

N. M. Stevens y el descubrimiento de los cromosomas sexuales

La cuestión de la determinación del sexo seguía centrando el interés de las investigaciones morfológicas en los primeros años del siglo XX. Las publicaciones de McClung (1902) sobre el cromosoma accesorio, la difusión de la teoría de la herencia mendeliana (1900) y la hipótesis de Boveri-Sutton (1902), que establecía que los cromosomas eran los portadores físicos de los factores mendelianos de la herencia, proporcionaron nuevas direcciones a las investigaciones morfológicas. Hacia 1905, las técnicas utilizadas para las preparaciones microscópicas habían mejorado notablemente, de forma que las observaciones eran cada vez más nítidas y fiables. Terminaron entonces de comprenderse los fenómenos citológicos que tenían lugar durante la formación de los gametos: la reducción del número de cromosomas mediante el apareamiento de los mismos en parejas de homólogos durante la primera división meiótica.

Las investigaciones morfológicas en torno al tema de la determinación del sexo tuvieron especial relevancia en el grupo de investigadores e investigadoras que se reunían durante los veranos en el *Marine Biological Laboratory* de Woods Hole (Mass.). Prueba de ello es que la mayor parte de las referencias bibliográficas recopiladas corresponden al *Biological Bulletin*, publicación periódica ligada a este laboratorio marino. En él se desarrollaron las técnicas citológicas aprendidas gracias a las becas disfrutadas en la Estación Zoológica de Nápoles, y se aplicaron a la observación microscópica de todo tipo de animales, y especialmente, de las células reproductoras de los insectos.

Fueron las investigaciones citológicas en relación con las diferencias sexuales de los insectos las que llevaron a constatar la existencia de unos cromosomas particulares, que pronto serían llamados “cromosomas sexuales”. Además, quizás no por casualidad, fueron dos personas relacionadas con T. H. Morgan, su alumna y colaboradora Nettie Maria Stevens y su colega y amigo Edmund Beecher Wilson, quienes describieron de forma precisa, simultánea e independientemente, las diferencias cromosómicas entre las células femeninas y masculinas de diferentes especies de insectos: N. M. Stevens en el coleóptero *Tenebrio molitor* y E. B. Wilson en el hemíptero *Anasa tristis*.

Pero la observación no era ya suficiente en 1905. La cuestión clave en este momento era demostrar, si era posible, que las diferencias cromosómicas eran la razón causal de la aparición de uno u otro sexo en los individuos. Esto, que sería la primera prueba de una relación entre cromosomas y caracteres individuales, se correspondería con la hipótesis de Boveri y Sutton de la herencia cromosómica. N. M. Stevens, especializada en citología y más cercana a las ideas mendelianas, estableció la relación entre la constitución cromosómica de las células y el sexo del individuo. Por el contrario, E. B. Wilson, que desarrolló su carrera entre la citología y la embriología, más cercano a la perspectiva fisiológica de la embriología experimental, consideró que las características sexuales podrían deberse a diferencias en el grado o intensidad de la actividad cromosómica, pero no a diferencias cualitativas entre los cromosomas. Por su parte, T. H. Morgan no aceptó inicialmente la explicación de Stevens, pero las investigaciones que comenzó en 1910 sobre la herencia ligada al sexo en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* acabaron por convencerle de que esta interpretación era la más adecuada. N. M. Stevens, que estudió los cromosomas sexuales en más de 38

especies de insectos, investigó entre ellas el g. *Drosophila*, y desarrolló las técnicas de fijación y tinción que se utilizarían más tarde en el famoso laboratorio de Morgan.

Los trabajos de Stevens y Wilson eran continuación de una larga serie de investigaciones microscópicas sobre las células reproductoras desarrolladas durante más de cincuenta años. Tras el descubrimiento del cromosoma accesorio y la hipótesis de McClung de su relación con el sexo del individuo, el descubrimiento de una pareja de heterocromosomas que daba lugar a dos tipos de espermatozoides constituyó un paso decisivo. El papel del cromosoma accesorio o cromosoma X no pudo comprenderse hasta la publicación de los trabajos de N. M. Stevens (1906) en los que comparaba las especies con determinación del sexo XX/X0 y las del tipo XX/XY¹.

Biografía de una investigadora del cambio de siglo

Nettie Maria Stevens (1861-1912) nació en Cavendish (Vermont, EE. UU.), y fue la tercera de los cuatro hijos del matrimonio entre Julia Adams y Ephraim Stevens. Su madre murió en 1863, y en 1865 su padre se casó con Ellen C. Thompson, trasladándose la familia a Westford poco después. Su padre era carpintero y trabajaba como jornalero en distintos oficios manuales; desde 1870 tuvo un contrato con el ayuntamiento de Westford que proporcionó una cierta estabilidad económica a la familia, consiguiendo tener casa propia y algunas tierras. En 1892 hubo un gran incendio que afectó a las propiedades de la familia Stevens, y poco después decidieron trasladarse a Chelmsford.

Nettie Maria recibió su primera educación en la escuela pública de Westford, donde figuró en los “cuadros de honor” entre los 9 y los 11 años. Más tarde hizo estudios secundarios en la Westford Academy, un centro que incluía entre sus reglas fundacionales de 1792 que la escuela sería “libre para cualquier nacionalidad, edad o sexo”, siendo así que en la promoción de 1880 de un total de once estudiantes, tres fueron mujeres, incluyendo a Nettie y su hermana Emma. En el mismo centro, poco antes de la entrada de Nettie, había trabajado como profesor Charles Otis Whitman, a quien conocería más tarde en el MBL. A continuación, Stevens se graduó como maestra en la Westfield Normal School, donde estudió cuatro cursos en dos años (1881-1883). En cuanto obtuvo la titulación, trabajó durante tres trimestres como profesora de latín, inglés, matemáticas, fisiología y zoología en la escuela superior de Lebanon (New Hampshire). El curso siguiente fue profesora en la Minot’s Corner School de Westford,

¹ Un estudio preliminar de las investigaciones de N. M. Stevens recibió en 1999 el “Premio Concepción Gimeno de Flaquer” del Seminario Interdisciplinar de Estudios de la Mujer (universidad de Zaragoza). Ha sido publicado como: Delgado, I. Nettie Maria Stevens y la función de los cromosomas sexuales. *Cronos*. 2000; 3 (2):239-271. Sobre Nettie Maria Stevens ver también: Brush, S. G. Nettie M. Stevens and the Discovery of Sex Determination by Chromosomes. *Isis*. 1978; 69(247):162-172. Ogilvie, M. B. Nettie Maria Stevens. En: Grinstein (1997), *op. cit.*, pp. 517-523. Maienschein, J. Stevens, Nettie Maria. En: Coulston Gillispie, C. (ed.). *Dictionary of Scientific Biography* (1990), pp. 867-869. Ogilvie, M. B. Stevens, Nettie Maria. En: Ogilvie (1993), *op. cit.*, pp. 167-169. Ogilvie, M. B.; Choquette, C. J. Nettie Marie Stevens (1861-1912): Her Life and Contributions to Cytogenetics. *Proceedings of the American Philosophical Society*. 1981; 125:292-311. Ris, H. Nettie Maria Stevens. En: James, E. T. et al. (eds.). *Notable American Women*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press; 1971, pp. 372-373.

y en 1885 entró en la Westford Academy. En el resumen del curso 1884-85 de la Minot's aparece un comentario sobre su marcha a un nuevo puesto de trabajo: "Mientras lo lamentamos por nosotros, nos alegramos de ver a Miss Stevens en una posición más acorde con sus capacidades". Hasta 1893 tuvo asimismo un contrato como administradora de la Biblioteca Pública de Westford, y a partir del traslado de la familia a Chelmsford, trabajó algún tiempo en la Biblioteca Pública con un contrato a tiempo parcial. En 1895 fue contratada como profesora en el Howe School, un colegio privado de Billerica (Massachussets).

Con el fin de realizar estudios superiores, en septiembre de 1896 Nettie Maria Stevens cruzó el país y se estableció en California. Se matriculó en la Leland Stanford University, una universidad que tenía fama de innovadora y representaba una oportunidad para quienes tenían un verdadero interés en los estudios. Nettie Maria entró en Standford como estudiante especial, matriculada en fisiología, alemán, geología, química y botánica. En abril de 1897 fue admitida en el *Advanced Standing* como alumna de Frank Mace MacFarland, quien contribuyó a centrar su interés en la histología. En 1899 obtuvo su título de bachiller, y en 1900 terminó la licenciatura. Mientras estudiaba en la Standford University, Stevens pasó los veranos en el Hopkins Seaside Laboratory de Pacific Grove (California), el segundo laboratorio marino norteamericano, donde trabajaba el Dr. MacFarland como investigador e instructor. Allí acudía también Jacques Loeb, a quien conoció Stevens durante estas estancias. Ella realizó en este laboratorio investigaciones histológicas y citológicas, y en el verano de 1900 estuvo preparando su tesis de licenciatura, que constituyó su primera publicación, "*Studies on Ciliate Infusoria*"². El mismo año publicó los resultados de dos experimentos de regeneración en *Planaria* y *Tubularia* y un estudio sobre el nervio gastrocnémico de la rana.

