I rRNA.

Female progeny from backcrosses, heterozygous for the X chromosome, confirmed the dominance of the nucleolar organizer in the arizonensis X over that in the mulleri X. Those females also showed that the dominance is not influenced by the specific origin of the other chromosomes in the genotype or by the presence of certain regions from different specific origins joined in the same chromosome by crossing over, nor even by the maternal or paternal origin of the X chromosomes.

Male progeny from backcrosses, carrying mulleri X chromosome and heterozygous microchromosomes, showed microchromosome activation to act like a secondary nucleolar organizer, associated with gene amplification, as previously observed in F_1 male hybrids. However, the frequency of cells which showed the phenomenon, and the degree of microchromosome

amplification were lower in males from backcrosses than in F_1 hybrid males. These results indicated that besides the presence of a mulleri X chromosome and heterozygous microchromosomes, other factors are also involved in the control of nucleolar organizer dominance in males. Cytoplasmic differences due to differential synthesis of substances stored in the eggs which originated F_1 males and males from backcrosses could be responsible for that dominance weakening.

In situ hybridization with rRNA revealed rDNA in the proximal end of the microchromosome and also in the threads joining it to the nucleolus. Thus, this method, considered the most appropriate for localizing rRNA genes, confirmed the presence of rDNA in that chromosome, previously inferred by its morphological association to the nucleolus.

The experiments for detecting interspecific variation in the regulatory mechanisms of nucleolar organizer included cytological analysis of hybrids and parental species in salivary gland preparations stained by lacto-acetic orcein and Ag-staining techniques. The comparison between hybrids obtained in crosses of mulleri females to males from every other species showed that although in every case the X chromosome and the microchromosome are involved in the nucleolar synthesis, the species are differentiated from each other in the regulation of that activity. The females from different interspecific crosses showed variation in the specific origin of the dominant nucleolar organizer: mulleri is dominant over wheeleri and aldrichi, but arizonensis, navajoa and mojavensis are dominant over mulleri.

In male hybrids, variation was detected by the occurrence, in some of them, of microchromosome activation associated with gene amplification and also by the occurrence



of different degrees of gene amplification.

Ag-staining techniques revealed changes in the morphology and number of nucleoli in the salivary gland cells, indicating that hybridization disturbs nucleolar synthesis in a manifold way. *Chromosoma*, 21: 11-38, 1977.

Other observations revealed dosage compensation mechanisms in some of the species examined and their hybrids. These observations included: (1) a differential activity among arizonensis males and females of a band in the X chromosome; and (2) a heterochromatinization process of a microchromosome (chromosome 6) in aneuploid triple-6 males from backcrosses. Some results support the view of an involvement of the mentioned band located in the X chromosome in the control of the nucleolar activity. *Chromosoma*, 21: 11-38, 1977.

The possibility that the association of a single X chromosome to the nucleolus, observed in the interspecific hybrid females, is a normal intraspecific compensatory mechanism was also discussed. *Chromosoma*, 21: 11-38, 1977.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, I., LUCCHESI, J. C. - Dosage compensation in Drosophila pseudoobscura and D. willistoni (Abstr.). Genetics, 74: 52 (Suppl.), 1973.
- ASHBURNER, M. - Gene activity dependent on chromosome synapsis in the polytene chromosome of Drosophila melanogaster. Nature, 214: 1159-1160, 1967.
- ATHERTON, D. & GALL, J. - Salivary gland squashes for in situ nucleic acid hybridization studies. Drosophila Inf. Serv., 49: 131-133, 1972.
- AVISE, J. C. & DUVALL, S. W. - Allelic expression and genetic distance in hybrid macaque monkeys. The Journal of Heredity, 68: 23-30, 1977.
- BAKER, B. S., CARPENTER, A. T. C., ESPOSITO, M. S., ESPOSITO, R. E. & SANDLER, L. - The genetic control of meiosis. Ann. Rev. Genet., 10: 53-134, 1976.
- BAUMLEIN, H. & WOBUS, U. - Chromosomal localization of ribosomal 5 S RNA genes in Chironomus thummi by in situ hybridization of iodinated 5 S RNA. Chromosoma, 57: 199-204, 1976.
- BERNHARD, W. - Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells. Nat. Cancer Inst. Monograph, 23: 13-38, 1965.
- BIANCHI, N. O. - Duplicacion Cromosomica y Heterocromatina a Nivel Molecular y Citologico. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Organizacion de los Estados Americanos. Serie de Biologia. Monografia 19, 1978.
- BICUDO, H. E. M. C. & RICHARDSON, R. H. - Gene regulation in



Drosophila mulleri, D. arizonensis, and their hybrids:
The nucleolar organizer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
74: 3498-3502, 1977.

BICUDO, H. E. M. C. & RICHARDSON, R. H. - Morphological and
Developmental Studies of Drosophila mulleri, D. arizo-
nensis and their hybrids. Biol. Zbl., 97: 195-203,
1978.

BIRNSTIEL, M. L., WALLACE, H., SIRLIN, J. L. & FISCHBERG, M. -
Localization of the ribosomal DNA complements in the
nucleolar organizer region of Xenopus laevis. Nat.
Cancer Inst. Monograph., 23: 431-447, 1966a.

