



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Genètica i Microbiologia

**EVOLUCIÓN COMPARADA DE LOS
ELEMENTOS CROMOSÓMICOS EN EL
GÉNERO *DROSOPHILA***

Bellaterra, enero 2002

Memoria presentada por la Licenciada en Biología Josefa González Pérez para la obtención del título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Bellaterra, veintinueve de enero de dos mil dos.

El Doctor Alfredo Ruiz Panadero,
Catedrático del Departament de Genètica i
Microbiologia de la Facultat de Ciències de
la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifica que: Josefa González Pérez ha
realizado bajo su dirección el trabajo de
investigación realizado en el Departament
de Genètica i Microbiologia de la Facultat
de Ciències de la Universitat Autònoma de
Barcelona que ha llevado a la elaboración
de la Tesis Doctoral titulada *Evolución
comparada de los elementos cromosómicos
en el género Drosophila.*

Dr. Alfredo Ruiz Panadero

Ao meu pai
Á miña nai

1. INTRODUCCIÓN

La comparación de los genomas de distintas especies proporciona información sobre los patrones y las tasas de cambio evolutivo y permite transferir información de las especies más estudiadas a otras para las que se dispone de menos información. Disponer de mapas físicos facilita además la búsqueda de marcadores moleculares próximos a genes o secuencias de interés y por tanto su clonación

Actualmente se dispone de mapas físicos del genoma de muchas especies y de la secuencia nucleotídica del de algunas de ellas (Devos y Gale 2000; Murphy *et al.* 2001). Sin embargo, *Drosophila* sigue siendo un excelente modelo para llevar a cabo estudios de genómica comparada. La existencia de los cromosomas politénicos y la gran disponibilidad de clones genómicos permiten una comparación directa de la organización del genoma en diferentes especies de este género (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Segarra *et al.* 1995). Esta comparación se ve facilitada por el hecho de disponer de la secuencia del genoma de la especie mejor caracterizada genéticamente: *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.* 2000). A pesar de ello, se dispone de mapas físicos de muy pocas especies de este género (Segarra *et al.* 1995; 1996; Vieira *et al.* 1997a; Laayouni *et al.* 2000; Ranz *et al.* 2001).

Se ha propuesto que las tasas de evolución cromosómica pueden variar entre cromosomas dentro de una misma especie (Rice 1984; Charlesworth *et al.* 1987). Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento se basan únicamente en el análisis de especies del género *Drosophila* próximas filogenéticamente (Tonzetich *et al.* 1988; Wasserman 1992; Vieira *et al.* 1997a). El presente trabajo pretende extender este análisis a especies pertenecientes a dos subgéneros distintos *D. melanogaster* que pertenece al subgénero *Sophophora* y *D. repleta* y *D. buzzatii* que pertenecen al subgénero *Drosophila*. Estas especies divergieron hace 40-62 Ma (Beverly y Wilson 1984; Russo *et al.* 1995). Se han utilizado dos aproximaciones diferentes al estudio de la evolución cromosómica: la construcción de mapas físicos de elementos cromosómicos enteros (elementos A y D) y la comparación de la organización molecular de una pequeña región cromosómica (la región *Adh* del elemento B). La comparación de mapas físicos de elementos cromosómicos enteros permite estimar las tasas y patrones de evolución cromosómica y reconstruir la organización de genomas ancestrales. El análisis de regiones cromosómicas pequeñas proporciona información sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre la localización, orden y distancia de los genes a lo largo de los cromosomas (Hartl y Lozovskaya 1994).

1.1 *Drosophila* como organismo modelo

Muchos aspectos de la biología son similares en la mayoría de organismos, sin embargo, hay organismos en los que es más fácil estudiarlos que en otros. *Drosophila* se ha utilizado como organismo modelo durante casi 100 años, esto hace que hoy en día sea uno de los eucariotas multicelulares mejor caracterizado a todos los niveles. Los primeros experimentos con *Drosophila* se remontan al año 1910 en el laboratorio de Thomas Hunt Morgan. Inicialmente fue su tamaño pequeño, gran número de descendientes y facilidad de cultivo y manipulación lo que convirtieron a *Drosophila* en la especie ideal para los estudios de transmisión de genes y de mutagénesis. En 1913 A. H. Sturtevant obtuvo el primer mapa genético que incluía seis loci del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* y demostró que los genes estaban dispuestos siguiendo un orden lineal. Posteriormente Bridges demostró que los cromosomas contenían los genes eliminando así la posibilidad de que cromosomas y genes fueran elementos hereditarios independientes como sostenían algunos investigadores de la época. En 1933 el descubrimiento de los cromosomas politénicos por T. S. Painter, permitió demostrar la colinearidad de los mapas genéticos y citogenéticos. El descubrimiento de miles de mutaciones diferentes y de las reordenaciones cromosómicas multiplicó y expandió las oportunidades de manipulación genética y estudio de *Drosophila*.

Otra de las ventajas de *Drosophila* es el hecho de tener un tamaño de genoma pequeño lo que permitió el desarrollo y la aplicación de las técnicas moleculares. La primera clonación de un fragmento del genoma se llevó a cabo en *Drosophila* (Morrow *et al.* 1974). Inicialmente el DNA era clonado al azar pero enseguida se construyeron las primeras genotecas y se desarrollaron técnicas que permitían seleccionar aquellos clones que contuvieran una determinada secuencia. La primera clonación posicional de un gen (*Ultrabithorax*) también se llevó a cabo en *Drosophila*. Un importante avance en la manipulación del genoma tuvo lugar en 1981 cuando se obtuvieron las primeras moscas transgénicas. Fue la primera vez que se rescató un fenotipo mutante mediante la introducción del gen salvaje en un animal (Spradling y Rubin 1982; Rubin y Spradling 1982). Todo este conocimiento ha hecho que *Drosophila* sea uno de los primeros organismos modelos seleccionados para llevar a cabo la secuenciación completa de su genoma (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Hartl y Lozovskaya 1995; Rubin y Lewis 2000; Adams *et al.* 2000).

De las muchas características que hacen de *Drosophila* un organismo modelo hay que destacar la existencia de los cromosomas politénicos. Estos cromosomas, llamados también cromosomas gigantes, aparecen como resultado de la diferenciación terminal de tejidos con una alta actividad metabólica, como por ejemplo las glándulas salivares. Son cromosomas interfásicos en los que se han producido 10 o más rondas de replicación del DNA sin que haya división celular. Durante el proceso de replicación las cromátidas hermanas quedan alineadas longitudinalmente, es decir, politenizan. Sólo la eucromatina y la -heterocromatina politenizan. La -heterocromatina no se replica y queda formando una masa difusa llamada cromocentro a partir del cual se proyectan los cromosomas (Hill y Rudkin 1987; Merriam *et al.* 1991). Los cromosomas politénicos muestran un patrón de bandas transversales que resultan de la variación en la compactación de la cromatina. La conservación del patrón de bandas permite construir mapas físicos de alta resolución de los cromosomas. Bridges (1935) dividió cada uno de los cinco brazos cromosómicos largos de *D. melanogaster* en 20 divisiones numeradas y cada una de estas divisiones la dividió a su vez en 6 subdivisiones. Al cromosoma 4 se le asignaron únicamente 2 divisiones. Lefevre (1976) obtuvo un mapa fotográfico de los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* y estableció la correspondencia con los dibujos realizados por Bridges. El nivel de resolución al microscopio óptico de los cromosomas politénicos es suficiente para detectar las reordenaciones estructurales que se producen en las especies que pertenecen a un mismo grupo y por tanto permiten establecer relaciones filogenéticas entre ellas. Sin embargo cuando las especies pertenecen a grupos diferentes los cromosomas politénicos son tan diferentes morfológicamente que no pueden establecerse homologías por simple inspección al microscopio óptico. El desarrollo de la técnica de hibridación *in situ* de sondas de DNA sobre cromosomas politénicos ha permitido superar esta limitación (Pardue *et al.* 1970). Esta técnica permite asignar de forma precisa clones de DNA a una banda particular de los cromosomas politénicos. Inicialmente la técnica se utilizó para localizar clones de una especie sobre los cromosomas politénicos de la misma especie (Pardue *et al.* 1970). Posteriormente se demostró que no solamente clones génicos (Steinemann 1982; Whiting *et al.* 1989) sino también clones genómicos como cósmidos (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Ranz *et al.* 1999) y fagos P1 (Segarra *et al.* 1995; Ranz *et al.* 2001) podían ser localizados sobre los cromosomas politénicos de especies filogenéticamente alejadas.