Nettie Maria Stevens entró en el Bryn Mawr College en 1900 como estudiante de doctorado, obteniendo en 1903 su PhD. El Bryn Mawr College, en Pasadena (California), contó entre sus profesores con dos destacados biólogos: E. B. Wilson y T. H. Morgan; aunque Wilson se había ido a la Universidad de Columbia en 1891, Morgan permaneció como profesor en el Bryn Mawr de 1891 a 1904. Siendo estudiante de doctorado, y más tarde colega de Morgan, Stevens tuvo la oportunidad de entrar en contacto con las investigaciones más atractivas del momento, las cuales producían avances muy rápidos en los campos de la citología, la embriología y la genética. Los tres años de estancia de Stevens en el Bryn Mawr fueron enormemente fructíferos: realizó nueve trabajos de investigación, que trataban principalmente sobre la regeneración en diferentes organismos, antes de terminar su tesis doctoral, que versó sobre diversos tipos de Protozoos³. Durante estos años, Stevens fue candidata a diferentes premios y becas, obteniendo para el curso 1901-02 la concedida por el Bryn Mawr, que le permitió estudiar en la Estación Zoológica de Nápoles y en el Instituto Zoológico de la Universidad de Würzburg. Durante su estancia en Alemania, Stevens trabajó con Theodor Boveri, que por entonces era catedrático de zoología y anatomía

² Stevens, N. M. *Studies on Ciliate Infusoria*. *Proceedings of the California Academy of Science*. 1901;3:1-42.

³ Stevens, N. M. *Further Studies on the Ciliate, Infusoria, Licnophora and Boveria*. Ph. D. diss. Bryn Mawr College, 1903. Ref. en Brush (1978), *op. cit.*, p. 164. El desarrollo de la protozoología con métodos microscópicos y químicos fue de gran importancia en el progreso de la teoría celular. El trabajo de Stevens sobre el proceso de regeneración de *Licnophora* y *Boveria* amplió los conocimientos obtenidos en otros grupos, sobre todo celentéreos y planarias.

comparada de la Universidad de Würzburg e investigaba en temas relacionados con la ovogénesis y espermatogénesis, la fecundación y la herencia, y especialmente sobre el comportamiento de los cromosomas durante la división celular.

Terminado el doctorado, Stevens dudaba entre esperar hasta obtener una beca para poder dedicarse enteramente a la investigación, como era su deseo, o aceptar un trabajo de profesora en el Bryn Mawr que le aseguraría el sueldo que le era indispensable. Pero el Bryn Mawr, como el resto de los *colleges*, no proporcionaba fondos ni tiempo libre a sus profesoras o profesores para dedicarse a tareas de investigación. En julio de 1903, Stevens envió una carta a la Institución Carnegie de Washington solicitando una beca de investigación, en la que indicaba claramente lo que se proponía investigar y la necesidad que tenía de medios económicos:

“La presidenta Thomas del Bryn Mawr College me sugirió hace algún tiempo que solicitara una de las becas de la Institución Carnegie para que continuara mi trabajo de investigación en lugar de dedicarme a la enseñanza en el próximo año, pero considerando mis condiciones financieras pensé que era mejor solicitar un puesto docente. Las plazas de biología para mujeres en el college parecen ser, en todo caso, muy escasas, y querría saber si todavía hay alguna beca para concederse este año. He estado haciendo trabajo de investigación durante cuatro años y preferiría continuar haciéndolo en lugar de dedicarme a la enseñanza si no fuera por cuestión de dinero, pero dependo de mis propios medios para vivir y he gastado prácticamente todo lo que había ahorrado cuando trabajaba de profesora antes de comenzar mis estudios universitarios hace siete años. Estoy especialmente interesada en el aspecto histológico de los problemas de la herencia relacionados con la Ley de Mendel, y sé que se necesita gran cantidad de arduo trabajo en esta línea. Hasta ahora mi trabajo de investigación ha versado sobre dos nuevas especies de protozoos, problemas de regeneración, ovogénesis y espermatogénesis de *Sagitta* y *Planaria lugubris*. Oí rumores antes de marcharme de Mass. sobre un centro de investigación en el que los miembros recibían un salario y dedicaban su tiempo a la investigación. Esto es exactamente lo que me gustaría, una oportunidad para dedicar mi tiempo al trabajo de investigación, y libre de la ansiedad sobre la cuestión económica”⁴

Stevens repitió su solicitud en noviembre, presentando cartas de eminentes zoólogos y profesores, entre las que se contaban las de Morgan y Wilson que, como los demás, recomendaron de forma entusiasta a Stevens para la beca. La confianza de Morgan en ella se reflejaba claramente en sus planes de trabajo, ya que pensaba investigar con ella sobre el comportamiento de los cromosomas en los áfidos. En su carta de recomendación, Morgan decía:

“Por sugerencia mía Miss N. M. Stevens ha hecho una solicitud a la Institución Carnegie para una beca de investigación, y yo deseo apoyar con la mayor fuerza posible su concesión. De los estudiantes de graduado que he tenido durante los últimos doce años, no he tenido ninguno más capaz e independiente en el trabajo de investigación que Miss Stevens, y ahora que ella tiene su titulación está dedicando todo su trabajo a la investigación. Miss Stevens no solamente tiene preparación, sino que posee además el talento natural que creo que es mucho más difícil de encontrar. Tiene una mente independiente y original y hace de principio a fin cualquier cosa que se proponga. Temo decir más a fin de que no pueda parecer que sobrestimo el caso. He comenzado una investigación en colaboración con Miss Stevens que tardará un año o más en estar terminada si podemos trabajar juntos, lo que será imposible desde enero si Miss Stevens

⁴ Carta de N. M. Stevens a la Institución Carnegie el 19/7/1903. *Cfr.* Brush (1978), *op. cit.*, pp. 170-171; algunos fragmentos también se reproducen en Ogilvie & Choquette (1981), *op. cit.*, pp. 299-300.

no obtiene la beca que solicita (...) Espero que la importancia de las cuestiones involucradas, tanto como la aptitud especial de Miss Stevens para la investigación, prevalecerán en la Institución Carnegie al considerar su solicitud favorablemente. Es también de la mayor importancia para mí tener a alguien trabajando conmigo en este problema, y no conozco a nadie tan adecuado para realizar un trabajo de este tipo como Miss Stevens”⁵.

En marzo de 1904, Stevens recibió finalmente notificación oficial de la Institución Carnegie concediéndole la beca de investigación postdoctoral. Gracias a ella continuó investigando en el Bryn Mawr sin tener que ocuparse de tareas docentes, y pudo dedicarse en 1904 y 1905 a su investigación sobre los cromosomas sexuales. Como requisito para la beca, tuvo que mandar un informe y resumen de la investigación a la Institución Carnegie, en el cual Stevens se refirió al trabajo realizado en colaboración con Morgan, parte del cual había sido realizado en el Hopkins Laboratory. En 1905 Stevens obtuvo el premio Ellen Richards ofrecido por la *Naples Table Association for Promoting Laboratory Research by Women* (NTA), por su investigación sobre las células germinales de los pulgones⁶. En el verano de 1905 Stevens recogió y preparó material en Harpswell (Maine) y Woods Hole (Massachusetts), y durante los años siguientes analizó e interpretó este material en los laboratorios del Bryn Mawr College. Durante toda su vida siguió vinculada al Laboratorio de Biología del Bryn Mawr, aunque entre 1908-9 estuvo trabajando en Würzburg con Boveri. Su agradecimiento al Bryn Mawr quedó expresado en el testamento que escribió cuatro años antes de morir:

“Con ocasión de un viaje a Europa hago estas declaraciones de mis deseos en relación con mis propiedades en caso de mi fallecimiento. Mis instrumentos científicos, libros y papeles, deseo que sean dados al Departamento de Biología del Bryn Mawr College, como muestra de mi aprecio por las becas que he recibido del College”⁷.

En 1910, Stevens consideró la posibilidad de dejar el Bryn Mawr, y escribió a Davenport, de la Estación Experimental de Cold Spring Harbor:

“He estado pensando durante algún tiempo si hacer pronto un cambio, bien para trabajar desde la perspectiva citológica en cooperación con alguien que esté realizando trabajo experimental en genética, si me quedo aquí, bien para intentar asegurar un puesto en citología en conexión con el trabajo en genética”⁸

⁵ Carta de recomendación de Morgan a la Institución Carnegie (19/11/1903). *Cfr.* Brush (1978), *op. cit.*, pp.171-172.