BIRNSTIEL, M. L., CHIPCHASE, M. I. H. & HYDE, B. B. - The
nucleolus as a source of ribosomes. Biochim. Biophys.
Acta, 76: 454-462, 1966b.

BIRNSTIEL, M., SPEIRS, J., PURDOM, I., JONES, K. & LOENING, U.
E. - Properties and composition of the isolated
ribosomal DNA satellite of Xenopus laevis. Nature,
219: 454-463, 1968.

BIRNSTIEL, M. L. & GRUNDSTEIN, M. - The ribosomal cistrons of
eukaryotes-a model system for the study of evolution
of serially repeated genes. FEBS Symposium, 23: 349-
365, 1972.

BLOOM, S. E. & GOODPASTURE, C. - An improved technique for
selective silver staining of nucleolar organizer
regions in human chromosomes. Hum. Genet., 34: 199-
206, 1976.

BOUGOURD, S. M. & PARKER, J. S. - Nucleolar-organizer polymorphism
in natural populations of Allium schoenoprasum.
Chromosoma, 56: 301-307, 1976.

BRAMWELL, M. E. & HANDMAKER, S. D. - Ribosomal RNA synthesis in



- human-mouse hybrid cells. Biochim. Biophys. Acta, 232: 580-583, 1971.
- BRIDGES, C. B. and BREHME, K. S. - The Mutants of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washington Publication. Washington, DC, 1944.
- BROWN, D. D. & GURDON, J. B. - Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51: 139-146, 1964.
- BROWN, S. W. & NUR, U. - Heterochromatic chromosomes in the coccids. Science, 145: 130-136, 1964.
- BROWN, D. D. & DAWID, I. B. - Specific gene amplification in oocytes. Science, 160: 272-280, 1968.
- BROWN, D. D. & WEBER, C. S. - Gene linkage by RNA/DNA hybridization. Unique DNA sequences homologous to 4 S RNA, 5 S RNA and ribosomal RNA. J. Mol. Biol., 34: 661-680, 1968.
- BROWN, D. D. & BLACKLER, A. W. - Gene amplification proceeds by a chromosome copy mechanism. J. Mol. Biol., 63: 75-83, 1972.
- BROWN, D. D. WENSINK, P. C. & JORDAN, E. - A comparison of the ribosomal DNA's of Xenopus laevis and Xenopus mulleri: the evolution of tandem genes. J. Mol. Biol., 63: 57-73, 1972.
- BYNUM, J. W. & VOLKIN, E. - Wasting of 18 S ribosomal RNA by human myeloma cells cultured in adenosine. J. Cell. Physiol., 88: 197-206, 1976.
- BYNUM, J. W., REGAN, J. D. & VOLKIN, E. - RNA synthesis and processing as a measure of phenotypic variability in cytodifferentiation and neoplasia. J. Cell. Physiol., 91: 1-14, 1977.

- CARSON, H. L. - The unit of genetic change in adaptation and speciation. Ann. Missouri Bot. Gard., 63: 210-223, 1976.
- CASSIDY, D. M. & BLACKLER, A. W. - Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus Xenopus. Develop. Biol., 41: 84-96, 1974.
- COOKE, P. - Non-random participation of chromosomes 13, 14 and 15 in acrocentric associations. Humangenetik, 13: 309-314, 1971.
- CROCE, C. M., TALAVERA, A., BASILICO, C. & MILLER, O. J. - Suppression of the production of mouse 28 S ribosomal RNA in mouse-human hybrids segregating mouse chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 694-697, 1977.
- CROUSE, H. V., GERBI, S. A., LIANG, C. M., MAGNUS, L. & MERCER, I. M. - Localization of ribosomal DNA within the proximal heterochromatin of Sciara coprophila (Diptera, Sciaridae). Chromosoma, 64: 305-318, 1977.
- CROW, J. F. - Cross fertility and isolating mechanisms in the Drosophila mulleri group. Univ. of Texas Publ., 4228: 53-67, 1942.
- CULLIS, C. A. & DAVIES, D. R. - Ribosomal DNA amounts in Pisum sativum. Genetics, 81: 485-492, 1975.
- DA CUNHA, A. B., PAVAN, C., MORGANTE, J. S. & GARRIDO, M. C. - Studies on cytology and differentiation in Sciaridae II. DNA redundancy in salivary gland cells of Hybosciara fragilis (Diptera, Sciaridae). Genetics, 61: (Suppl.), 335-349, 1969.
- DANIELS, S. B., EHRLMAN, L. & PERELLE, I. B. - Hybrid Inviability: A third reproductive isolating mechanism in the Droso-