1.2 El genoma de *Drosophila*

Se puede definir el genoma nuclear de un organismo eucariótico como la colección de todas las secuencias de DNA localizadas en el núcleo que se transmiten de una célula a otra por los procesos de mitosis y meiosis. Los genomas eucarióticos están organizados en unidades discretas, los cromosomas. El genoma incluye secuencias que especifican información para la replicación, mantenimiento, empaquetamiento y transmisión de los cromosomas; secuencias que codifican y regulan los genes que serán expresados; secuencias que codifican moléculas de RNA que no serán traducidas; familias de secuencias a veces consideradas como DNA parásito debido a sus métodos de duplicación, transposición y recombinación que les permiten transmitirse de manera no ortodoxa; y otras secuencias de función y significado desconocido (Heckel 1993).

1.2.1 Tamaño del genoma

El genoma de *Drosophila melanogaster* tiene un tamaño aproximado de 180 Mb (Adams *et al.* 2000). Es uno de los genomas eucarióticos multicelulares más pequeños, representa tan sólo el 6% del tamaño del genoma humano (3.000 Mb). Sin embargo es un tamaño típico si lo comparamos con los de otras especies de dípteros (por ejemplo, el de *Anopheles gambiae* tiene 260 Mb; Powell 1997). Dentro del género *Drosophila* hay variación en cuanto al tamaño del genoma. *D. virilis* tiene uno de los genomas de mayor tamaño con 313 Mb (Hartl y Lozovskaya 1995), *D. arizonae* tiene un tamaño de genoma intermedio, 220 Mb (Laird 1973) y *D. simulans* es la especie del género que tiene el genoma más pequeño, 119 Mb (Powell 1997). Esta variación se debe en parte a diferencias en el contenido de DNA repetitivo. Así por ejemplo, *D. melanogaster* tiene 7 veces más DNA repetitivo disperso que *D. simulans* (Dowsett y Young 1982). Pero también hay diferencias en la porción no repetitiva del genoma probablemente debidas a diferentes tasas de acumulación de pequeñas deleciones y inserciones en las diferentes especies del género (Moriyama *et al.* 1998).

1.2.2 Organización molecular del genoma

Desde un punto de vista molecular se han descrito tres componentes principales

en el genoma de *Drosophila melanogaster*: DNA de secuencia única, que representa el 67% del total, DNA moderadamente repetitivo (12%) y DNA altamente repetitivo (21%) (Hartl y Lozovskaya 1995).

El DNA de secuencia única se encuentra mayoritariamente en la eucromatina aunque también se han descrito genes en las regiones heterocromáticas (Adams *et al.* 2000). Este DNA es de secuencia única en comparación con los otros dos componentes del genoma donde el número de repeticiones de una determinada secuencia es muy elevado. Es por eso que a pesar de clasificarlo como único se pueden encontrar también secuencias relacionadas entre sí como por ejemplo pseudogenes o secuencias parálogas (Powell 1997).

El DNA moderadamente repetitivo está formado por elementos transponibles y repeticiones en tándem de los genes que codifican las histonas y los RNA ribosómicos. Los elementos transponibles, que representan el 10% del total del genoma en la especie *D. melanogaster*, se clasifican en dos grupos según su mecanismo de transposición. Los elementos de clase I se transponen a partir de un intermediario de RNA mientras que los elementos de clase II se transponen directamente a partir de DNA. La distribución y el número de elementos transponibles varía dentro y entre especies. En *D. melanogaster* se han descrito 50 familias distintas con un número de copias variable entre 10 y 100. En general presentan una distribución dispersa a lo largo de la eucromatina y son además un componente estable y mayoritario de la heterocromatina (Pimpinelli *et al.* 1995).

Los genes que codifican los RNA ribosómicos 18S y 28S se encuentran repetidos en tándem en los cromosomas X e Y. En la base del cromosoma X hay unas 250 copias de estos dos genes mientras que en el brazo corto del cromosoma Y hay unas 200 copias. Los genes que codifican el RNA 5S están localizados en el brazo cromosómico 2R en un cluster formado por 165 copias (Ashburner 1989).

Los genes de las histonas están localizados en el brazo cromosómico 2L formando un cluster de 100-110 repeticiones. La unidad de repetición tiene un tamaño de 4,8-5 kb y está formada por las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Aunque mayoritariamente los genes que codifican las histonas se encuentran en esta localización se han descrito algunos genes aislados en otras posiciones cromosómicas (Ashburner 1989).

Según la complejidad de su secuencia el DNA altamente repetitivo o DNA satélite se puede dividir en dos clases: secuencias repetidas cortas de 1 a 20 pares de

bases y secuencias más complejas formadas por centenares de pares de bases. Estos dos tipos de secuencias se encuentran repetidas en tándem en bloques de centenares a miles de unidades. En los cromosomas los bloques de repeticiones más largos se encuentran principalmente en la heterocromatina pericentromérica mientras que las repeticiones de unas pocas pares de bases o microsatélites presentan una distribución más uniforme encontrándose también a lo largo de la eucromatina (Csink y Henikoff 1998).

La composición y la proporción de DNA satélite del genoma varían entre y dentro de especies. En *D. melanogaster* cada cromosoma presenta diferentes secuencias de DNA satélite en la heterocromatina pericentromérica (Abad *et al.* 1992; Abad y Villasante 2000), de hecho no se ha descrito ninguna secuencia que sea compartida por todos los centrómeros (Karpen y Allshire 1997). La distribución en la eucromatina tampoco es al azar. Algunas secuencias satélite son exclusivas del cromosoma X o más abundantes en el X que en los autosomas (Waring y Pollack 1987; Huijser *et al.* 1987; Pardue *et al.* 1987; Lowenhaupt *et al.* 1989; DiBartolomeis *et al.* 1992; Bachtrog *et al.* 1999). Se ha sugerido que algunas de estas secuencias podrían estar relacionadas con los mecanismos de compensación de dosis. En *Drosophila* este mecanismo consiste en un incremento del nivel de transcripción del cromosoma X en los machos de manera que es equivalente al de los dos cromosomas X de las hembras. Se han descrito cinco genes que codifican proteínas implicadas en la hipertranscripción del cromosoma X en machos: *male specific letal-1 (msl-1)*, *2 (msl-2)* y *3 (msl-3)*, *maleless (mle)* y *males-absent on the first (mof)* (Stuckenholtz *et al.* 1999). Las proteínas codificadas por estos genes forman un complejo proteico (MSL) que se une a centenares de sitios a lo largo del cromosoma X de los machos. Además de estas cinco proteínas el complejo estaría también formado por dos RNA, *roX1* y *roX2*. El complejo MSL cataliza el cambio en la estructura de la cromatina del cromosoma X, que permite su hipertranscripción, a través de la acetilación de la histona H4 (Kelley y Kuroda 1995; Stuckenholtz *et al.* 1999). Las secuencias (CA/GT)_n, que son el doble de abundantes en la eucromatina del cromosoma X que en la de los autosomas, podrían estar relacionadas con una elevada tasa de transcripción (Huijser *et al.* 1987). Estos autores proponen que la interacción entre las secuencias (CA/GT)_n y las proteínas codificadas por los genes *msl* y *mle* serían responsables del incremento en la tasa de transcripción descrito en los genes del cromosoma X. El hecho de que el patrón de distribución de algunas secuencias microsatélites esté conservado en diferentes especies se ha tomado también como

evidencia a favor de la hipótesis de que estas secuencias juegan un papel importante en la estructura y función de los cromosomas (Lowenhaupt *et al.* 1989).

Existen dos patrones de distribución de las secuencias repetitivas en la eucromatina: largo y corto. *Drosophila* presenta el patrón de distribución largo en el que alternan varias kilobases de DNA de copia única con unas pocas kilobases de secuencias moderadamente repetitivas. Este patrón contrasta con el de la mayoría de genomas de mamíferos en los que la porción de DNA de copia única está más frecuentemente interrumpida por secuencias repetitivas cortas (patrón de distribución corto). Sin embargo no está claro si los diferentes patrones tienen un significado adaptativo ya que existen especies de mamíferos que presentan el patrón largo y especies de insectos que presentan el patrón corto (Powell 1997).

1.2.3 Organización estructural del genoma

Estructuralmente el genoma de *Drosophila* es heterogéneo. Clásicamente se han distinguido en los cromosomas dos regiones según se tiñan de forma intensa, heterocromatina, o débilmente, eucromatina.