⁶ El premio “Ellen Richards”, llamado así en recuerdo de una de las mujeres más activas de la NTA, consistía en una beca de 1,000 \$ (prácticamente el salario de un año) para disfrutar de una de las mesas de trabajo de la Estación Zoológica de Nápoles. La asociación fue fundada en 1897 por Ida Henrietta Hyde y M. Carey Thomas (presidenta del *Bryn Mawr College*) con el fin de ayudar a las jóvenes investigadoras norteamericanas; el premio era financiado mediante las aportaciones de varias mujeres, que contribuían con 50 \$ cada una. A partir de 1901, la NTA reservó asimismo un puesto de investigación para mujeres en el MBL. El trabajo por el que N. M. Stevens obtuvo el premio (fechado el 20/12/1904) fue publicado en agosto de 1905: Stevens, N. M. A Study of the Germ Cells of *Aphis rosae* and *Aphis oenotherae*. *J. Exper. Zool.* 1905; II: 313-333.

⁷ *Cfr.* Ogilvie & Choquette (1981), *op. cit.*, p. 303.

⁸ Carta a Davenport, 10 de mayo de 1910. Documento de la “*American Philosophical Society*”. *Cfr.* Ogilvie & Choquette (1981), *op. cit.*, p. 302.

Stevens era consciente de que en el Bryn Mawr no había posibilidad de realizar experimentos genéticos, e insistía en la importancia de yuxtaponer la citología y la experimentación. Preguntó a Davenport si existía alguna posibilidad de este tipo con un salario razonable, pidiéndole que no comentara que le había hecho esta pregunta, ya que no deseaba que se supiera que estaba considerando la posibilidad de marcharse del Bryn Mawr. En marzo de 1911, Davenport pudo por fin ofrecerle un puesto en la estación de Cold Spring Harbor, ya que quedaba vacante un puesto de investigación en citología. Sin embargo, Stevens tuvo que rechazarlo, pues ya había firmado en el Bryn Mawr un contrato por tres años.

La situación de Stevens en el Bryn Mawr había mejorado a finales de 1910, ya que su presidenta, M. Carey Thomas, le había ofrecido un aumento de sueldo y le había prometido un puesto de profesora para dos años después. En 1912, efectivamente, la dirección del Bryn Mawr creó para ella una plaza de profesora investigadora. Estas plazas eran muy escasas en aquel momento, y solamente eran creadas para algunas profesoras concretas por parte de sus amigas o familiares mejor situadas. En el caso de N. M. Stevens significaba un notable reconocimiento a su trabajo, y fue debido sobre todo a las investigaciones realizadas para la Institución Carnegie. Sin embargo, Nettie Maria Stevens no pudo llegar a ocupar esta plaza, porque moriría poco después (el 4 de mayo de 1912), como consecuencia de un cáncer de mama, en el Johns Hopkins Hospital de Baltimore.

Nettie Maria Stevens recibió estímulo y apoyo de las instituciones científicas mientras era una estudiante aventajada que realizaba sus primeras investigaciones (1900-1905), pero no obtuvo un reconocimiento o una recompensa material por los resultados de su trabajo. El Bryn Mawr College tardó bastante en reconocer la importancia de esta bióloga, como señalaba en febrero de 1913 la necrológica del Stanford Alumnus, publicación periódica de la Leland Stanford University. Esta falta de reconocimiento puede explicarse parcialmente por el hecho de que su contribución más brillante, el descubrimiento de la existencia y significado de los cromosomas sexuales, no pudiera apreciarse hasta muchos años después de su muerte, cuando los conocimientos de genética hubieron avanzado lo suficiente. Durante el periodo en que ella realizaba sus investigaciones, se empezaban a explorar las relaciones entre los cromosomas y la herencia, pero la teoría mendeliana no se había confirmado aún citológicamente. E. B. Wilson nunca reconoció completamente la función genética de los cromosomas sexuales, y sólo mucho después fue aceptada por T. H. Morgan. Sin embargo, en la necrológica de Stevens, Morgan (1912) escribía:

“Miss Stevens hizo una contribución en un descubrimiento de importancia y su nombre será recordado por esto cuando las minucias de las detalladas investigaciones que ella ha realizado hayan llegado a incorporarse al cuerpo central del tema en estudio”⁹

En su breve carrera científica (1903-1912), Nettie Maria Stevens publicó al menos 41 artículos, la mayoría de ellos en el campo de la citología y la embriología experimental. Su principal contribución a la biología, la relación entre el sexo y la presencia de cromosomas particulares, sólo pudo ser entendida completamente en el contexto de los estudios genéticos que se desarrollaron más tarde. Pero, además de sus importantes descubrimientos científicos, Stevens hizo una aportación singular: hizo saber que había numerosas mujeres trabajando en el campo de la investigación

⁹ Morgan, T. H. The Scientific Work of Miss N. M. Stevens. *Science*. N. s. 36 (No. 928):468. Cfr. Ogilvie & Choquette (1981), *op. cit.*, p. 292.

biológica, al menos en los Estados Unidos. En sus escritos, Stevens puso especial cuidado en hacer ver que no era la primera ni estaba sola, con una voluntad expresa de hacer visibles a otras investigadoras con las que estuvo en relación, ya fuera como alumna, profesora o colega. A través de ella los nombres y trabajos de mujeres como A. M. Boring, H. Randolph, H. D. King y M. Carey Thomas tomaron un nuevo significado.

Las primeras investigaciones de Nettie Maria Stevens

Los primeros trabajos de N. M. Stevens fueron descripciones básicas de la morfología y fisiología de protozoos y animales sencillos, y hasta 1909 continuó publicando experimentos sobre desarrollo embrionario y regeneración en platelmintos, nematodos y equinodermos. En 1903 publicó su primera investigación sobre células reproductoras, un estudio de la ovogénesis y espermatogénesis en el gusano hermafrodita *Sagitta bipunctata*, publicando desde entonces al menos 24 trabajos sobre los cromosomas de las células sexuales en una gran variedad de especies animales, generalmente insectos.

Durante su primera estancia en la Estación Zoológica de Nápoles (1901-1902), Nettie Maria Stevens participó con el profesor alemán Theodor Boveri en algunas de las investigaciones más interesantes del momento. Tal era el estudio citológico de la gametogénesis en diversos invertebrados marinos, tema al que Boveri dedicaba gran parte de sus investigaciones. Stevens comenzó allí su primer estudio sobre la ovogénesis y la espermatogénesis en *Sagitta*, una investigación que continuaría en años posteriores¹⁰. Este animal marino, perteneciente al *phylum* de los Quetognatos, tenía una longitud de unos pocos centímetros, y su estudio microscópico se veía facilitado por tener un tegumento completamente transparente. El propio Boveri, como antes O. Hertwig (1880), había comenzado el estudio de esta especie, pero la doble división nuclear que tenía lugar durante la formación de los gametos no estaba completamente aclarada. La primera publicación de Stevens sobre *Sagitta* (1903) contribuyó al esclarecimiento de algunas de las cuestiones fundamentales referentes a estas divisiones, llamadas “de maduración”. Stevens confirmó que el número de cromosomas de los espermatoцитos era 9, como había observado Boveri, y que eran la mitad de los que tenían las espermatogonias (18). En su estudio de la ovogénesis del mismo animal (publicado en 1905), Stevens estableció los mismos números respectivamente para ovocitos y ovogonios, y observó que mientras la primera división separaba cromosomas emparejados, en la segunda los cromosomas se partían longitudinalmente.

Aunque no se sabe exactamente cuándo Stevens empezó a estar interesada por la relación entre los cromosomas y la determinación del sexo, la cuestión de la relación entre herencia y morfología estaba en su mente en 1903 cuando se dirigió a la Institución Carnegie solicitando una beca. En la carta de solicitud, Stevens explica sus intenciones:

¹⁰ Stevens, N. M. a) On the Ovogenesis and Spermatogenesis of *Sagitta bipunctata*. *Zoologische Jahrbücher*. 1903; 18:227-240. b) Further studies on the Ovogenesis of *Sagitta*. *Zool. Jahrb.* 1905; 21: 243-252. c) Further Studies on Reproduction in *Sagitta*. *J. Morphol.* 1910; 21:279-319. Los resultados de los estudios de Stevens sobre *Sagitta* constituyeron el punto de partida para las investigaciones del español Manuel Bordás Celma sobre el mismo animal, realizadas entre 1911 y 1920.

“Estoy especialmente interesada en el aspecto histológico de los problemas de la herencia relacionados con la ley de Mendel, y sé que se necesita gran cantidad de arduo trabajo en esta línea”¹¹

T. H. Morgan, en su carta de recomendación para la Institución Carnegie, expone de esta manera la investigación que está realizando con N. M. Stevens y lo que ella se propone hacer:

“La cuestión de los factores que determinan el sexo de los huevos es lo que estoy ahora desarrollando rápidamente y promete dar resultados de gran importancia, no sólo de interés teórico sino también práctico. Nuestro primer problema será examinar las condiciones que parecen causar en los áfidos la aparición de machos y hembras (en contraste con las formas partenogenéticas) por cambios en la alimentación. Yo estoy realizando la parte experimental del trabajo, y Miss Stevens está examinando al mismo tiempo los cambios internos en los huevos (el origen de los huevos, el número de corpúsculos polares formados, el número de cromosomas presente en los machos, las hembras y las formas partenogenéticas, junto con la cuestión de las divisiones reduccionales). Al mismo tiempo, Miss Stevens se propone examinar en otras formas más adecuadas el llamado cromosoma accesorio que aparece en óvulos y células espermáticas, y su posible relación con el sexo”¹²

Ciertamente Stevens y Morgan habían empezado en 1903 a trabajar juntos en el Byrn Mawr, y la carta de Morgan especifica que ella estaba interesada en investigar la determinación del sexo en relación con los cromosomas, mientras él contemplaba la cuestión bajo un enfoque ambientalista y experimental. Las diferencias en la perspectiva no impidieron la colaboración entre Morgan y Stevens, y posiblemente el desacuerdo fue a la larga beneficioso para Stevens, en el sentido de que pudo llevar a cabo sus investigaciones independientemente y publicar los resultados solamente con su nombre. Como el historiador S. G. Brush (1978) ha señalado, si el nombre de Morgan hubiera aparecido en la publicación de 1905, el mundo científico le habría dado a él, indudablemente, la mayor parte del reconocimiento, y el nombre de Stevens habría quedado más oculto todavía para la historia¹³.