- phila paulistorum species-complex. Biol. Zbl., 96: 385-406, 1977.
- DAS, N. K., MICOU-EASTWOOD, J., RAMAMURTHY, G. & ALFERT, M. - Sites of synthesis and processing of ribosomal RNA precursors within the nucleolus of Urechis caupo eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67: 968-975, 1970.
- DAWID, I. B., BROWN, D. D. & REEDER, R. H. - Composition and structure of chromosomal and amplified ribosomal DNAs of Xenopus laevis. J. Mol. Biol., 51: 341-360, 1972.
- DEMEREK, M. and KAUFMANN, B. P. - Drosophila Guide. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.
- DE ROBERTIS, E. D. P., SAEZ, F. A. & DE ROBERTIS, E. M. F., JR. - Cell Biology. Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1975.
- DESSEN, E. M. B. & PERONDINI, A. L. P. - Evidence of hormonal control of the nucleolar activity in Sciara ocellaris. Cell Differentiation, 5: 275-282, 1976.
- DITTES, H., KRONE, W., BROSS, K., SCHMID, M. & VOGEL, W. - Biochemical and cytogenetic studies on the nucleolus organizer regions (NORs) of man. Humangenetik, 26: 47-59, 1974.
- DOERSCHUG, E. B., MIKSCHE, J. P. & STERN, H. - DNA variation and ribosomal - DNA constancy in two Crepis species and the interspecific hybrid exhibiting nucleolar - organizer suppression. Heredity, 37: 441-450, 1976.
- DURICA, D. S. & KRIDER, H. M. - Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific Drosophila hybrids. I. Nucleolar dominance. Develop. Biol., 59: 62-74, 1977.
- DURICA, D. S. & KRIDER, H. M. - Studies on the ribosomal RNA



- cistrons in interspecific Drosophila hybrids. II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. Genetics, 89: 37-64, 1978.
- EIGENBROD, J. - Differences in the number of nucleolus organizers in Chironomus tepperi shown by in situ hybridization. Chromosoma, 67: 63-66, 1978.
- ELICEIRI, G. L. & GREEN, H. - Ribosomal RNA synthesis in human - mouse hybrid cells. J. Mol. Biol., 41: 253-260, 1969.
- ENDOW, S. A. & GALL, J. G. - Differential replication of satellite DNA in polyploid tissues of Drosophila virilis. Chromosoma, 50: 175-192, 1975.
- ESPONDA, P. & GIMÉNEZ-MARTÍN, G. - Cytochemical aspects of the nucleolar organizer in Allium cepa microspores. Chromosoma, 45: 203-213, 1974.
- ESPONDA, P. & GIMÉNEZ-MARTÍN, G. - Nucleolar organizer ultrastructure in Allium cepa. Chromosoma, 52: 73-87, 1975.
- EVANS, D. & BIRNSTIEL, M. - Localization of amplified ribosomal DNA in the oocyte of Xenopus laevis. Biochem. Biophys. Acta, 166: 274-276, 1968.
- EVANS, H. J., BUCKLAND, R. A. & PARDUE, M. L. - Location of the genes coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma, 48: 405-426, 1974.
- EVGENEV, M. B. - The pattern of polytene chromosome conjugation and crossing-over in interspecific hybrids of Drosophila. Theoretical and Applied Genetics, 41: 249-254, 1971.
- EVGENEV, M. B. & SIDOROVA, N. V. - Genetic regulation of chromosome behaviour in interspecific hybrids of Dro-

- sophila. Theoretical and Applied Genetics, 48: 55-61, 1976.
- FAUST, J., VOGEL, W. - Are "N - bands" selective staining of specific heterochromatin? Nature, 249: 352-353, 1974.
- FELLOWS, D. P., and HEED, W. B. - Factors affecting host plant selection in desert-adapted cactiphilic Drosophila. Ecology, 53: 850, 1972.
- FERGUSON-SMITH, M. A. - The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. Cytogenetics, 3: 124-134, 1964.
- FERGUSON-SMITH, M. A. & HANDMAKER, D. - Observations on satellited human chromosomes. Lancet, 1: 638-640, 1961.
- FERREIRA, A., LOMBARDO, L. A. & ROCHA, G. P. - Heterocromatina constitutiva (banda C) e regiões organizadoras do nucléolo (bandas NOR) em Eneoptera surinamensis de Geer (Orthoptera-Grylloidea-Eneopterinae). Ciência e Cultura (Supl.), 30: 510, 1978.
- FISCHBERG, M. & WALLACE, H. - A mutation with reduces nucleolar number in Xenopus laevis. In: The Cell Nucleus. University of Cambridge. 30-40, 1960.
- FLAVELL, R. B., SMITH, D. B. - Variation in nucleolar organizer rRNA gene multiplicity in wheat and rye. Chromosoma, 47: 327-334, 1974.
- FRAISSE, J., LAURENT, C., COLLARD, N., BIEMONT, M. CL. & DUTRILLAUX, B. - Un deuxième exemple de fusion télomérique de deux chromosomes X. Ann. Génét., 18: 243-245, 1975.
- FUNAKI, K., MATSUI, S. & SASAKI, M. - Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N - banding technique. Chromosoma, 49:

357-370, 1975.

- GALL, J. G. - Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 553-560, 1968.
- GALL, J. G. - The genes for ribosomal RNA during oogenesis. Genetics, 61 (Suppl.): 121-132, 1969.
- GALL, J. G. & PARDUE, M. L. - Formation and detection of RNA/DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 378-383, 1969.
- GALL, J. G., MACGREGOR, H. C. & KIDSTON, M. E. - Gene amplification in the oocytes of Dytiscid water beetles. Chromosoma, 26: 169-187, 1969.
- GALL, J. G. & PARDUE, M. L. - Nucleic acid hybridization in cytological preparations. In Methods in Enzymology, 21. Edit. L. Grossman & K. Moldave. Academic Press, New York. 470-480, 1971.
- GAREN, A., KAUVAR, L. & LEPESANT, J. A. - Roles of ecdysone in Drosophila development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5099-5103, 1977.
- GARTLER, S. M. & ANDINA, R. J. - Mammalian X-chromosome inactivation. Genetics, 7: 99-140, 1976.
- GEHRING, W. J. - Developmental genetics of Drosophila. Ann. Rev. Genet., 10: 209-252, 1976.
- GERBI, S. A. - Localization and characterization of the ribosomal RNA cistrons in Sciara coprophila. J. Mol. Biol., 58: 499-511, 1971.
- GILLESPIE, D., SPIEGELMAN, S. - A quantitative assay for DNA/RNA hybrids with DNA immobilised on a membrane. J. Mol. Biol., 12: 829-842, 1965.
- GLOVER, D. M. & HOGNESS, D. S. - A novel arrangement of the 18 S