La eucromatina está formada en un 80% por DNA de secuencia única y el 20% restante consiste en secuencias moderadamente repetitivas principalmente elementos transponibles (Hartl y Lozovskaya 1995).

La heterocromatina se encuentra mayoritariamente en las regiones centroméricas de los autosomas mientras que la mitad del cromosoma X y todo el cromosoma Y son heterocromáticos (Figura 1). Está formada principalmente por DNA satélite, elementos transponibles y los genes que codifican el RNA ribosómico y las histonas. Sin embargo, también se ha encontrado DNA de copia única como por ejemplo el gen *rolled* flanqueado por al menos 3Mb de heterocromatina a cada lado (Adams *et al.* 2000). Además de por su composición de DNA la heterocromatina se caracteriza citológicamente por estar condensada y genéticamente por su habilidad para suprimir la expresión génica. Es además la última porción del genoma que se replica. No se conoce el mecanismo por el cual se replica de forma tardía, aunque su estructura condensada y su habilidad para suprimir la transcripción sugieren que probablemente también dificulta su propia replicación (Leach *et al.* 2000).

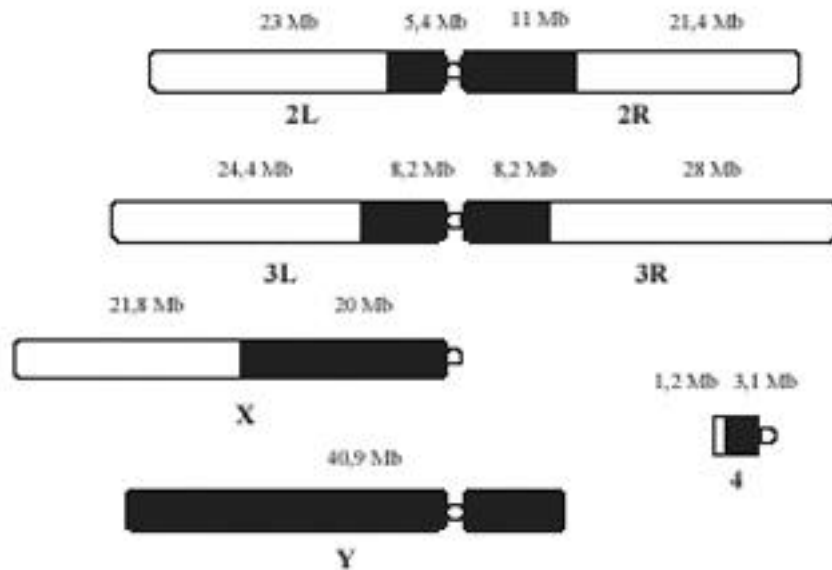


Figura 1. El cariotipo de *D. melanogaster*. Distribución en los cromosomas mitóticos de la euromatina (blanco) y heterocromatina (negro). La longitud de la euromatina en megabases (Mb) proviene del análisis de la secuencia del genoma. La proporción de heterocromatina es una estima directa a partir de la longitud de los cromosomas mitóticos. El bloque de heterocromatina del cromosoma X varía entre una tercera parte y la mitad de la longitud del cromosoma dependiendo de la cepa analizada. El cromosoma Y es casi totalmente heterocromático (Adams *et al.* 2000).

Según su localización y composición la heterocromatina se divide en α - y β -heterocromatina. La α -heterocromatina se localiza en las regiones pericentroméricas y está formada por DNA satélite, que es el componente mayoritario, elementos transponibles y los genes que codifican el RNA ribosómico. La β -heterocromatina se encuentra principalmente en las regiones de transición entre euromatina y heterocromatina (Koryakov *et al.* 1999) y está formada mayoritariamente por elementos transponibles. Cuando se comparan las regiones de transición con las regiones euromáticas se observa una disminución en la densidad génica y un incremento en la densidad de elementos transponibles. En estas regiones también se han descrito al menos 110 tipos diferentes de secuencias repetitivas cortas algunas de las cuales se encuentran también en la euromatina (Adams *et al.* 2000).

El conocimiento actual de la naturaleza molecular de diferentes regiones heterocromáticas del genoma pone en entredicho la definición clásica de

heterocromatina basada en sus propiedades citológicas. Hennig (1999) propone un nuevo concepto de heterocromatina que incluiría cualquier región de la cromatina en la que se produzca una represión de la transcripción. La heterocromatina sería por tanto un estado funcionalmente inactivo de la cromatina resultante de su compactación.

1.2.4 Cariotipo y cambios cromosómicos

La primera descripción de los cromosomas de una especie de *Drosophila* fue la de *Drosophila melanogaster* en el año 1907. El cariotipo de esta especie está formado por dos autosomas metacéntricos grandes (cromosomas 2 y 3), un autosoma acrocéntrico pequeño (cromosoma 4), un cromosoma X acrocéntrico y un cromosoma Y submetacéntrico (ver Figura 1). Posteriormente se fueron describiendo los cariotipos de otras especies del género y se observó que los diferentes cariotipos podían derivarse unos de otros mediante fusiones o fisiones céntricas (Clayton y Guest 1986).

El número haploide de cromosomas en el género *Drosophila* varía entre 3 y 6. Hay una clara diferencia entre los dos subgéneros para los que se tiene más datos, en el subgénero *Drosophila* la mayoría de especies tienen 6 cromosomas mientras que en el subgénero *Sophophora* la mayoría tienen 4 (Powell 1997).

1.2.4.1 Homologías cromosómicas en el género *Drosophila*

Muller (1940) y Sturtevant y Novitski (1941) propusieron que el cariotipo ancestral del género debía estar formado por cinco cromosomas largos y un cromosoma puntiforme. Llegaron a esta conclusión teniendo en cuenta que la formación de dos cromosomas a partir de uno es más difícil, ya que implica la aparición de un nuevo centrómero, que la fusión de dos cromosomas. Esta hipótesis se puede contrastar representando la distribución de las configuraciones de los cariotipos sobre la filogenia del género *Drosophila*. Como se puede ver en la Figura 2 las fusiones pueden explicar los cambios cariotípicos que se han producido a lo largo de la evolución del género (Powell 1997).

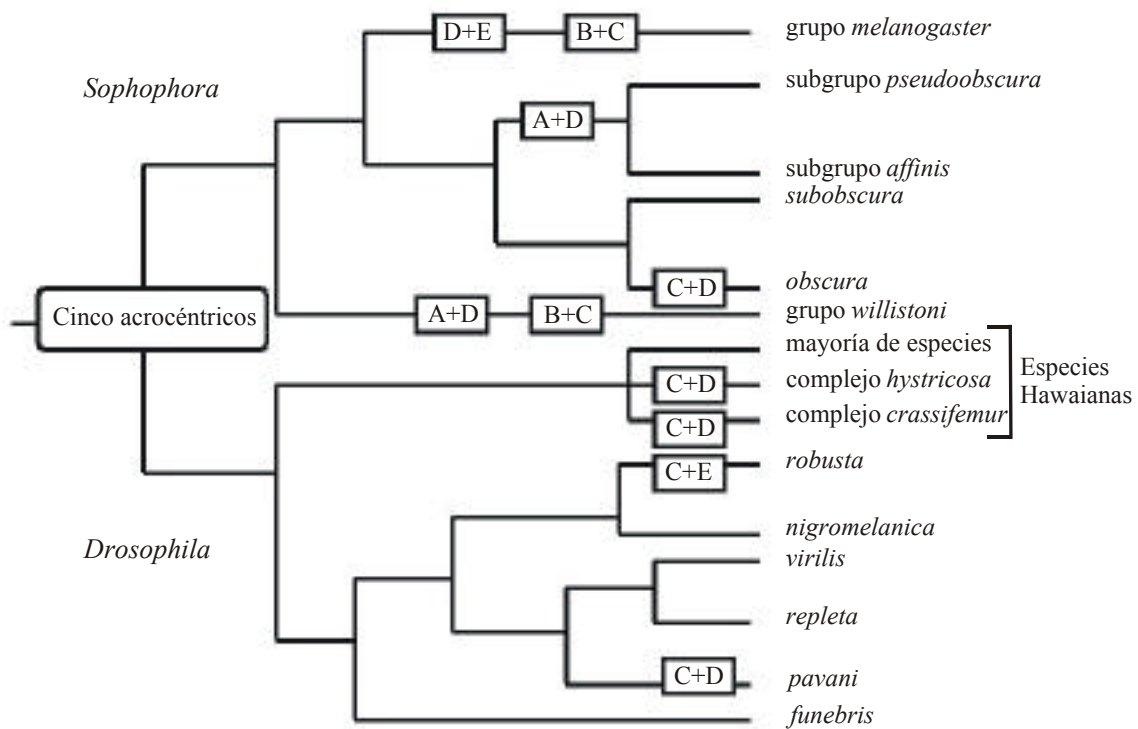


Figura 2. Representación de la configuración cariotípica de varias especies sobre la filogenia del género *Drosophila*. Si se asume que el cariotipo ancestral estaba formado por cinco elementos cromosómicos, el escenario más parsimonioso que permite explicar los diferentes cariotipos observados en el género requiere solo de fusiones de brazos cromosómicos. La fusión de los elementos C y D en las especies Hawaianas se piensa que ha aparecido dos veces de forma independiente (Powell 1997).