El descubrimiento de los cromosomas sexuales X e Y

Durante el periodo que duró la beca que le concedió la Institución Carnegie (1904-5), Stevens realizó dos investigaciones transcendentales para la cuestión de la determinación del sexo: la primera sobre áfidos (pulgones) y la segunda sobre coleópteros (escarabajos). En el trabajo que realizó con Morgan sobre los áfidos, Stevens se encargó de los estudios citológicos, mientras el trabajo de cría experimental lo llevaron a cabo entre los dos. Los experimentos con los animales vivos, que intentaban demostrar cómo los cambios en las condiciones externas de temperatura o alimentación podían afectar a la determinación del sexo, dieron unos resultados inciertos. En contraste, las detalladas investigaciones citológicas de Stevens en las células germinales de los mismos animales, al ser planteadas de forma comparativa, proporcionaron unos datos más concluyentes que la mayoría de las investigaciones anteriores. En este trabajo, terminado a finales de 1904, Stevens no pudo localizar el

¹¹ Carta de N. M. Stevens a la Institución Carnegie. *Cfr.* Brush (1978), *op. cit.*, p. 170.

¹² Carta de T. H. Morgan a la Institución Carnegie. *Cfr.* Brush (1978), *op. cit.*, pp. 171-172.

¹³ Acerca de la sombra que los grandes nombres arrojan sobre los coetáneos, y para el caso concreto de N. M. Stevens y otras mujeres científicas, ver Brush (1978), *op. cit.*, p. 166.

cromosoma extra de McClung, aunque en las revisiones de los mismos materiales que realizó en 1909 descubrió un heterocromosoma impar en los machos que en las hembras tenía su correspondiente pareja (según el esquema hembras XX/ machos X0)¹⁴. En cualquier caso, en 1904 la revisión de las investigaciones anteriores le había convencido de que existía suficiente base para creer que el sexo estaba determinado en el huevo, aunque aún no se hubiera dado una explicación totalmente convincente.

Stevens continuó sus investigaciones examinando los cromosomas de espermatozoides y óvulos de muchos insectos y comparando, mediante cría experimental, con el sexo de los descendientes. En los estudios que realizó con *Tenebrio molitor* (un coleóptero muy común, conocido como *gusano o escarabajo de la harina*) tampoco encontró el cromosoma accesorio, pero tuvo más suerte que con los pulgones, ya que hizo un descubrimiento trascendental: localizó en los machos una pareja de heterocromosomas, que no tenían el mismo tamaño, y que al separarse en la meiosis originaban dos tipos de espermatozoides; estos cromosomas se llamarían posteriormente X e Y o “cromosomas sexuales”. Estas investigaciones, publicadas en forma de monografía de la Institución Carnegie en 1905¹⁵, presentaban la novedad de considerar por primera vez una *pareja de cromosomas* en relación con el sexo, mientras hasta el momento sólo se había reconocido *un* cromosoma (el “cromosoma accesorio” de McClung) que pudiera diferenciar dos tipos de espermatozoides. Lógicamente, las primeras investigaciones en las que se buscaba el “cromosoma accesorio” o cromosoma extra (X) sólo podían tener éxito cuando la especie tenía una determinación del sexo del tipo XX/X0 (como la estudiada por McClung), mientras en las especies del tipo XX/XY no se distinguían los dos tipos de espermatozoides, ya que estos no se diferenciaban en el número de cromosomas, sino en tener un cromosoma un poco más grande o más pequeño. En *Tenebrio molitor*, los espermatozoides que por fecundación daban lugar a los machos tenían un cromosoma Y claramente mucho más pequeño que el correspondiente cromosoma X de los espermatozoides que producían hembras, y esto hizo que fuera posible distinguirlos. Además de acertar con una especie adecuada para este estudio, otro rasgo permitió a Stevens descubrir la existencia de cromosomas sexuales: ella buscaba diferencias cromosómicas durante la formación de los gametos como base morfológica que pudiera relacionarse con el sexo, mientras que otras investigaciones trataban solamente de describir el número y comportamiento de los cromosomas en la meiosis, o bien buscaban un cromosoma extra o desaparejado. En cuanto a la metodología, fue aportación de Stevens la introducción de la cría experimental de las larvas y la observación de los cromosomas en células somáticas de ambos sexos, de forma que pudo hacer comparaciones con los cromosomas observados en las células espermáticas y en los óvulos. Así pues, si, como hemos visto, la primera descripción de un cromosoma desaparejado corresponde a Henking (1891) y la hipótesis de una relación entre cromosomas y sexo fue formulada por primera vez por McClung (1902), de igual manera debe reconocerse a Nettie Maria Stevens (1905) la primera descripción de los cromosomas sexuales X e Y.

Después de sus experimentos con *Tenebrio molitor*, Stevens siguió examinando otras especies. En 1906 publicó un estudio comparativo en una segunda monografía de

¹⁴ Los trabajos citados son: Stevens, N. M. a) A Study of the Germ Cells of *Aphis rosae* and *Aphis oenotherae*. *J. Exp. Zool.* 1905; 2:313-333. b) An Unpaired Heterochromosome in the Aphids. *J. Exp. Zool.* 1909; 6(1):115-123.

¹⁵ Stevens, N. M. *Studies in Spermatogenesis with Special Reference to the “Accessory Chromosome”*. Washington D.C.: Carnegie Inst. 1905; Pub. 36.

la Institución Carnegie; en él exponía los resultados de sus estudios sobre 36 especies de coleópteros, una de hemípteros homópteros y dos de lepidópteros. Entre los coleópteros, el 85,7 % de las especies tenían un par desigual de heterocromosomas en las células germinales masculinas, mientras en el 14,3 % de ellas existía un cromosoma extra. En sus conclusiones sobre los coleópteros dice:

“En todos estos insectos los espermatozoides son distintivamente dimórficos, formando dos clases iguales, una de las cuales o bien contiene un cromosoma más pequeño o bien le falta un cromosoma”¹⁶

No encontró ninguna excepción, por lo que consideró que había suficiente base para afirmar que un huevo fecundado por un espermatozoide del primer tipo debía desarrollarse como hembra, mientras que un huevo fecundado por uno del otro tipo debía producir un macho. Stevens proporcionó una hipótesis de trabajo dentro del contexto teórico de su comunidad de referencia, pero sugirió una interpretación claramente mendeliana, lo que ayudó a la convergencia posterior entre el enfoque citológico y las teorías de la herencia. A pesar de su extensa base experimental, fue cauta al hacer una interpretación del posible significado fisiológico de los cromosomas sexuales que sobrepasara el modelo teórico aceptado hasta el momento, pues consideraba que eran necesarios muchos datos para poder llegar a una conclusión general:

“Si estos heterocromosomas deben verse como cromosomas sexuales en el sentido de que ambos representen caracteres sexuales y determinen el sexo, no se puede decir sin datos más concluyentes (...) No tenemos seguridad de que tengamos razón al atribuir los caracteres sexuales a estos cromosomas particulares o de hecho a ningún cromosoma. Parece, en cualquier caso, una conclusión razonable de acuerdo con los hechos observados (...) En conjunto, la primera teoría, que trae la cuestión de la determinación del sexo bajo la Ley de Mendel en una forma modificada, parece más de acuerdo con los hechos y abre una esperanza de que en un futuro próximo sea posible formular una teoría general de la determinación del sexo”¹⁷

Las investigaciones de Stevens, como las de Wilson, indicaban claramente que los heterocromosomas jugaban un importante papel en relación con el sexo, pero no daban una “prueba crucial” para la teoría de la determinación cromosómica del sexo, como ambos reconocían. Hasta ese momento, en el campo de la citología, donde se mantenían las ideas de la embriología epigenética, se reconocía la importancia de los cromosomas, pero sin relacionarlos con las teorías mendelianas de la herencia, y cualquier teoría que implicara la existencia de “partículas hereditarias” (un planteamiento que recordaba al *preformacionismo*) era duramente atacada. Sin embargo, tras el trabajo de Stevens se produjo un cierto cambio en las posiciones de la comunidad científica, y empezó a considerarse la posibilidad de que los cromosomas fueran *causa* de la determinación del sexo. Calvin B. Bridges, uno de los colaboradores de Morgan, reconocía en 1916 que el conocimiento de la herencia proporcionado por el análisis mendeliano, junto con la genética experimental y la investigación citológica

¹⁶ Stevens, N. M. *Studies in Spermatogenesis. Part II. A Comparative Study of the Heterochromosomes in Certain Species of Coleoptera, Hemiptera, and Lepidoptera, with Especial reference to Sex Determination.* Washington D. C.: Carnegie Inst. 1906. Pub. 36 (2), p.53.