- and 28 S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster r DNA. Cell, 10: 167-176, 1977.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. - Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma, 53: 37-50, 1975.
- HÄGELE, K. - DNS - Replikationsmuster der Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomiden. Chromosoma, 31: 91-138, 1970.
- HÄGELE, K. - N-banding in polytene chromosomes of Chironomus and Drosophila. Chromosoma, 63: 79-88, 1977.
- HEED, W. B. - XIII. An attempt to detect hybrid matings between D. mulleri and D. aldrichi under natural conditions. Univ. of Texas Publ., 5721: 182-185, 1957.
- HEED, W. B., RUSSELL, J. & WARD, B. L. - Host specificity of cactiphilic Drosophila in the Sonoran Desert. Drosophila Inform. Serv., 43: 94-96, 1968.
- HENDERSON, A. S. & RITOSSA, F. - On the inheritance of r DNA of magnified bobbed loci in D. melanogaster. Genetics, 66: 463-473, 1970.
- HENDERSON, A. S., WARBURTON, D. & ATWOOD, K. C. - Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 69: 3394-3398, 1972.
- HENDERSON, A. S., WARBURTON, D. & ATWOOD, K. C. - Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature, 245: 95-97, 1973.
- HENDERSON, A. S., WARBURTON, D. & ATWOOD, K. C. - Localization of r DNA in the chimpanzee (Pan troglodytes) chromosome complement. Chromosoma, 46: 435-441, 1974a.
- HENDERSON, A. S., EICHER, E. M., YU, M. T., ATWOOD, K. C. - The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse.

- Chromosoma, 49: 155-160, 1974b.
- HENNIG, W. & MEER, B. - Reduced polyteny of ribosomal RNA cistrons in giant chromosomes of Drosophila hydei.
Nature New Biol., 233: 70-72, 1971.
- HENNIG, W., LINK, B. and LEONCINI, O. - The location of the nucleolus organizer regions in Drosophila hydei.
Chromosoma, 51: 57-63, 1975.
- HESS, O. - Genetics of Drosophila hydei Sturtevant. In The Genetics and Biology of Drosophila. Vol. 1c. Edit. M. Ashburner & E. Novitsk. Academic Press London. 1343-1363, 1976.
- HOCHMAN, B. - The fourth chromosome of Drosophila melanogaster. In The Genetics and Biology of Drosophila. Vol. 1b. Edit. M. Ashburner & E. Novitski. Academic Press London. 903-928, 1976.
- HONJO, T. & REEDER, R. H. - Preferential transcription of Xenopus laevis ribosomal RNA in interspecies hybrids between Xenopus laevis and Xenopus mulleri. J. Mol. Biol., 80: 217-228, 1973.
- HOWELL, W. M., DENTON, T. E. & DIAMOND, J. R. - Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia, 31: 260-262, 1975.
- HOWELL, M. - Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with r RNA transcribed from oocyte chromosomes. Chromosoma, 62: 361-367, 1977.
- HSU, T. C., SPIRITO, S. E., PARDUE, M. L. - Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes.
Chromosoma, 53: 25-36, 1975.
- HUGHES, M. & KAMBYSELLIS, M. P. - Effects of ecdysone on RNA synthesis. Drosophila Inf. Serv., 45: 102, 1970.

- JOHNSON, W. R., JR. - Chromosome variation in natural populations of Drosophila mojavensis. MS Thesis, Department of Biological Sciences, University of Arizona, Tucson, 1973.
- JOHNSON, L. D., HENDERSON, A. S. & ATWOOD, K. C. - Location of the genes for 5S RNA in the human chromosome complement Cytogenet. Cell Genet., 13: 103-105, 1974.
- KABACK, D. B. & HALVORSON, H. O. - Magnification of genes coding for ribosomal RNA in Sacharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 1177-1180, 1977.
- KAUFMANN, B. P. & GAY, H. - The capacity of the fourth chromosome of Drosophila melanogaster to establish end - to - end contacts with the other chromosomes in salivary gland cells. Chromosoma, 26: 395-409, 1969.
- KEEP, E. - Amphiplasty in Ribes. Nature, 188: 339, 1960.
- KEEP, E. - Satellite and nucleolar number in hybrids between Ribes nigrum and R. grossularia and in their backcrosses. Can. J. Genet. Cytol., 4: 206-218, 1962.
- KEYL, H.-G. - A demonstrable local and geometric increase in the chromosomal DNA of Chironomus. Experientia, 21: 191-193, 1965.
- KOMMA, D. J. - Effect of sex transformation genes on glucose -6- phosphate dehydrogenase activity in Drosophila melanogaster. Genetics, 54: 497-503, 1966.
- KRIVSHENKO, J. - New evidence for the homology of the short euchromatic elements of the X and Y chromosomes of Drosophila busckii with the microchromosome of Drosophila melanogaster. Genetics, 44: 1027-1040, 1959.
- LEFÈVRE, G., JR. - A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of Droso-