Estos mismos autores, basándose en estudios genéticos comparativos, fueron también los primeros en señalar que las diferentes especies del género tienden a tener mutantes fenotípicos similares en los mismos grupos de ligamiento. Esto les permitió establecer un sistema de nomenclatura común para todo el género en el que los diferentes cromosomas o brazos cromosómicos corresponden con uno de los seis elementos cromosómicos que ellos proponen. El desarrollo de la técnica de hibridación *in situ* permitió confirmar posteriormente las homologías cromosómicas propuestas para diferentes grupos de especies y establecer otras por primera vez (Steinemann 1982; Steinemann *et al.* 1984; Loukas y Kafatos 1986; Whiting *et al.* 1989; Papaceit y Juan 1993; entre otros). En la Tabla 1 se muestran algunas de las homologías cromosómicas descritas en el género *Drosophila* (Powell 1997).

Las homologías cromosómicas también se han extendido más allá del género *Drosophila* a otras especies de dípteros como por ejemplo mosquitos del género *Aedes*, la mosca azul *Lucilia cuprina*, o la mosca común *Musca domestica*. Se ha propuesto que la conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos podría ser una característica común en la evolución cariotípica de los dípteros (Heckel 1993).

Tabla 1. Correspondencias de los cromosomas o brazos cromosómicos de diferentes especies del género *Drosophila* con los elementos de Muller (Powell 1997).

	Elemento de Muller					
	A	B	C	D	E	F
Subgénero <i>Sophophora</i>						
<i>D. melanogaster</i>	X	2L	2R	3L	3R	4
<i>D. simulans</i>	X	2L	2R	3L	3R	4
<i>D. subobscura</i>	A	U	E	J	O	D
<i>D. pseudoobscura</i>	XL	4	3	XR	2	5
Subgénero <i>Drosophila</i>						
<i>D. repleta</i>	X	3	5	4	2	6
<i>D. buzzatii</i>	X	3	5	4	2	6
<i>D. virilis</i>	X	4	5	3	2	6
<i>D. hydei</i>	X	4	3	5	2	6

Aunque existe una conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos se han descrito algunas excepciones (Tabla 2). La diferente localización de los genes que codifican la *Larval serum protein 1 alpha* (*Lsp1alpha*) y la *Larval serum protein 1 beta* (*Lsp1beta*) en diferentes especies del género se piensa que es el resultado de una transposición (Brock y Roberts 1983).

La localización de los genes que codifican el RNA ribosómico 5S (*5SRNA*) y los genes de las histonas (*HIS-C*) en varias especies de los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* no concuerda con las homologías establecidas entre estas especies (Alonso y Berendes 1975; Steinemann 1982; Steinemann *et al.* 1984; Fitch *et al.* 1990). Lo mismo se encontró para genes que codifican RNA de transferencia en cuatro especies

diferentes de *Drosophila* pertenecientes a dos subgéneros distintos (Tonzetich *et al.* 1990).

Kress (1993) observó que los genes que codifican la *Larval glue protein 1 y 3* (*Lgp-1* y *Lgp-3*) en *D. virilis* están localizados en el cromosoma X (elemento A) y sus homólogos en *D. melanogaster* *Salivary gland secretion 3, 7 y 8* (*Sgs3, Sgs7 y Sgs8*) se encuentran en el brazo cromosómico 3L (elemento D). Al analizar el cromosoma 3 de *D. virilis* (homologo al 3L de *D. melanogaster*) se encontraron secuencias relacionadas con *Sgs3*. Esto sugiere que en el linaje evolutivo que conduce a *D. virilis* hubo una duplicación de genes relacionados con *Sgs3* que posteriormente se transpusieron al cromosoma X.

Drosopoulou y Scouras (1995) analizaron la distribución de los genes de la familia de las beta-tubulinas (*_1-tubulin*, *_2-tubulin* y *_3-tubulin*) en 11 especies del subgrupo *montium* perteneciente al grupo de especies *melanogaster* y la compararon con la de la especie *D. melanogaster*. La localización cromosómica de estos genes varía de unas especies a otras.

El cluster de las maltasas (*HDL*) y de los genes que codifican las *Larval cuticle proteins* (*Lcp*) están separados por 10 kb y situados en el brazo cromosómico 2R (elemento C) de *D. melanogaster* mientras que en *D. virilis* están localizados en regiones diferentes del cromosoma 4 (elemento B) (Vieira *et al.* 1997b).

Yi y Charlesworth (2000) describen la transposición del gen *exuperantia 1* (*exu-1*) en la especie *D. miranda* del elemento C al elemento A. Los autores proponen que el cambio de localización cromosómica es el resultado de un evento de recombinación ectópica que implicaría al gen *exuperantia 2* (*exu-2*).

Finalmente, Bondinas *et al.* (2001) describen la localización de un séptimo loci de la familia génica de las actinas en las especies *D. subsilvestris* y *D. bifasciata*. En todas las especies estudiadas hasta ese momento se habían descrito únicamente 6 loci (Loukas y Kafatos 1986; 1988). Los autores proponen que ha habido una transposición de un locus de las actinas en el linaje que conduce a estas dos especies.

No se pueden descartar las reordenaciones cromosómicas como el mecanismo por el cual los genes cambian de elemento cromosómico. Sin embargo, esta explicación es poco probable ya que en la mayoría de los casos se necesitarían varias reordenaciones para explicar la nueva localización de los genes. Si tenemos en cuenta las características en común de los genes que muestran una localización no conservativa vemos que todos

ellos son o genes repetidos en tándem (*5SRNA*, *HIS-C*) o genes que pertenecen a familias multigénicas (*Lsp1*, *tRNA*, *Lgp*, *-tubulin*, *HDL*, *Lcp*, *exu-1* y genes de las actinas). Esto sugiere que el mecanismo de transposición podría ser la recombinación ectópica entre regiones que presentan homología. Los genes repetidos en tándem y los genes de familias multigénicas tendrían por tanto una mayor probabilidad de transposición debido a su organización molecular (Yi y Charlesworth 2000). Se han descrito también otros mecanismos de transposición como la retrotransposición (Long y Langley 1993; Currie y Sullivan 1994; Yuan *et al.* 1996) y la transposición mediada por elementos móviles (Lovering *et al.* 1991).

Algunos autores han sugerido que la tasa de transposición es más elevada en el subgénero *Sophophora* que en el subgénero *Drosophila* (Tonzetich *et al.* 1990). En la Tabla 2 se muestran las diferentes transposiciones descritas en la literatura teniendo en cuenta si las especies estudiadas pertenecen a un subgénero o al otro. Se conoce la localización de 10 de estos genes en especies pertenecientes a los dos subgéneros. Cuando se ha estudiado más de una especie del subgénero *Drosophila* la localización en las diferentes especies de este subgénero es coincidente. Este resultado concuerda con la hipótesis propuesta por Tonzetich *et al.* (1990) de una mayor tasa de transposición en el subgénero *Sophophora*. Estos datos junto a las observaciones de un mayor número de inversiones y fusiones céntricas fijadas en el subgénero *Sophophora* (Sperlich y Pfriem 1986; Powell 1997; Ranz *et al.* 1999) apuntan hacia una mayor tasa evolutiva en el linaje que conduce a este subgénero.

También hay ejemplos de transposiciones que implican a un único elemento cromosómico. Este es el caso de los genes anidados *Rhodopsin 4* (*Rh4*) y *seven in absentia* (*sina*). El gen *sina* en *D. melanogaster* está localizado en un intrón del gen *Rh4* (Montell *et al.* 1987) mientras que en *D. virilis* estos dos genes se encuentran en posiciones diferentes (Neufeld *et al.* 1991). En *D. virilis* el gen *Rh4* no tiene intrones lo que sugiere que la localización de este gen en esta especie es debida a una retrotransposición (Neufeld *et al.* 1991).