¹⁷ *Id.*, pp. 55-56.

habían conducido a la conclusión de que los cromosomas debían verse “como mediadores, y no como consecuencia, de la herencia de los caracteres y del sexo”¹⁸.

Investigaciones sobre los áfidos

Desde la primera investigación sobre la familia de los pulgones, iniciada en colaboración con Morgan y publicada en 1905, Stevens volvió sobre los áfidos en varias ocasiones. Tenemos constancia de la publicación de al menos cinco artículos sobre los cromosomas sexuales y la herencia en este grupo de insectos (1905, 1906, 1907, 1909 y 1910), en los cuales llegó a establecer claramente el tipo de determinación cromosómica del sexo que presentaban.

Los estudios sobre los áfidos planteaban una dificultad especial, debido a que estos insectos (junto con los filoxéridos) presentan reproducción partenogenética alternando con la reproducción sexual con fecundación. Los huevos que producen las hembras mediante partenogénesis pueden dar lugar sólo a hembras (más frecuentemente) o a hembras y machos (generación sexual, sólo en determinadas circunstancias). Cuando aparece una generación de hembras y machos y se produce cópula, las hembras ponen huevos fecundados que, tras un periodo de reposo (que suele coincidir con el invierno) darán lugar a la siguiente generación de hembras partenogenéticas. Este ciclo de reproducción era bien conocido cuando N. M. Stevens comenzó sus primeros estudios. Pero, puesto que el nacimiento de hembras exclusivamente o de individuos de los dos sexos suele presentar en las latitudes medias una periodicidad anual (de los “huevos de primavera” nacen solo hembras, y de los “huevos de verano” nace la generación sexual), lo más inmediato era suponer que la producción de los sexos estaría determinada por factores ambientales. Este fue el planteamiento de Morgan, igual que el de muchos otros investigadores.

Stevens planteó el estudio de los áfidos desde un punto de vista netamente citológico. Estudió preparaciones de ovarios y testículos, observando las células en las diferentes fases de la gametogénesis, y las comparó con células de embriones femeninos y masculinos, realizando en lo posible el recuento del número de cromosomas y registrando las características de su morfología. Aunque en los estudios de la espermatogénesis que publicó en 1906 y 1907 no había encontrado ningún tipo de *heterocromosomas*, había observado que uno de los cromosomas del espermatozoido I se encontraba generalmente retrasado con respecto a los demás durante la metafase y anafase¹⁹. En aquel momento interpretó que este cromosoma era bivalente (pareja de homólogos apareados) y que se separaba más tarde que los demás, lo que daría como resultado dos espermatozoidos II con el mismo número de cromosomas en la primera división meiótica. En 1909 Stevens volvió sobre los áfidos, interesada por el descubrimiento que Morgan había hecho en los filoxéridos, donde los espermatozoidos

¹⁸ Bridges, C. B. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics*. 1916; 1:2

¹⁹ En aquel momento, el término “heterocromosomas” se utilizaba para denominar a los cromosomas que presentaban un comportamiento particular durante las divisiones celulares, como una mayor retención de la tinción o un alejamiento del resto de los cromosomas mientras estaban situados en el huso acromático. Este comportamiento fue observado inicialmente en el “cromosoma accesorio”, pero más tarde se encontró en otros cromosomas o grupos de cromosomas, no siempre relacionados con el sexo.

tenían un cromosoma de comportamiento semejante al de los áfidos. Según exponía Morgan en 1908, las células de los embriones femeninos de una de las especies tenían 6 cromosomas, mientras las de los masculinos tenían solamente cinco. Al parecer, el bivalente en cuestión no llegaba a dividirse realmente, sino que pasaba completo a una de las dos células hijas, que recibía así tres, mientras la otra, de menor tamaño, recibía sólo dos. Lo más significativo era que los espermatoцитos II que sólo recibían 2 cromosomas degeneraban, mientras los que tenían 3 cromosomas daban lugar a los espermatozoides, todos del mismo tipo. Esto podía explicar que la fecundación de los óvulos (también con 3 cromosomas) diera lugar exclusivamente a “huevos productores de hembras” (con 6 cromosomas). A la luz de los resultados de Morgan, Stevens decidió revisar sus preparaciones de áfidos:

“Estos hechos, descritos tan claramente para los filoxéridos, eran enormemente oscuros para los áfidos, y hasta que no volví a revisar mi material tres veces no fui capaz de convencerme de que el cromosoma bivalente retardado no se divide en el espermatoцитo I, sino que durante la telofase entra en el mayor de los dos espermatoцитos II, degenerando el menor de ellos más pronto o más tarde”,²⁰

Stevens revisó las preparaciones de 11 especies de áfidos, comparando entre ellas el destino del bivalente retardado durante la primera y la segunda división, llegando a la conclusión de que en ninguna de ellas se producían cuatro espermatozoides con el mismo número de cromosomas, ya que en la división de los espermatoцитos I se producía un reparto desigual. Consideró entonces que tanto los filoxéridos como los áfidos pertenecían a la misma categoría de insectos, descrita por Boring (1907)²¹ y otros autores, en los que había un heterocromosoma impar en los machos (hembras XX/machos X0), con la única, aunque importante, diferencia de que la mitad de los espermatoцитos II degeneraban y quedaba “un solo tipo de espermatozoides –los destinados a unirse con huevos productores de hembras”.

Stevens comprobó que tanto los huevos partenogénéticos como las células embrionarias femeninas contenían un número par de cromosomas “una serie doble completa de cromosomas maternos y paternos”, y, puesto que de las mismas hembras se formaban huevos partenogénéticos “productores de machos”, planteó la cuestión de cómo y cuándo los cromosomas de la generación de hembras partenogénéticas se reducían al número presente en los individuos masculinos. No teniendo pruebas directas, su opinión era que “los dos heterocromosomas debían aparearse antes de la maduración de los huevos productores de machos, y separarse en la mitosis cuando los demás cromosomas se dividían longitudinalmente”. Esto explicaría las observaciones realizadas durante el desarrollo de ciertos huevos partenogénéticos productores de machos, en los que las células tenían 7 cromosomas, mientras las de los huevos productores de hembras tenían 8²². Stevens propuso en este artículo una interpretación sobre la diferenciación sexual, a partir de los datos obtenidos de los embriones nacidos de los huevos partenogénéticos, en la que utilizó el concepto de dominancia mendeliano:

²⁰ Stevens, N. M. An Unpaired Heterochromosome in the *Aphids*. *J. Exp. Zool.* 1909; 6(1):120.

²¹ Boring, A. M. Study of the Spermatogenesis of Twenty-two Species of Membracidae, Jussidae, Cercopidae and Fulgoridae. *J. Exp. Zool.* 1907; 4. Referencia en Stevens (1909).

²² Sólo podía tener seguridad de que se trataba de huevos masculinos o femeninos (productores de machos o de hembras) en aquellas especies en que cada hembra partenogénica ponía uno sólo de los dos tipos de huevos.

“Parecería probable que esos huevos se desarrollaran como machos debido a que un cromosoma femenino dominante ha sido eliminado, y por esa razón solamente, ya que la misma madre partenogénica puede contener embriones de tres tipos: hembras partenogénicas, hembras sexuales y machos, de aproximadamente la misma edad, y por tanto desarrollados bajo las mismas condiciones de temperatura y nutrición. De esta forma, la teoría de Castle (1903) sobre la aparición de machos a partir de insectos partenogénicos llegaría a cumplirse por un método levemente distinto de maduración. Esto nos acercaría un paso más a la conclusión de que el sexo y los caracteres sexuales están realmente representados, al menos en las células sexuales de los insectos, por los heterocromosomas (...) Esta experiencia con las células germinales de los áfidos indica la probabilidad de que pueda existir una diferenciación de los cromosomas que sea determinante del sexo en las células germinales masculinas”²³.

Es interesante comparar esta interpretación con la de McClung para una situación semejante (hembra XX, macho XO). Para McClung es la presencia de un cromosoma “masculino” la que origina la diferenciación de este sexo debido a su “poder masculinizante”. Para Stevens, es la eliminación de un cromosoma femenino dominante el origen de la masculinización. Sin contar con otras informaciones, la interpretación de Stevens resulta más acorde con los datos, ya que ciertamente en esta especie “falta” en los machos uno de los cromosomas que en las hembras forman una pareja, además de corresponder con el análisis mendeliano de la herencia. En contraste, McClung necesitó enrevesados razonamientos para justificar la consideración de “masculino” que concedió al cromosoma desaparejado, hubiera uno más o uno menos que en las hembras.