- phila melanogaster salivary glands. In The Genetics and Biology of Drosophila. Vol. 1a. Edit. M. Ashburner & E. Novitski. Academic Press London. 32-66, 1976.
- LEVIS, R. & PENMAN, S. - Processing steps and methylation in the formation of the ribosomal RNA of cultured Drosophila cells. J. Mol. Biol., 121: 219-238, 1978.
- LEWIN, B. - Gene Expression - 2. Eucaryotic Chromosomes. John Wiley & Sons. London, 1974.
- LIMA-DE-FARIA, A., BIRNSTIEL, M & JAWORSKA, H. - Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of Acheta. Genetics, 61: Suppl. 145-159, 1969.
- LIMA-DE-FARIA, A., JAWORSKA, H. & GUSTAFSSON, T. - Release of amplified ribosomal DNA from the chromosomes of Acheta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 80-83, 1973.
- LOENING, U. E., JONES, K. W. & BIRNSTIEL, M. L. - Properties of the ribosomal RNA precursor in Xenopus laevis; comparison to the precursor in mammals and in plants. J. Mol. Biol., 45: 353-366, 1969.
- LYON, M. F. - X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. Biol. Rev., 47: 1-35, 1972.
- MACGREGOR, H. C. - The role of lampbrush chromosomes in the formation of nucleoli in amphibian oocytes. Quart. J. micr. Sci., 106: 215-228, 1965.
- MACGREGOR, H. C., KEZER, J. - The chromosomal localization of a heavy satellite DNA in the testis of Plethodon c. cinereus. Chromosoma, 33: 167-182, 1971.
- MACGREGOR, H. C., WALKER, M. H. - The arrangement of chromosomes in nuclei of sperm from plethodontid salamanders. Chromosoma, 40: 243-262, 1973.
- MACGREGOR, H. C., VLAD, M. & BARNETT, L. - An investigation of



- some problems concerning nucleolus organizers in salamanders. Chromosoma, 59: 283-299, 1977.
- MADEN, B. E. H. - Ribosomal genes dissected. Nature, 272: 580-581, 1978.
- MARONI, G. & PLAUT, W. - Dosage compensation in Drosophila melanogaster triploids. I. Autoradiographic study. Chromosoma, 40: 361-377, 1973.
- MARRAKECHI, M. - Etude d'un mutant bobbed ayant une quantité normale d' ADN ribosomal. Molec. Gen. Genet., 135: 213-229, 1974.
- MARSHALL, C. J., HANDMAKER, S. D. & BRAMWELL, M. E. - Synthesis of ribosomal RNA in synkaryons and heterokaryons formed between human and rodent cells. J. Cell. Sci., 17: 307-325, 1975.
- MARTIN, G. R., EPSTEIN, C. J., TRAVIS, B., TUCKER, G., YATZIV, S., MARTIN JR., D. W., CLIFT, S. & COHEN, S. - X-chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro. Nature, 271: 329-333, 1978.
- MATSUDA, K & SIEGEL, A. - Hybridization of plant ribosomal RNA to DNA: the isolation of a DNA component rich in ribosomal RNA cistrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58: 673-680, 1967.
- MATSUI, S. - Nucleolus organizer of Vicia faba chromosomes revealed by the N-banding technique. Japan J. Genet., 49: 93-96, 1974a.
- MATSUI, S. - Structural proteins associated with ribosomal cistrons in Xenopus laevis chromosomes. Exp. Cell Res., 88: 88-94, 1974b.
- MATSUI, S. - A note on constitutive heterochromatin in Drosophi-



- la melanogaster chromosomes. Japan J. Genet., 49: 171-173, 1974c.
- MATSUI, S. & SASAKI, M. - Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature, 246: 148-150, 1973.
- MCCLINTOCK, B. - The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. Z. Zellforsch., 21: 294-328, 1934.
- MELLO, M. L. S. - Heterocromatina. Ciência e Cultura, 30: 290-303, 1978.
- MERMOD, J. J., JACOBS-LORENA, M & CRIPPA, M. - Changes in rate of RNA synthesis and ribosomal gene number during oogenesis of Drosophila melanogaster. Develop. Biol., 57: 393-402, 1977.
- METTLER, L. E. - Studies on Experimental Populations of Drosophila arizonensis and D. mojavensis. Univ. of Texas Publ., 5721: 157-185, 1957.
- METTLER, L. E. - Drosophila mojavensis baja, a new form of the mulleri complex. Drosophila Inform. Serv., 38: 57-58, 1963.
- MILLER, O. L. JR. & BEATTY, B. R. - Extrachromosomal nucleolar genes in amphibian oocytes. Genetics. (Suppl.), 61: 133-143, 1969.
- MILLER, L. & BROWN, D. D. - Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. Chromosoma, 28: 430-444, 1969.
- MILLER, L. & GURDON, J. B. - Mutations affecting the size of the nucleolus in Xenopus laevis. Nature, 227: 1108-1110, 1970.
- MILLER, L. & KNOWLAND, J. - Reduction of ribosomal RNA synthesis