Tabla 2. Excepciones a las homologías cromosómicas propuestas por Muller (1940) y Sturtevant y Novitski (1941).

Gen	Subgénero	Elemento	Subgénero	Elemento	Referencia
	<i>Sophophora</i>		<i>Drosophila</i>		
<i>Lsp1alpha</i>	<i>D. melanogaster</i>	A	<i>D. hydei</i>	E	Brock y Roberts 1983
	<i>D. willistoni</i>	E	<i>D. virilis</i>	E	
	<i>D. pseudoobscura</i>	E	<i>D. funebris</i>	E	
	<i>D. saltans</i>	E	<i>D. immigrans</i>	E	
<i>Lsp1beta</i>	<i>D. melanogaster</i>	B	<i>D. hydei</i>	E	Brock y Roberts 1983
	<i>D. willistoni</i>	E	<i>D. virilis</i>	E	
	<i>D. saltans</i>	E	<i>D. funebris</i>	E	
	<i>D. pseudoobscura</i>	B y E	<i>D. immigrans</i>	E	
5SRNA	<i>D. melanogaster</i>	C	<i>D. hydei</i>	E	Steinemann <i>et al.</i> 1984; Alonso y Berendes 1975
	<i>D. miranda</i>	E y B			
	<i>D. pseudoobscura</i>	E y A			
	<i>D. persimilis</i>	E y A			
	<i>D. subobscura</i>	E			
	<i>D. obscura</i>	E			
	<i>D. ambigua</i>	B			
<i>D. subsilvestris</i>	B				
<i>HIS-C</i>	<i>D. melanogaster</i>	B	<i>D. hydei</i>	E	Steinemann <i>et al.</i> 1984; Fitch <i>et al.</i> 1990
	<i>D. subobscura</i>	B			
	<i>D. miranda</i>	E			
	<i>D. pseudoobscura</i>	E			
	<i>D. persimilis</i>	E			
<i>tRNA₂^{Lys}</i>	<i>D. melanogaster</i>	C y D	<i>D. virilis</i>	C y E	Tonzetich <i>et al.</i> 1990
	<i>D. pseudoobscura</i>	C	<i>D. hydei</i>	C y E	
<i>tRNA₃^{Thr}</i>	<i>D. melanogaster</i>	C y E	<i>D. virilis</i>	A, C, E	Tonzetich <i>et al.</i> 1990
	<i>D. pseudoobscura</i>	A y C	<i>D. hydei</i>	A, C, E	
<i>tRNA₂^{Arg}</i>	<i>D. melanogaster</i>	C y E	<i>D. virilis</i>	C	Tonzetich <i>et al.</i> 1990
	<i>D. pseudoobscura</i>	B y C	<i>D. hydei</i>	C	
<i>Lgp-1/</i> <i>Lgp-3</i>	<i>D. melanogaster</i>	D	<i>D. virilis</i>	A	Kress 1993
<i>exu-1</i>	<i>D. melanogaster</i>	C			Yi y Charlesworth 2000
	<i>D. miranda</i>	A			

HDL/	<i>D. melanogaster</i>	C	<i>D. virilis</i>	B	Vieira <i>et al.</i> 1997b
Lcp	<i>D. pseudoobscura</i>	C	<i>D. novamexicana</i>	B	
			<i>D. montana</i>	B	
			<i>D. hydei</i>	B	
_1-tubulin	<i>D. melanogaster</i>	C			Drosopoulou y Scouras 1995
	<i>D. auraria</i>	B			
	<i>D. triauraria</i>	B			
	<i>D. quadraria</i>	B			
	<i>D. serrata</i>	B			
	<i>D. birchii</i>	B			
	<i>D. kikkawai</i>	E			
	<i>D. diplacantha</i>	B			
	<i>D. seguyi</i>	B			
	<i>D. vulcana</i>	C			
	<i>D. bicornuta</i>	B			
	<i>D. jambulina</i>	E			
_2-tubulin	<i>D. melanogaster</i>	E			Drosopoulou y Scouras 1995
	<i>D. auraria</i>	B			
	<i>D. triauraria</i>	B			
	<i>D. quadraria</i>	B			
	<i>D. serrata</i>	B			
	<i>D. birchii</i>	B			
	<i>D. kikkawai</i>	E			
	<i>D. diplacantha</i>	B			
	<i>D. seguyi</i>	B			
	<i>D. vulcana</i>	B			
	<i>D. bicornuta</i>	B			
	<i>D. jambulina</i>	D			
_3-tubulin	<i>D. melanogaster</i>	C			Drosopoulou y Scouras 1995
	<i>D. auraria</i>	B			
	<i>D. triauraria</i>	B			
	<i>D. quadraria</i>	B			
	<i>D. serrata</i>	C			
	<i>D. birchii</i>	D			
	<i>D. kikkawai</i>	C			
	<i>D. diplacantha</i>	C			
	<i>D. seguyi</i>	C			
	<i>D. vulcana</i>	C			
	<i>D. bicornuta</i>	C			
	<i>D. jambulina</i>	E			
Genes de las actinas	<i>D. melanogaster</i>	A,C,D,E	<i>D. hydei</i>	A,C,D,E	Loukas y Kafatos 1986; 1988; Bondinas <i>et al.</i> 2001
	<i>D. subobscura</i>	A,C,D,E	<i>D. virilis</i>	A,C,D,E	
	<i>D. madeirensis</i>	A,C,D,E	<i>D. robusta</i>	A,C,D,E	
	<i>D. ambigua</i>	A,C,D,E	<i>D. grimshawi</i>	A,C,D,E	
	<i>D. tristis</i>	A,C,D,E			
	<i>D. obscura</i>	A,C,D,E			
	<i>D. subsilvestris</i>	A,B,C,D,E			
	<i>D. bifasciata</i>	A,B,C,D,E			

1.2.4.2 Tipos de cambios cromosómicos: inversiones paracéntricas

Los tipos de cambios más frecuentes a lo largo de la evolución del cariotipo de *Drosophila* son las fusiones/fisiones céntricas y las inversiones paracéntricas. Se ha estimado que el número de inversiones paracéntricas fijadas durante la evolución del género es entre 22.000 y 56.000 mientras que el número de fusiones/fisiones céntricas es de sólo 58 (Clayton y Guest 1986). Los otros dos tipos de cambios descritos, inversiones pericéntricas y translocaciones, son más raros aún, 32 y 3 respectivamente (Clayton y Guest 1986). El hecho de que inversiones y fusiones/fisiones céntricas sean los tipos de cambios más frecuentes concuerda con las observaciones de que el contenido genético de los diferentes elementos cromosómicos está conservado y con la variación en el orden de los genes dentro de un elemento cromosómico entre especies (Segarra y Agudé 1992; Kress 1993; Schafer *et al.* 1993; entre otros).

La existencia de inversiones cromosómicas fue detectada indirectamente por Sturtevant en 1917 al observar que algunas cepas de *Drosophila* presentaban una considerable reducción de la recombinación en determinadas regiones cromosómicas. La elaboración de mapas genéticos permitió demostrar que la reducción en las tasas de recombinación se debía a un cambio de orden de los genes en unas cepas respecto a otras, es decir, a las inversiones cromosómicas (Krimbas y Powell 1992).

Las inversiones son el resultado de dos roturas independientes y simultáneas del cromosoma y la unión de los extremos en una orientación invertida respecto a las regiones flanqueantes (Krimbas y Powell 1992). Las inversiones tienen un origen único, es decir, todas las copias de una determinada reordenación cromosómica provienen de un único evento de inversión. Esta afirmación se basa en que la aparición de una inversión en condiciones naturales es un evento raro y en que la probabilidad de que dos de estos eventos raros impliquen al mismo fragmento cromosómico es también muy baja. Además aunque se produjeran dos inversiones con los mismos puntos de rotura la probabilidad de que las dos inversiones se establezcan en la población es muy pequeña. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de puntos calientes en el genoma, “hot spots”, en los que se acumulan puntos de rotura. Esto ocurre por ejemplo en las inversiones solapantes o en las inversiones en tándem (inversiones que comparten un punto de rotura). La existencia de estos “hot spots” pone en duda la aparición independiente de los puntos de rotura y el origen monofilético de las inversiones (Krimbas y Powell 1992). Los elementos transponibles han sido implicados en el origen

de las inversiones naturales (Montgomery *et al.* 1991; Lim y Simmons 1994). Recientemente se ha demostrado que los elementos transponibles originan inversiones cromosómicas mediante un mecanismo de recombinación ectópica entre copias de elementos localizadas en orientación inversa en diferentes posiciones del mismo cromosoma (Cáceres *et al.* 1999a). El hecho de que los elementos transponibles estén implicados en el origen de las inversiones posibilita que las inversiones puedan ocurrir de forma recurrente. Sin embargo, los estudios de variabilidad nucleotídica y estructural en la región de los puntos de rotura clonados de la inversión 2j de la especie *D. buzzatii* corroboran la hipótesis del origen único de las inversiones (Cáceres *et al.* 2001).