Hay una cuestión que inquieta a Stevens, apasionada del estudio de las células y, como tal, fascinada por la perfección de su funcionamiento: la de que pueda realizarse de manera habitual una división “imperfecta”, la que tendría lugar en la primera división meiótica de la espermatogénesis de los áfidos. Si es cierto que en esta división el heterocromosoma de los espermatoцитos I se dispone en la placa metafásica como si se fuera a dividir equitativamente, para finalmente no hacerlo y pasar entero a una de las células hijas, tendríamos que

“tanto la célula como el heterocromosoma empiezan a hacer una cosa y finalmente hacen otra bastante diferente. Es difícil no sufrir el impacto de la idea de que se trate de un caso en que el aparato cariocinético esté imperfectamente ajustado a las demandas hechas por la célula en conjunto o por los cromosomas, y que se llegue hasta el final a pesar del imperfecto trabajo del huso acromático. Esta peculiaridad de la primera división de maduración parece que tiene que estar relacionada con el cambio producido desde una reproducción puramente sexual hasta la partenogénesis, incluyendo la supresión de los espermatozoides productores de machos”²⁴.

Nuevas investigaciones con dípteros, coleópteros y ortópteros

En los artículos aparecidos en *The Journal of Experimental Zoölogy* entre 1908 y 1912 podemos comprobar, gracias a las fechas que aparecen junto a la firma, que la publicación de los trabajos de N. M. Stevens era en aquel momento muy rápida (en algunos casos sólo transcurrieron dos meses entre su envío y su publicación). El contraste con lo ocurrido para el artículo de 1904 sobre los áfidos, que tardó ocho meses

²³ Stevens (1909), *op. cit.*, pp. 120-122.

²⁴ Stevens (1909), *op. cit.*, p. 122

en publicarse, además del registro de su participación en congresos y otros datos indirectos, nos permite suponer que en estas fechas Stevens había alcanzado un prestigio profesional considerable, así como valorar el interés que en aquel momento estaban teniendo los estudios citológicos de las diferencias sexuales.

En el trabajo publicado en marzo de 1908 Stevens da cuenta de los resultados de sus investigaciones citológicas sobre nueve especies de dípteros, entre las que se incluye la mosca *Drosophila ampelophila*, primera especie utilizada en los experimentos sobre herencia ligada al sexo realizados por Morgan, Bridges, Sturtevant y Muller. En ellas estudia células germinales masculinas y femeninas procedentes de testículos y ovarios (espermatogonias y espermatocitos, oogonios y células foliculares) y también células somáticas y embrionarias. En cada una de las especies compara los heterocromosomas de los machos (desiguales) con los de las hembras (iguales), comprobando en algunos casos que éstos últimos son del mismo tamaño que el más grande de la pareja de los machos. En estos estudios Stevens encontró que la relación entre los heterocromosomas y los sexos era en los dípteros la misma que en las 36 especies de coleópteros que había estudiado en 1905-6, e igual que en los hemípteros estudiados por Wilson: en todas estas especies los espermatozoides eran dimórficos. Saliendo al paso de otras interpretaciones, Stevens reitera su convencimiento en la relación que tal dimorfismo tiene con los cromosomas, pero admite:

“El material, en cualquier caso, no arroja más luz sobre la cuestión de si los espermatozoides dimórficos son por sí mismos de alguna manera instrumentales en la determinación del sexo en estos insectos; o si el sexo es un carácter llevado en los heterocromosomas y segregado en la maduración de las células germinales de cada sexo”,²⁵

En el siguiente artículo, publicado en junio de 1908, Stevens da cuenta del estudio comparativo realizado con tres especies del g. *Diabrotica* (coleópteros), cuyos resultados había presentado ya un año antes en el Congreso de Zoología de Boston²⁶. Aunque el 85,7 % de las especies de coleópteros estudiadas con anterioridad presentaban un par de heterocromosomas X/Y, las diabróticas tenían un cromosoma desaparejado. Stevens llamó aquí “X” a este cromosoma que no tenía pareja en los machos, asimilándolo a la pareja de heterocromosomas iguales en las hembras (XX). En *D. vittata* encontró además un “nucleolo cromatínico” en las espermátidas y demostró que no era un heterocromosoma, ya que desaparecía gradualmente conforme la espermátida se diferenciaba para formar la cabeza del espermatozoide. Las otras dos especies, características de dos zonas geográficas distintas (costa del Pacífico y costa Este de los EE. UU.), resultaron ser tan semejantes citológicamente como lo eran en su morfología externa. En ellas encontró de 1 a 4 pequeños heterocromosomas adicionales no relacionados con el sexo, a los que llamó “cromosomas supernumerarios”, y estableció una tipología de variantes que tenían una correspondencia entre ambas especies. Por todo ello, Stevens sugirió que las dos especies procedían de la evolución de un antepasado común. En 1912 volvió a estudiar las diabróticas, centrándose esta vez en ejemplares de *Diabrotica soror* recolectados en California, y le sorprendió encontrar muchos menos cromosomas supernumerarios entre los machos examinados: el 79 % de

²⁵ Stevens, N. M. A Study of the Germ Cells of Certain Diptera, with reference to the Heterochromosomes and the phenomena of Synapsis. *J. Exp. Zool.* 1908; 5(3):374.

²⁶ Stevens, N. M. The Chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A Contribution to the Literature on Heterochromosomes and Sex-determination. *J. Exp. Zool.* 1908; 5(4):453-470. Incluye anexo de 3 páginas con sus dibujos y descripciones.

ellos no tenía ninguno (frente al 43-52 % de sus anteriores colecciones), el 20 % tenía sólo uno y el 1 % tenía dos cromosomas de este tipo²⁷. Como explicación del conjunto de hechos observados, supuso que los cromosomas supernumerarios de las diabroticas podían haberse originado por una división transversal del cromosoma X, generalmente equitativa, seguida de una longitudinal en las dos partes.

En este trabajo estudió también las alteraciones que presentaba la proporción entre los sexos, comparando los datos obtenidos en 1907, en 1909 y en 1910. En casi todos los casos los machos eran más abundantes que las hembras, pero las proporciones variaban de 58:25 hasta 107:102, y en los ejemplares recogidos en uno de los lugares, la proporción se invertía hasta 49:76. Stevens relacionó estas variaciones con las condiciones ambientales (suelo, agua, temperatura) de cada uno de los hábitats, y las consideró simplemente ejemplos

“de la interferencia de las condiciones externas en lo que de otra forma sería una igualdad de sexos, o en otras palabras, una desviación de las sex ratio normalmente equivalentes, o parcial exclusión de un sexo por peculiaridades del entorno”²⁸

En el artículo publicado en marzo de 1910, N. M. Stevens estudia los cromosomas de las células germinales de los mosquitos del g. *Culex* a partir de sus larvas y pupas, en las que los ovarios y testículos se encuentran en periodo de desarrollo. La conclusión principal de este trabajo es que en *Culex* no existen heterocromosomas tal como habían sido definidos, pero sí un par desigual de cromosomas pequeños combinados con una pareja de cromosomas iguales más grandes²⁹.

Otro artículo, publicado en el mismo número de la revista, trata del par de heterocromosomas desiguales de las tijeretas del g. *Forficula*, extendiendo así las observaciones a otro grupo de insectos (dermápteros)³⁰. En él discute las afirmaciones de autores anteriores (1895, 1897, 1901) y especialmente las de Zweiger (1906), que encontraba un número variable de cromosomas (24 a 26) en las tijeretas. Stevens trabajó con material recogido en 1909 en Helgoland y Eisenach, y lo preparó y observó en el Instituto Zoológico de Würzburg durante su segunda estancia en Alemania. Como principales resultados, estableció que el número de cromosomas de esta especie era 24 y que existía un par de heterocromosomas desiguales en los machos, como consecuencia de lo cual se producían espermátidas y espermatozoides dimórficos.

El trabajo publicado en 1912 sobre el ortóptero *Ceuthophilus* contiene algunas novedades de gran interés, pues muestra los avances realizados en estos pocos años en la comprensión de los fenómenos hereditarios relacionados con la gametogénesis. En primer lugar hace un estudio de los cromosomas supernumerarios de esta especie, recolectada de nuevo en Bryn Mawr, y establece que el número de cromosomas en los machos es de 37, produciéndose espermatoцитos con 18 bivalentes y el univalente X, además de los supernumerarios cuando existen. Observa que los supernumerarios

²⁷ Stevens, N. M. Further Observations on Supernumerary Chromosomes and Sex Ratios in *Diabrotica soror*. *Biol. Bull.* 1912; 22:231-238.

²⁸ *Id.*, p. 238.

²⁹ Stevens, N. M. The Chromosomes in the Germ-cells of *Culex*. *J. Exp. Zool.* 1910; 8(2):207-226. Incluye anexo de 4 páginas con sus dibujos y descripciones.