- and ribosomal RNA genes in a mutant of Xenopus laevis which organizes only a partial nucleolus. II. The number of ribosomal RNA genes in animals of different nucleolar types. J. Mol. Biol., 53: 329-338, 1970.
- MILLER, D. A., DEV, V. G., TANTRAVAH, R. & MILLER, O. J. - Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrid cells. Exp. Cell Res., 101: 235-243, 1976a.
- MILLER, J. O., MILLER, D. A., DEV, V. G., TANTRAVAH, R. & CROCE, C. M. - Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 4531-4535, 1976b.
- MILLER, D. A., TANTRAVAH, R., DEV, V. G., & MILLER, O. J. - Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. Am. J. Human Genet., 29: 490-502, 1977.
- MUKHERJEE, A. S. & CHATTERJEE, S. N. - Chromosomal basis of dosage compensation in Drosophila. VIII. Faster replication and hyperactivity of both arms of the X-chromosome in males of Drosophila pseudoobscura and their possible significance. Chromosoma, 53: 91-105, 1975.
- MULLER, H. J. & HERSKOWITZ, H. - Concerning the healing of chromosome ends produced by breakage in Drosophila melanogaster. Am. Naturalist, 88: 177-208, 1954.
- MULLEY, J. C. & BARKER, J. S. F. - The occurrence and distribution of Drosophila aldrichi in Australia. Drosophila Inf. Serv., 52: 151-152, 1977.

- NAGLE, J. J. - Increase in genetic variability through interspecific hybridization between Drosophila mojavensis and Drosophila arizonensis. Bull. N. J. Acad. Sci., 14: 23-28, 1969.
- NAGLE, J. J. & METTLER, L. E. - Relative fitness of introgressed and parental populations of Drosophila mojavensis and D. arizonensis. Evolution, 23: 519-524, 1969.
- NICOLETTI, B. - An efficient method for salivary gland chromosome preparations. Drosophila Inf. Serv., 33: 181-182, 1959.
- OHNO, S. - The preferential activation of maternally derived alleles in development of interspecific hybrids. In Heterospecific genome interaction, Edit. U. Defendi. Winstar Institute Press, Philadelphia. 137-150, 1969.
- PARDUE, M. L. - Localization of repeated DNA sequences in Xenopus chromosomes. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 38: 475-482, 1974.
- PARDUE, M. L., GERBI, S. A., ECKHARDT, R. A. & GALL, J. G. - Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. Chromosoma, 29: 268-290, 1970.
- PARDUE, M. L., BROWN, D. D. & BIRNSTIEL, M. L. - Location of the genes for 5S ribosomal RNA in Xenopus laevis. Chromosoma, 42: 191-203, 1973.
- PARDUE, M. L. & HSU, T. C. - Locations of 18 S and 28 S ribosomal genes in the chromosomes of the Indian Muntjac. J. Cell Biol., 64: 251-254, 1975.
- PATTERSON, J. T. - The Drosophilidae of the southwest. Univ. of Texas Publ., 4313: 7-216, 1943.
- PATTERSON, J. T. - Sexual isolation in the mulleri subgroup. In

- "Studies in the Genetics of Drosophila". V. Isolating mechanisms. Univ. of Texas Publ., 4720: 32-40, 1947.
- PATTERSON, J. T. & CROW, J. F. - XII. Hybridization in the mulleri group of Drosophila. Univ. of Texas Publ., 4032: 251-256, 1940.
- PATTERSON, J. T. & WAGNER, R. P. - Geographical distribution of species of the genus Drosophila in the United States and Mexico. Univ. of Texas Publ., 4313: 217-281, 1943.
- PATTERSON, J. T. & ALEXANDER, M. L. - Drosophila wheeleri, a new member of mulleri subgroup. Univ. of Texas Publ., 5204: 129-136, 1952.
- PATTERSON, J. T. & STONE, W. S. - Evolution in the genus Drosophila. The Macmillan Company. New York, 1952.
- PERONDINI, A. L. P. - Estudo citológico e autorradiográfico dos cromossomos politênicos de Bradysia tritici (Coquillett, 1895 ~~1975~~). Tese de Doutorado, Departamento de Biologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, 1968.
- PERRY, R. P. - The nucleolus and the synthesis of ribosomes. Nat. Cancer Inst. Monogr., 18: 325-340, 1965.
- PERRY, R. P. - Regulation of ribosome content in eukaryotes. Bioch. Soc. Symp., 37: 105-116, 1973.
- PERRY, R. P., CHEN, T. T., FRED, J. J., GREENBERG, J. R., KELLEY, D. E. & TARTOF, K. D. - Evolution of the transcription unit of ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65: 609-616, 1970.
- PHILLIPS, S. G., PHILLIPS, D. M. - Sites of nucleolus productions in cultured Chinese hamster cells. J. Cell Biol., 40: 248-268, 1969.