En *Drosophila* dos terceras partes de las especies presentan polimorfismo para inversiones paracéntricas. Debido a los entrecruzamientos que tienen lugar en los heterocariotipos, las inversiones paracéntricas y pericéntricas producen cromosomas aberrantes (Navarro *et al.* 1997). Esto implica un descenso en la fertilidad de los heterocariotipos y por tanto una intensa selección en contra que debería impedir la existencia del polimorfismo de inversiones (Sperlich y Pfriem 1986). Sin embargo, en *Drosophila*, existen dos circunstancias que permiten que las inversiones paracéntricas tengan un menor efecto sobre la fertilidad. Primero, los machos no recombinan; y, segundo las hembras poseen un mecanismo ordenado de meiosis que hace que los cromosomas aberrantes (dicéntricos o acéntricos) producidos por recombinación acaben siempre en los corpúsculos polares. Las inversiones pericéntricas no se benefician de este mecanismo ya que un intercambio en la región invertida origina cromosomas monocéntricos portadores de deleciones o duplicaciones que no son selectivamente eliminados. Los mecanismos reductores del efecto de las inversiones paracéntricas sobre la fertilidad permiten explicar el hecho de que las inversiones paracéntricas sean el tipo de cambio cromosómico más frecuente en *Drosophila* (Sperlich y Pfriem 1986; Krimbas y Powell 1992). Sin embargo, para explicar el mantenimiento de un polimorfismo estable de inversiones es necesario que la selección natural intervenga de forma activa. Se considera que el destino de una inversión depende de la combinación epistática de los alelos incluidos en la inversión (Krimbas y Powell 1992) y de la tasa de recombinación de la especie (Cáceres *et al.* 1999b).

1.2.5 La secuencia del genoma de *D. melanogaster*

El genoma de *D. melanogaster* fue el tercer genoma eucariótico secuenciado, después del de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb) y el del nematodo *Caenorhabditis elegans* (97 Mb) (Celniker 2000). La secuencia corresponde mayoritariamente a la porción eucromática del genoma (120 Mb) ya que un tercio del genoma de *Drosophila* corresponde a heterocromatina centromérica que no puede ser clonada de forma estable (Adams *et al.* 2000).

La identificación de los genes en la secuencia del DNA se hizo utilizando dos programas informáticos, *Genscan* y *Genie*, y la información disponible en las bases de datos. Se utilizó también la información acerca de DNA complementarios (cDNA) y los resultados fueron posteriormente revisados por un grupo de expertos. El análisis de la primera versión de la secuencia del genoma disponible (Release 1) permitió la identificación 13.601 genes que codifican 14.113 transcritos ya que algunos de estos genes presentan procesamiento alternativo. El tamaño promedio de los transcritos predichos es de 3.058 pares de bases (pb). El número promedio de exones por gen es 4 y el de intrones 3. Se ha de tener en cuenta que estos valores son subestimados ya que los programas utilizados no predicen de forma correcta las regiones 5' y 3' no traducidas de los genes. El tamaño de los intrones es variable, oscila entre 40 pb y 70 kb aunque la mayoría de intrones tienen entre 59 y 63 pb (Adams *et al.* 2000).

La densidad de genes promedio en el genoma de *D. melanogaster* es de uno cada 9 kb. Hay mucha variación en densidad: de 0 a 30 genes en 50 kb. Las regiones de alta densidad génica están correlacionadas con las regiones ricas en GC. En estas regiones hay hasta 7 veces más genes que en las regiones pobres en GC (Jabbari y Bernardi 2000).

El número de genes en *Drosophila* es aproximadamente el doble del de *S. cerevisiae* (6.241), inferior al estimado para *C. elegans* (18.424) y aproximadamente la mitad del número de genes estimado a partir de la secuencia del genoma humano (30.000-40.000) (Lander *et al.* 2001). Aparentemente, por tanto, la complejidad del organismo no parece estar estrechamente correlacionada con el número de genes (Celniker 2000).

Al comparar las secuencias de los tres primeros organismos eucariotas secuenciados se ha observado que *D. melanogaster* comparte un 16% de sus genes con *S. cerevisiae*. Muchos de estos genes codifican proteínas que están implicadas en

procesos comunes a todas las células eucariotas: replicación, transcripción y división celular. *D. melanogaster* comparte un 35% de sus genes con *C. elegans*, entre los que se incluyen genes que codifican las proteínas requeridas en procesos multicelulares más complejos. Un 30% de los genes de cada uno de estos organismos no presenta similitud con proteínas descritas en las bases de datos y se asume que se trata de genes de evolución rápida (Rubin *et al.* 2000a). La comparación posterior de la secuencia del genoma humano con la de *D. melanogaster* identificó un 61% de genes compartidos entre estos dos organismos (Lander *et al.* 2001).

El proteoma (conjunto de proteínas diferentes codificadas en el genoma) de *S. cerevisiae* está formado por 4.383 proteínas, el de *C. elegans* por 9.453 y el de *D. melanogaster* por 8.065. Cuando se compara el proteoma de estos tres organismos con el proteoma humano se observa un incremento progresivo de la complejidad. El número de dominios proteicos, de familias de proteínas y de dominios por proteína, es superior en invertebrados respecto a la levadura, y en vertebrados respecto a invertebrados. Sin embargo no parece que un incremento en la complejidad del proteoma de 2 o 3 veces pueda explicar la gran complejidad fenotípica de los vertebrados. Otros factores como los mecanismos de procesamiento alternativo o las modificaciones post-traduccionales podrían también contribuir a esta mayor complejidad. Así, por ejemplo, a pesar de que el genoma humano tiene sólo el doble de genes que el del gusano *C. elegans* o el de la mosca *D. melanogaster*, debido a los mecanismos de procesamiento alternativo podría codificar cinco veces más proteínas (Lander *et al.* 2001).

1.3 El género *Drosophila*

El género *Drosophila*, formado por unas 2.000 especies, está incluido en la familia *Drosophilidae* integrada por más de 3.000 especies. Este género está dividido en 15 subgéneros de los cuales los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* son los dos más estudiados (Ashburner 1989). Existen dos estimas para el tiempo de divergencia entre estos dos subgéneros. Beverly y Wilson (1984) basándose en datos inmunológicos obtuvieron una estima de 62 millones de años. Posteriormente Russo *et al.* (1995) comparando la secuencia del gen *Adh* en diferentes especies obtuvieron una estima menor: 40 millones de años. En la Figura 3 se muestran las relaciones filogenéticas y

los tiempos de divergencia estimados para las especies estudiadas en el presente trabajo.