³⁰ Stevens, N. M. An unequal pair of heterochromosomes in *Forficula*. *J. Exp. Zool.* 1910; 8(2):227-242. Incluye anexo de 3 páginas con sus dibujos y descripciones.

pueden dividirse o no en la primera mitosis de maduración, un comportamiento que los hace semejantes al cromosoma X, y que apoyaría la hipótesis de un origen semejante al que había supuesto para las diabróticas. Pero la cuestión más llamativa está en la segunda parte del trabajo, cuando estudia el apareamiento de los cromosomas homólogos antes de la profase I [actualmente diríamos “durante” la profase I], y la separación de las parejas durante la metafase I. Distingue dos casos posibles de *synapsis* (una fase para la que ya prefiere utilizar la expresión “*conjugación de los cromosomas*”), y que son “*telosynapsis*” y “*parasynapsis*”. En este último, que era el que tenía lugar en *Ceuthophilus*, los cromosomas homólogos se situarían “juntos de alguna manera, y gradualmente se enrollan en una cuerda cada vez más gruesa”, de tal manera que tanto la condición doble como el enrollamiento de los filamentos podía observarse incluso con pocos aumentos. La siguiente profase consistía entonces en el desenrollamiento y la contracción longitudinal de los cromosomas homólogos apareados, cosa que hacían simultáneamente los dos cromosomas apareados. El término “*telosynapsis*” se aplicaba a los casos en que no había un apareamiento tan íntimo de los cromosomas homólogos, como había podido observar en las preparaciones de *Blatella germanica* y *Stenopelmatus* sp. que había hecho en 1905.

La importancia del fenómeno que denominó *parasynapsis* fue reconocida por Stevens, quien la puso en relación con la teoría de los quiasmas (crossing-over) de Janssens (1909) y Morgan (1911). Estos sugerían que cuando los cromosomas homólogos se apareaban en *synapsis*, su separación posterior podía hacer que intercambiaran segmentos, dando cromosomas hijos que contendrían tanto cromatina materna como paterna. Janssens partía de la observación de que los homólogos apareados se retorcían uno alrededor del otro, y que cuando ambos se separaban o dividían lo hacían siguiendo un plano lineal, de forma que cada mitad o nuevo cromosoma debía estar constituido de partes de uno y partes del otro de los cromosomas originales que se habían unido en parejas. Morgan añadía que, como resultado de la subsecuente división reductiva, las células producidas contendrían nuevas combinaciones de los materiales componentes de los cromosomas originales. Según Stevens, en *Ceuthophilus* el estado de *parasynapsis* era lo bastante íntimo como para favorecer la suposición de que se trataba de una verdadera conjugación, incluyendo intercambios de sustancia química [genes]. En cuanto a la posibilidad de que estos intercambios de material fueran la explicación de las recombinaciones de caracteres obtenidas por Morgan en los experimentos de cría experimental con *Drosophila*, Stevens lo consideraba muy posible, pero añadía que

“teniendo en cuenta el gran rango de variación en el fenómeno de conjugación y segregación de los cromosomas en la maduración de las células germinales, la evidencia citológica en una especie no puede tomarse con seguridad como base de una teoría o hipótesis que explique los resultados experimentales en otra, sino que el trabajo citológico y experimental sobre una misma especie deben ir de la mano para que puedan sacarse conclusiones seguras de los resultados”³¹

Stevens mostraba a este respecto una cautela que no fue muy común entre los primeros genetistas, cuando rápidamente se hicieron generalizaciones a partir de los resultados obtenidos por el grupo de Morgan en la especie *Drosophila melanogaster*.

³¹ Stevens, N. M. Supernumerary Chromosomes, and Synapsis in *Ceuthophilus* (sp?). *Biol. Bull.* 1912; 22:228.

Los experimentos de N. M. Stevens con Drosophila

Los estudios citológicos de Stevens sobre el género *Drosophila* proporcionaron el conocimiento básico acerca de los cromosomas de unas moscas que pasaron en pocos años a constituir el principal objeto de estudio de la genética. Las detalladas descripciones y las innovaciones técnicas de Stevens sirvieron de base para los experimentos que Morgan y su grupo comenzaron alrededor de 1910. El pequeño número de cromosomas ($2n = 8$) de las células de *Drosophila ampelophila* (igual que su “sucesora”, *Drosophila melanogaster*) resultó muy adecuado para la localización de genes en cromosomas concretos. Por otra parte, la cría experimental de estas moscas resultaba relativamente fácil, ya que podían mantenerse poblaciones independientes en el interior de botellas, suministrándoles papilla de frutas como alimento.

En cuanto a los métodos experimentales, N. M. Stevens desarrolló con *Drosophila* un método propio, que constituía una innovación para la anatomía microscópica de la época. El método, descrito detalladamente en el artículo de 1908, consistía en realizar unas preparaciones no permanentes (válidas solamente para días o semanas), muy rápidas de obtener, a las que Stevens denominaba “tejidos frescos montados en aceto-carmín de Schneider” (más tarde diría, más brevemente, “preparaciones aceto-carmínicas”). Esta sustancia fijaba los tejidos y al mismo tiempo teñía los cromosomas (aunque no el resto de las estructuras celulares, que para estos estudios no eran relevantes). Una ventaja de este método era que las células estaban completas, no cortadas, ya que no se realizaban secciones del tejido, sino que se dispersaban las células mediante presión del cubreobjetos. Stevens valoraba también la posibilidad de tomar imágenes de estas preparaciones “con cámara oscura”, pensando que daría resultados semejantes a las tomadas de las secciones teñidas con hematoxilina de hierro (método convencional).

Sin embargo, la observación de los cromosomas en las células de *Drosophila* resultaba mucho más difícil que en otros insectos. En el artículo de 1908, Stevens explica la larga duración del estudio de *Drosophila ampelophila*, iniciado en el otoño de 1906, por las dificultades debidas al peculiar comportamiento de sus cromosomas. Para esta especie necesitó un año de estudio, en el que examinó más de 200 individuos, mientras para *Sarcophaga pallida* (una mosca de la misma subfamilia) sólo tuvo que emplear unas horas y 10-12 preparaciones. Los cortes teñidos por el método tradicional no daban buenos resultados, y fue la razón de que probara un nuevo método, el de las “preparaciones aceto-carmínicas”. A pesar de todo, no pudo apreciar los heterocromosomas en los estadios de crecimiento de las espermatogonias, a diferencia de otras especies. En agosto de 1907 había presentado ya una comunicación sobre los cromosomas de *Drosophila* en el Congreso de Zoología de Boston, pero entonces aún no había determinado si las células masculinas tenían un cromosoma desaparejado o una pareja de heterocromosomas, es decir, si *Drosophila* pertenecía al tipo XX/XO o al XX/XY.

En el mismo artículo Stevens detalla los experimentos de cría en laboratorio realizados con esta especie. Al disponer de un número elevado de individuos, Stevens obtuvo datos sobre la proporción entre los sexos, pues realizaba el recuento de los individuos masculinos y femeninos cuando diseccionaba las moscas para su investigación citológica. Mientras las criaba, introdujo variaciones en la alimentación de las moscas, para comprobar si producían algún efecto sobre la proporción de sexos.

Alimentó a las moscas con uvas o plátanos, y los porcentajes fueron los siguientes: del total de 1551 moscas, 48,94 % fueron machos y 51,06 % hembras; entre las alimentadas con uvas, el 51,33 % fueron machos y el 48,67 % hembras; entre las alimentadas con plátanos, 46,47 % machos y 53,33 % hembras. En sus conclusiones, Stevens comenta la dificultad de establecer si las diferencias en el número de hembras y machos eran debidas a un distinto número de huevos o a la mortalidad diferencial antes de llegar a la edad adulta:

“Estas diferencias probablemente no son significativas, pero si el sexo es un carácter mendeliano, el número para los dos sexos debería ser por supuesto equivalente, sin que el alimento produzca ningún efecto discriminatorio en el desarrollo tanto de los individuos como de los huevos de diferente sexo (...) Es evidente que se necesitan más experimentos en que se determine el destino de todos los huevos de parejas aisladas de moscas”,³²

A pesar de las dificultades que presentaba su estudio citológico, las moscas del g. *Drosophila* fueron las especies utilizadas en los experimentos genéticos desarrollados por Morgan, Sturtevant, Muller y Bridges. Morgan comenzó sus experimentos en 1908 sobre la base de los descubrimientos de Stevens, que permitieron conocer que las células de estas moscas presentaban solamente cuatro parejas de cromosomas, siendo una de ellas la de los cromosomas sexuales. En un importante artículo publicado en el primer número de la revista *Genetics*, Bridges (1916) mencionaba el trabajo de Stevens y las dificultades para la observación de los cromosomas en los machos de esta especie, aunque añadía en una nota un comentario algo sorprendente:

“Miss Stevens (1908) realizó un largo estudio que incluía la disección y examen de alrededor de doscientos individuos. Ella describió las tres parejas de autosomas del macho como iguales a las de la hembra, y los cromosomas sexuales como «una pareja claramente desigual» (...) Miss Stevens supuso que el mayor de los dos cromosomas era el cromosoma presente por duplicado en la hembra, y que había una pieza X distintiva en el medio de este largo heterocromosoma, de forma que cuando se escribió el primer artículo sobre no-disyunción (Bridges 1913) existía la creencia general de que la constitución del macho era X0 y la de la hembra XX. Se suponía que el cromosoma X estaba unido a un autosoma, como en *Ascaris*”,³³

Es muy posible que existiera esta creencia general, pero no podía basarse en las afirmaciones de Stevens, pues en el artículo original de 1908 ella declara que no ha podido observar claramente los cromosomas sexuales de los machos, por lo que no se atrevía a afirmar si se trataba de un caso X0 o XY. Ciertamente consideró las dos posibilidades, y, en ausencia de datos seguros, apuntó como interpretación posible el caso X0, conocido en otros insectos. Hemos podido comprobar que Morgan defendía también esta interpretación en 1910 y 1911, lo que nos lleva a preguntarnos si él realizaría por su cuenta el análisis citológico en esta especie (*Drosophila ampelophila*) llegando a los mismos resultados debido a la dificultad de observar el cromosoma Y. Sin embargo parece más probable que Morgan asumiera directamente los resultados del estudio realizado por Stevens, lo que indicaría el alto grado de confianza concedido al trabajo de esta investigadora. Es incluso posible que las moscas utilizadas por Morgan en sus primeros experimentos fueran las mismas que Stevens había criado en el MBL, ya que los primeros informes de Morgan fueron redactados en este mismo laboratorio.