- PHILLIPS, R. L., KLEESE, R. A. & WANG, S. S. - The nucleolus organizer region of maize (Zea mays L.): Chromosomal site of DNA complementary to ribosomal RNA. Chromosoma, 36: 79-88, 1971.
- RAGGHIANI, M., BUCCI-INNOCENTI, S. & MANCINO, G. - An ammoniacal silver staining technique for mitotic chromosomes of Triturus (Urodela: Salamandridae). Experientia, 33: 1319-1321, 1977.
- RAMEL, C. & VALENTIN, J. - The genetic control of chromosome segregation in Drosophila melanogaster. Hereditas, 87: 163-172, 1977.
- RENKAWITZ, R. & KUNZ, W. - Independent replication of the ribosomal RNA genes in the polytrophic - meroistic ovaries of Calliphora erythrocephala, Drosophila hydei, and Sarcophaga barbata. Chromosoma, 53: 131-140, 1975.
- RICHARDSON, R. H. & SMOUSE, P. E. - Patterns of Molecular Variation. I. Interspecific Comparisons of Electromorphs in the Drosophila mulleri Complex. Bioch. Genetics, 14: 447-466, 1976.
- RITOSSA, F. M. - Unstable redundancy of genes for ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 509-516, 1968.
- RITOSSA, F. M. & SPIEGELMAN, S. - Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53: 737-745, 1965.
- RITOSSA, F. M., ATWOOD, K. C. & SPIEGELMAN, S. - A molecular explanation of the bobbed mutants of Drosophila as partial deficiencies of "ribosomal" DNA. Genetics, 54: 819-834, 1966.
- RITOSSA, F., MALVA, C., BONCINELLI, E., GRAZIANI, F. & POLITO, L.



- The first steps of magnification of DNA complementary to ribosomal RNA in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68: 1580-1584, 1971.
- ROBERTS, P. A. - Df (1) 260-1 is not a terminal deficiency. Drosophila Inform. Serv., 44: 192, 1969.
- ROBERTS, P. A. - In support of the telomere concept. Genetics, 80: 135-142, 1975.
- ROBERTS, P. A. - The genetics of chromosome aberration. In: The Genetics and Biology of Drosophila. Vol. 1a. Edit. M. Ashburner & E. Novitski. Academic Press London. 67-184, 1976.
- RUIZ, I. R. G., SOMA, M. & BEÇAK, W. - Estudo comparativo entre os padrões de bandas AgAs e bandas C em anfíbios poliploides do gênero Odontophrynus. Ciência e Cultura (Supl.), 30: 550, 1978.
- RUTTER, W. J., PICTET, R. L. & MORRIS, P. W. - Toward molecular mechanisms of developmental processes. Ann. Rev. Bioch., 42: 601-646, 1973.
- SALADINO, C. F. & NORTON, A. - Rate of RNA synthesis as a function of temperature in Chinese hamster lung fibroblasts (V-79). Exp. Cell Res., 103: 423-426, 1976.
- SANDLER, L. M. & NOVITSKI, E. - Evidence for genetic homology between chromosomes 1 and 4 in Drosophila melanogaster, with a proposed explanation for the crowding effect in triploids. Genetics, 41: 189-193, 1956.
- SCHÄFER, V & KUNZ, W. - Evidence for a second nucleolus organizer on the Y chromosome of Drosophila hydei. Genetics, 77: (Suppl.) 1: 58, 1974.
- SCHÄFER, V. & KUNZ, W. - Two separated nucleolus organizers on the Drosophila hydei Y chromosome. Molec. Gen. Genet., 137: 365-368, 1975.

- SCHMID, M. KRONE, W. & VOGEL, W. - On the relationship between the frequency of association and the nucleolar constriction of individual acrocentric chromosomes. Humangenetik, 23: 267-277, 1974.
- SCHWARZACHER, H. G., MIKELSAAR, A.-V. & SCHNEDL, W. - The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet. Cell Genet., 20: 24-39, 1978.
- SEECOF, R. L., KOPLAN, W. D. & FUTCH, D. G. - Dosage compensation for enzyme activities in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62: 528-535, 1969.
- SHAW, M. W., CRAIG, A. P., RICCIUTI, F. C. - Random association of human acrocentric chromosomes. Amer. J. human Genet., 21: 513-515, 1969.
- SHERMOEN, A. W. & KIEFER, B. I. - Regulation in r DNA - deficient Drosophila melanogaster. Cell, 4: 275-280, 1975.
- SINCLAIR, J. H. & BROWN, D. D. - Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. Biochemistry, 10: 2761-2769, 1971.
- SINCLAIR, J. H., CARROLL, C. R. & HUMPHREY, R. R. - Variation in r DNA redundancy level and nucleolar organizer length in normal and variant lines of the Mexican exolotl. J. Cell Sci., 15: 239-257, 1974.
- SINHA, A. K., PATHAK, S. & NORA, J. J. - Fusion of two apparently intact human X chromosomes. Genetics, 32: 295-300, 1976.
- SLATER, D. W. & SPIEGELMAN, S. - An estimation of genetic messages in the unfertilized echinoid egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56: 164-170, 1966.