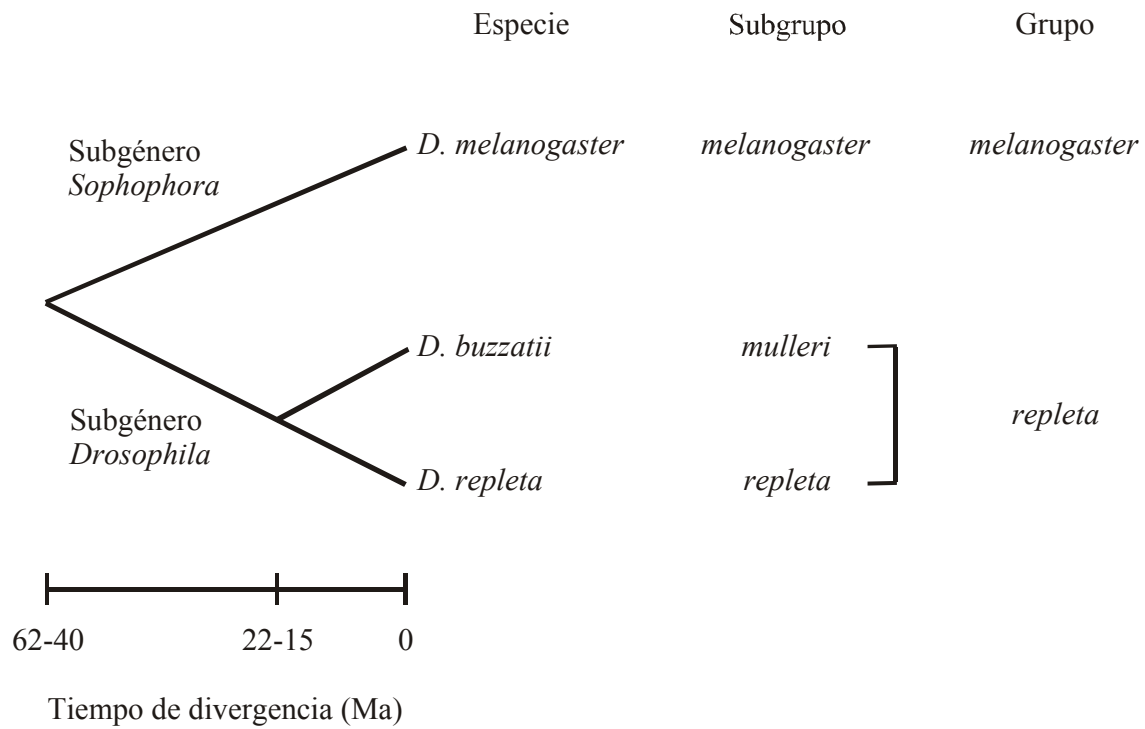


Figura 3. Relaciones filogenéticas y tiempos de divergencia estimados para las especies del género *Drosophila* analizadas en este estudio (Beverly y Wilson 1984; Russo *et al.* 1995).

1.3.1 El grupo *melanogaster*

El grupo *melanogaster* de *Drosophila* pertenece al subgénero *Sophophora* y está formado por unas 150 especies clasificadas en 10 subgrupos diferentes. La distribución de las especies de este grupo es predominantemente Oriental aunque algunos subgrupos son característicos de otras regiones biogeográficas especialmente de la región Afrotropical. *D. melanogaster* pertenece al subgrupo *melanogaster* y es una especie cosmopolita, es decir está presente en las seis principales regiones biogeográficas. En esta especie se han descrito 339 inversiones paracéntricas (23 en el cromosoma X, 67 en el 2L, 72 en el 2R, 79 en el 3L y 98 en el 3R) y 18 inversiones pericéntricas (Ashburner 1989; Lemeunier y Aulard 1992).

1.3.2 El grupo *repleta*

El grupo *repleta* de *Drosophila* es uno de los más numerosos del género con 91 especies. Pertenece al subgénero *Drosophila* y está formado por cinco subgrupos: *fasciola*, *hydei*, *mercatorum*, *mulleri* y *repleta*. La especie *D. repleta* pertenece al subgrupo *repleta*, y la especie *D. buzzatii* pertenece al subgrupo *mulleri*. La mayoría de especies de este grupo se localizan en las regiones áridas y semiáridas del Nuevo Mundo. Sin embargo algunas especies tienen una distribución más amplia entre ellas *D. repleta* (cosmopolita) y *D. buzzatii* (subcosmopolita). *D. buzzatii* es una especie cactófila que se encuentran asociada principalmente a diferentes especies del género *Opuntia*. La distribución de *D. repleta* está asociada al hombre (Wasserman 1992).

Muchas de las especies de este grupo han sido estudiadas citológicamente y se han establecido las relaciones filogenéticas entre ellas basadas en las inversiones paracéntricas (Wasserman 1992). La utilización de las inversiones en los estudios filogenéticos se basa en asumir que las inversiones son eventos únicos, y por lo tanto, dos especies que comparten la misma inversión están más estrechamente relacionadas entre si que con una tercera especie que no presente esa inversión (Krimbas y Powell 1992). Posteriormente se han llevado a cabo estudios de filogenias moleculares que han corroborado en su mayoría los estudios citogenéticos clásicos y también han aportado nuevos datos (Spicer 1995; Rodríguez- Trelles *et al.* 2000; Durando *et al.* 2000).

En la evolución cariotípica del grupo *repleta* no se ha descrito ninguna inversión pericéntrica, fisiones o translocaciones. Se han descrito 4 fusiones céntricas y el cambio cromosómico más frecuente, al igual que en el resto de especies del género, son las inversiones paracéntricas: 296 inversiones descritas de las cuales 119 están fijadas entre especies (Wasserman 1992). En la Tabla 3 se muestra la distribución en los diferentes brazos cromosómicos de las inversiones que se han producido a lo largo de la evolución del grupo *repleta*. Las inversiones no se distribuyen al azar. El cromosoma 2 (elemento E) es con mucho el más dinámico, representa el 22,6% de la eucromatina y presenta el 70,2% del total de inversiones. Este mayor dinamismo del cromosoma 2 también se ha descrito en otros grupos de especies. Por ejemplo en el grupo *melanica* (subgénero *Drosophila*) el cromosoma 2 tiene el 70% de las inversiones polimórficas descritas y en las especies Hawaianas el 41% (Tonzetich *et al.* 1988). Este cromosoma es también generalmente el cromosoma de mayor tamaño. Sin embargo, no se piensa que la diferencia de tamaño pueda explicar el exceso de inversiones en este elemento

cromosómico (Tonzetich *et al.* 1988). Por otro lado el cromosoma 4 (elemento D) es el más conservativo, con tan solo el 3,1% del total de inversiones descritas en el grupo *repleta* (Wasserman 1992).

Tabla 3. Distribución de inversiones en los brazos cromosómicos del grupo *repleta* de *Drosophila* (Wasserman 1992).

Brazo cromosómico	Número de inversiones			% total de heterocromatina	% total de inversiones
	Polimórficas	Fijadas	Total		
X	9	12	21	18	7,1
2	132	76	208	22,6	70,2
3	21	18	39	21,4	13,2
4	7	2	9	17,7	3,1
5	8	11	19	20,3	6,4
Total	177	119	296	100	100

El cariotipo de las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* está formado por 5 cromosomas acrocéntricos (X, 2, 3, 4 y 5) y un cromosoma puntiforme (cromosoma 6). *D. repleta* es la especie utilizada como referencia en los estudios citogenéticos de este grupo ya que se dispone de mapas de sus cromosomas (Wharton 1942). El cariotipo de esta especie difiere del cariotipo ancestral propuesto para el grupo *repleta* por ocho inversiones (Xa, Xb, Xc, 2a, 2b, 2t⁸, 2u⁸ y 3b) mientras que el cariotipo de *D. buzzatii* difiere por cuatro (2m, 2n, 2z⁷ y 5g) (Ruiz y Wasserman 1993). Estas dos especies están por tanto separadas por 12 inversiones. De estas 12 cabe destacar las inversiones Xb y Xc que están dispuestas en tándem y por tanto podrían ser un punto caliente de acumulación de puntos de rotura en el genoma. Mientras que *D. repleta* es monomórfica, *D. buzzatii* presenta polimorfismo de inversiones (Wasserman 1992).

Existen dos estimas del tamaño del genoma de especies del grupo *repleta*. *D. arizonae* que pertenece al subgrupo *mulleri*, tiene un genoma de 220 Mb de las cuales un 13% corresponde a DNA altamente repetitivo, un 18% a DNA moderadamente repetitivo y un 69 % a DNA de copia única. *D. hydei*, subgrupo *hydei*, tiene un genoma

de 210 Mb (Schulze y Lee 1986).

Para la especie *D. buzzatii* se dispone de mapas genéticos (Schafer *et al.* 1993) y físicos (Laayouni *et al.* 2000). Para *D. repleta* únicamente se dispone del mapa físico del cromosoma 2 (Ranz *et al.* 2001).

El tiempo de divergencia entre los diferentes subgrupos del grupo *repleta* se estima en 15-22 Ma (Spicer 1988; Russo *et al.* 1995). Por tanto podemos considerar este como el tiempo de divergencia entre *D. repleta* y *D. buzzatii* (ver Figura 3).

1.4 Genómica comparada

La genómica es el estudio de la estructura y organización de genomas completos. Se divide en dos áreas básicas: la genómica estructural se ocupa de la caracterización de la naturaleza física de los genomas y la genómica funcional encargada de la caracterización del proteoma y de los patrones globales de expresión génica. La genómica estructural comparada examina a partir de la comparación de los mapas genéticos o físicos las propiedades del genoma en especies diferentes.