³² Stevens, N. M. A Study of the Germ Cells of Certain Diptera, with Reference to the Heterochromosomes and the Phenomena of Synapsis. *J. Exp. Zool.* 1908; 5(3):371-372.

³³ Bridges (1916), *op. cit.*, p. 3.

Esta posibilidad se ve apoyada por la referencia a Stevens que hace Morgan al explicar el mecanismo de la determinación del sexo en *Drosophila*:

“Asumo la idea de que cada huevo, tras eliminar los corpúsculos polares, contiene el cromosoma sexual, llamado X. Antes de su extrusión, el huevo, como todas las células de la hembra, contiene dos X's o XX. Las células masculinas contienen un X. La mitad de los espermatozoides contienen un X, y la otra mitad no tiene X. Miss N. M. Stevens ha mostrado que estas relaciones están realmente presentes en *Drosophila*”³⁴

Por otra parte, la interpretación mendeliana de la herencia del sexo, cuya importancia reconocen Bridges y Morgan en artículos posteriores a 1912, fue ya apuntada por Stevens en su trabajo de 1908 sobre *Drosophila*. Ella consideraba interesante considerar la cuestión de la determinación del sexo en relación con la teoría de la herencia mendeliana, y sugería la posibilidad de encontrar otros caracteres correlacionados con el sexo:

“La única esperanza de determinar si el sexo es un carácter mendeliano en este momento parece estar en los experimentos de cría con formas cuyo estudio citológico muestre que son adecuadas. Es probable que, en algunos casos al menos, otros caracteres puedan estar correlacionados con el sexo, de tal forma que su comportamiento en la herencia puede arrojar luz sobre la cuestión del sexo”³⁵

Este fenómeno, denominado “herencia ligada al sexo”, fue demostrado poco después en *Drosophila ampelophila*, y fue lo que permitió a Morgan y su grupo estudiar los genes ligados y realizar los mapas cromosómicos que les llevaron a la fama.

Publicaciones de Nettie Maria Stevens

1. Notes on Regeneration in *Planaria lugrabis*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1901; 13:396-406.
2. On the Force of Contraction of the Frog's Gastrocnemius in Rigor, and on the Influence of "Chloretone" on that Process. *The American Journal of Physiology*. 1901; 5:374-386.
3. Regeneration in *Tubularia mesembryanthemum*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1901; 13:410-415.
4. Studies on Ciliate Infusoria. *Proceedings of the California Academy of Science (Third Series. Zoology)*. 1901; 3:1-42.
5. Experimental Studies on Eggs of *Echinus microtuberculatus*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1902; 15:421-428.
6. Regeneration in *Antennularis ramosa*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1902; 15:429-447.
7. Regeneration in *Tubularia mesembryanthemum*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1902; 15:317-326.
8. *Further Studies on the Ciliate Infusoria, Lichophora and Boveria*. Ph. Dissertation at Bryn Mawr College. 1903.
9. Notes on Regeneration in *Stentor coeruleus*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1903; 16:461-471.
10. On the Ovogenesis and Spermatogenesis of *Sagitta bipunctata*. *Zoologische Jahrbücher. Abtheilung Für Anatomie Und Ontogenie Der Thiere*. 1903; 18:227-240.
11. Further Studies on the Ciliate Infusoria, Lichophora and Boveria. *Archiv Für Protistenkunde*. 1904; 3:1-43.

³⁴ Morgan, T. H. An Attempt to Analyze the Constitution of the Chromosomes on the Basis of Sex-Limited Inheritance in *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* 1911; 11:367

³⁵ Stevens (1908), *op. cit.*, p. 374.

12. On the Germ Cells and the Embriology of *Planaria simplissima*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*; 1904; 56: 208-220.
13. Further studies on the Ovogenesis of *Sagitta*. *Zool. Jahrb.* 1905; 21: 243-252.
14. *Studies in Spermatogenesis with Special Reference to the Accesory Chromosome*. Washington: Carnegie Institution; 1905; Pub. 36 (74 pp.)
15. A Study of the Germ Cells of *Aphis rosae* and *Aphis oenotherae*. *J. Exp. Zool.* 1905; 2:313-333.
16. *Studies in Spermatogenesis, Part II: A Comparative Study of the Heterochromosomes in Certain Species of Coleoptera, Hemiptera, and Lepidoptera, with Especial reference to Sex Determination*. Washington: Carnegie Institution; 190; Pub. 36 (N° 2).
17. *Studies on the Germ Cells of Aphids*. Washington: Carnegie Institution; 1906; Pub. 51.
18. Color Inheritance and Sex Inheritance in Certain Aphids. *Science*. 1907; 26:216-218.
19. A Histological Study of Regeneration in *Planaria simplicissima*, *Planaria maculata* and *Planaria morgani*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1907; 24:350-373.
20. The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex-determination. *J. Exp. Zool.* 1908; 5(4):453-470.
21. A study of the germ cells of certain diptera, with reference to the heterochromosomes and the phenomena of synapsis. *J. Exp. Zool.* 1908; 5(3):359-374.
22. The Effect of Ultraviolet Ligth upon Developing Eggs of *Ascaris megalcephala*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1909; 27:622-639.
23. Further Studies on the Chromosomes of the Coleoptera. *J. Exp. Zool.* 1909; 6:101-113.
24. Notes on Regeneration in *Planaria simplicissima* and *Planaria morgani*. *Wilhelm Roux' Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. 1909; 27:610-621.
25. An Unpaired Heterochromosome in the Aphids. *J. Exper. Zool.*. 1909; 6:115-123.
26. The Chromosomes and Conjugation in *Boveria subcilindrica*, var. *concharum*. *Archiv Für Protistenkunde*. 1910; 20:126-131.
27. *Chromosomes in Drosophila ampelophila*. Proceedings of the 7th International Zoological Congress; 1910.
28. The chromosomes in the germ-cells of *Culex*. *J. Exp. Zool.* 1910; 8(2):207-226.
29. Further Studies on Reproduction in *Sagitta*. *Journal of Morphologie*. 1910; 21:279-319.
30. A Note on Reduction in the Maturation of Male Eggs in *Aphis*. *Biol. Bull.* 1910; 18:72-75.
31. An unequal pair of heterochromosomes in *Forficula*. *J. Exp. Zool.* 1910; 8(2):227-242.
32. Various Types of Heterochromosomes in the Coleoptera. *Proceedings of the 7th International Zoological Congress*; 1910.
33. Further Studies on Heterochromosomes in Mosquitoes. *Biol. Bull.* 1911; 20:109-120.
34. Heterochromosomes in the Guinea Pig. *Biol. Bull.* 1911; 21:155-167.
35. Preliminary Note on Heterochromosomes in the Guinea Pig. *Biol. Bull.* 1911; 20:121-122.
36. Further Observations on Supernumerary Chromosomes and Sex Ratios in *Diabrotica soror*. *Biol. Bull.* 1912; 22:231-238.
37. Supernumerary Chromosomes, and Synapsis in *Ceuthophilus* (sp?). *Biol. Bull.* 1912; 22:219-230.
38. Boveri, Theodor; Stevens, N. M. Über die Entwicklung dispermer Ascaris-Eier. *Zoologische Anzeiger*. 1904; 2:406-417.
39. Morgan, T. H.; Stevens, N. M. Experiments on Polarity in *Tubularia*. *J. Exper. Zool.*. 1904; 1:559-585.
40. Stevens, N. M.; Boring, A. M. Regeneration in *Polychoerus caudatus*. Part I. Observations on Living Material by N. M. Stevens. Part II. Histology by A. M. Boring. *J. Exper. Zool.*. 1906; 2:335-346.
41. Stevens, N. M.; Boring, A. M. *Planaria morgani* n. sp. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 1906, pp. 7-9.