- SPEAR, B. B. - The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Chromosoma, 48: 159-179, 1974.
- SPEAR, B. B. & GALL, J. G. - Independent control of ribosomal gene replication in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 1359-1363, 1973.
- SPEIRS, J. & BIRNSTIEL, M. - Arrangement of the 5,8 S RNA cis-trons in the genome of Xenopus laevis. J. Mol. Biol., 87: 237-256, 1974.
- STAHL, A., LUCIANI, J. M., DEVICTOR, M., CAPODANO, A. M. & GAGNÉ, R. - Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. Humangenetik, 26: 315-327, 1975.
- STOCK, A. D. & HSU, T. C. - Evolutionary conservatism in arrangement of genetic material. A comparative analysis of chromosome banding between the Rhesus Macaque (2n=42, 84 arms) and the African Green Monkey (2n=60, 120 arms). Chromosoma, 43: 211-224, 1973.
- STURTEVANT, A. H. - The classification of the genus Drosophila with description of nine new species. Univ. of Texas Publ., 4213: 5-51, 1942.
- SÜSS, R., KINZEL, V. & SCRIBNER, J. D. - Cancer-Experiments and Concepts. Springer - Verlag. New York, 1973.
- SZABO, P., ELDER, R., STEFFENSEN, D. M. & UHLENBECK, O. L. - Quantitative in situ hybridization of ribosomal RNA species to polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol., 115: 539-563, 1977.
- TADEI, W. P. - Estudos citológicos em populações experimentais de Drosophila prosaltans e Drosophila saltans. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1974.
- TADEI, W. P. - Estudo cromossômico, do isolamento reprodutivo e do estado-de-ser-adaptado de populações experimentais de Drosophila prosaltans e Drosophila saltans. Tese

de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1977.

- TANTRAVAH, R., MILLER, D. A., DEV, V. G. & MILLER, O. J. - Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. Chromosoma, 56: 15-27, 1976.
- TARTOF, K. D. - Increasing the multiplicity of ribosomal RNA genes in Drosophila melanogaster. Science, 171: 294-297, 1971.
- TARTOF, K. D. - Regulation of ribosomal RNA gene multiplicity in Drosophila melanogaster. Genetics, 73: 57-71, 1973.
- TARTOF, K. D. - Unequal mitotic sister chromatid exchange as the mechanism of ribosomal RNA magnification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 1272-1276, 1974.
- TARTOF, K. D. & PERRY, R. P. - The 5 S RNA genes of Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol., 51: 171-183, 1970.
- TIEPOLO, L., DIAZ, G. & LAUDANI, U. - Differential DNA synthesis in homologous regions of hybrid polytenic chromosomes. Chromosoma, 45: 81-89, 1974.
- VARLEY, J. M. - Patterns of silver staining of human chromosomes. Chromosoma, 61: 207-214, 1977.
- WALLACE, H. & BIRNSTIEL, M. L. - Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. Biochim. Biophys. Acta, 114: 296-310, 1966.
- WALLACE, H. & LANDRIDGE, W. H. R. - Differential amphiplasty and the control of ribosomal RNA synthesis. Heredity, 27: 1-13, 1971.
- WALTHERS, B. T., PICTET, R. L., DAVID, J. D. & RUTLER, W. J. - On the mechanism of 5-bromodeoxyuridine inhibition of exocrine pancreas differentiation. J. Biol. Chem.,

249: 1953-1964, 1974.

WARBURTON, D., ATWOOD, K. C. & HERDERSON, A. S. - Variation in the number of genes for r RNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. Cytogenet. Cell Genet., 17: 221-230, 1976.

WASSERMAN, M. - Cytological studies of the Repleta group. Univ. of Texas Publ., 5422: 130-152, 1954.

WASSERMAN, M. - Cytological and phylogenetic relationships in the repleta group of the Genus Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46: 842-859, 1960.

WASSERMAN, M. - Cytological studies of the Repleta group of the genus Drosophila: V. The mulleri subgroup. Univ. of Texas Publ., 6205: 85-117, 1962.

WEINMANN, R. - Regulation of ribosomal RNA and 5 S RNA synthesis in Drosophila melanogaster: I. Bobbed mutants. Genetics, 72: 267-276, 1972.

WHARTON, L. T. - Analysis of the metaphase and salivary chromosome morphology within the genus Drosophila. Univ. of Texas Publ., 4313: 282-319, 1943.

WHITE, R. L. & HOGNESS, D. S. - R loop mapping of the 18S and 28S sequences in the long and short repeating units of Drosophila melanogaster. Cell, 10: 177-192, 1977.

WHITELEY, A. H., MCCARTHY, B. J. & WHITELEY, H. R. - Changing populations of messenger RNA during sea urchin development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55: 519-525, 1966.

WILKINSON, J. - The cytology of Salix in relation to its taxonomy. Annals of Botany, 8: 269-284, 1944.

WILSON, A. C., MAXSON, L. R. & SARICH, V. M. - Two types of



molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 2843-2847, 1974.

WIMBER, D. E., DUFFEY, P. A., STEFFENSEN, D. M., & PRENSKY, W. - Localization of the 5S RNA genes in Zea mays by RNA/DNA hybridization "in situ". Chromosoma, 47: 353-359, 1974.

WOODLAND, H. R., FORD, C. C., GURDON, J. B. & LANE, C. D. - Some characteristics of gene expression as revealed by a living assay system. In Molecular Genetics and Developmental Biology. Ed. M. Sussman. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 393-423, 1972.

WRIGHT, T. R. F. - The genetics of embryogenesis in Drosophila. Advances in Genetics, 15: 261-395, 1970.