1.4.1 Mapas genéticos y mapas físicos. Cartografía comparativa

La primera especie en la que se construyó un mapa genético fue *Drosophila melanogaster*. En 1913 Sturtevant descubrió que la proporción de progeñie recombinante observada en un cruzamiento se podía utilizar como medida de la distancia entre genes: cuanto más alejados están dos genes en un cromosoma mayor es la probabilidad de que un entrecruzamiento los separe. En los mapas genéticos la unidad de distancia es la unidad de mapa (u.m.) o el centimorgan (cM) que equivale a la distancia entre dos marcadores para los que la frecuencia de recombinación es del 1%.

La relación entre la distancia real de mapa y la frecuencia de recombinación entre dos marcadores o loci no es lineal. Cuanto más separados están los marcadores peor es la estima debido a que hay entrecruzamientos que no son detectados y a que los entrecruzamientos no se producen al azar sino que la presencia de un entrecruzamiento inhibe la formación de un segundo entrecruzamiento en las zonas próximas al primero (fenómeno de interferencia). Las funciones de mapa son funciones matemáticas que

permiten obtener mejores estimas de la distancia de mapa ya que corrigen para los entrecruzamientos no detectados y en algunos casos tienen en cuenta la interferencia.

Los mapas genéticos no coinciden exactamente con los mapas físicos ya que la frecuencia de recombinación no es igual a lo largo de todo el cromosoma. Por ejemplo en *Drosophila* la frecuencia de recombinación es inferior en las zonas teloméricas y centroméricas.

En los mapas físicos de baja resolución (mapas citológicos o cromosómicos) los marcadores se asignan a porciones más o menos grandes de los cromosomas. La distancia se mide en bandas, que en el caso de los cromosomas metafásicos contienen varias megabases de DNA y en el caso de los cromosomas politénicos de *Drosophila* varias kilobases. En los mapas físicos de alta resolución los genes se sitúan en la molécula de DNA. La distancia de mapa se mide en kilobases o pares de bases (Strachan y Read 1996).

La comparación de los mapas físicos de dos especies permite identificar los segmentos cromosómicos que se han conservado a lo largo de la evolución de estas especies y estimar el número mínimo de reordenaciones cromosómicas necesarias para transformar el genoma de una especie en el de la otra (Nadeau y Sankoff 1998a).

Un segmento conservado se define como la región cromosómica en la que el orden relativo de marcadores contiguos es idéntico en las dos especies comparadas (Nadeau y Sankoff 1998a). Los genes que forman un segmento conservado pueden representar combinaciones de genes que interactúan funcionalmente y que por tanto son mantenidos juntos por la selección natural (Randazzo *et al.* 1993; Maier *et al.* 1993; Wright 1996). Sin embargo, debido a que todos los genomas están interrelacionados, es decir, tienen un antepasado común, estos segmentos conservados pueden ser también el resultado de la fijación de un número limitado de reordenaciones cromosómicas con puntos de rotura al azar desde la divergencia de las dos especies (Nadeau y Taylor 1984; Nadeau y Sankoff 1998a).

La identificación de segmentos cromosómicos conservados a lo largo de la evolución de especies pertenecientes a diferentes taxones sugiere que es posible la construcción de mapas genéticos unificados para grupos de organismos. Esto implica que puede transferirse información de las especies mejor estudiadas a otras que no lo han sido tanto. A pesar de que se dispone de mapas físicos para un número elevado de especies tanto de plantas (Devos y Gale 2000) como de animales (Murphy *et al.* 2001)

Drosophila sigue siendo un buen modelo para la realización de estudios de comparación de genomas. La construcción de las primeras genotecas en *D. melanogaster* (cósmidos, fagos P1, cromosomas artificiales de levadura) permitió la construcción de mapas físicos de alta resolución de cromosomas enteros en esta especie (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Hartl *et al.* 1994; Cai *et al.* 1994; Madueño *et al.* 1995). Posteriormente el genoma de *D. melanogaster* fue secuenciado (Adams *et al.* 2000) facilitando así los estudios comparativos.

1.4.2 Tasas de evolución cromosómica

Los estudios de cartografía comparativa muestran que las especies evolutivamente próximas acumulan menos reordenaciones y por lo tanto tienen segmentos conservados más grandes mientras que las especies más alejadas acumulan más reordenaciones y tienen segmentos conservados más pequeños (Ehrlich *et al.* 1997). Sin embargo esta tendencia tiene excepciones, hay líneas filogenéticas que muestran una conservación considerable mientras que otras presentan una gran cantidad de reordenaciones. Por ejemplo, la tasa de reordenaciones cromosómicas en la línea filogenética que conduce al ratón es el doble que la tasa en la línea que conduce al hombre (Burt *et al.* 1999). Estos diferentes patrones de evolución cromosómica se pueden explicar en términos de diferentes tasas de mutación, fluctuaciones en el tamaño de población o diferencias en el tiempo de generación entre los organismos comparados.

Se ha propuesto que además de haber diferencias en la tasa de evolución cromosómica entre diferentes linajes evolutivos existen también diferencias dentro de una misma especie entre diferentes elementos cromosómicos. La tasa de evolución cromosómica parece verse afectada por el hecho de que el cromosoma sea un autosoma o un cromosoma sexual. Charlesworth *et al.* (1987) proponen que la tasa de fijación de reordenaciones cromosómicas subdominantes y reordenaciones parcial o totalmente recesivas es más elevada en el cromosoma X (debido a que los machos son hemicigóticos) que en los autosomas, y señalan que en el género *Drosophila* hay más inversiones paracéntricas fijadas en el X que en los autosomas. Estos autores proponen también que comparados con los loci autosómicos los loci ligados al X tienden a evolucionar más rápido bajo selección natural si las mutaciones favorables son parcial o totalmente recesivas. Bauer y Aquadro (1997) comparan la divergencia nucleotídica

entre 9 genes del cromosoma X y 9 genes de los cromosomas 2 y 3 en las especies *D. melanogaster* y *D. simulans*. Los niveles de divergencia nucleotídica no fueron significativamente diferentes entre autosomas y cromosomas sexuales aunque los dos tipos de posiciones estudiadas, intrónicas y silenciosas, eran ligeramente más divergentes en el cromosoma X.

El cromosoma X ha jugado probablemente un papel importante durante la diferenciación genética asociada a la especiación. Por ejemplo en *Drosophila* muchos genes de esterilidad híbrida están ligados al cromosoma X (Orr 1997) y en ratones el cromosoma X tiene un número muy elevado de genes implicados en la formación de esperma (Wang *et al.* 2001). No se sabe si esta especialización funcional del cromosoma X podría estar relacionada con la diferente dinámica evolutiva de autosomas y cromosomas sexuales. Además el cromosoma X debe contener secuencias dispersas a las que se unan proteínas específicas y moléculas de RNA no codificantes implicados en los mecanismos de compensación de dosis (Kelley y Kuroda 1995; Stuckenholz *et al.* 1999). Rice (1984) predice que no sólo los mecanismos de determinación sexual sino también los genes implicados en la evolución del dimorfismo sexual estarían localizados mayoritariamente en el cromosoma X.

Los autosomas también pueden presentar tasas de evolución variables. Por ejemplo en algunos grupos de especies, como el grupo de especies Hawaianas, el grupo *melanica* o el grupo *repleta*, el número de inversiones polimórficas y fijadas descritas varía entre los diferentes elementos cromosómicos (Krimbas y Powell 1992; Tonzetich *et al.* 1988).

Existen algunos trabajos de cartografía comparativa que comparan las tasas evolutivas entre diferentes elementos cromosómicos. Estos estudios utilizan dos aproximaciones diferentes: el análisis de regiones cromosómicas pequeñas (Nurminsky *et al.* 1996; Vieira *et al.* 1997c; Ranz *et al.* 1999) y la construcción de mapas físicos de cromosomas enteros (Segarra *et al.* 1995; Vieira *et al.* 1997a; Ranz *et al.* 2001). En la Tabla 4 se recopilan las tasas de fijación de reordenaciones cromosómicas estimadas en el género *Drosophila*.

Nurminsky *et al.* (1996) analizan la organización molecular de una región de 1,6 Mb de *D. melanogaster* en *D. virilis*. Esta región autosómica contiene el gen *Adh* y está localizada en el elemento cromosómico B. Extrapolan el número de inversiones fijadas en esta región, calculada únicamente a partir de tres marcadores, a la totalidad del

genoma y obtienen una estima de 1 inversión fijada por genoma y por millón de años. Esta tasa de fijación de inversiones contrasta con la obtenida por Vieira *et al.* (1997c) basada en el análisis de 10 marcadores provenientes de una región de 2 Mb del cromosoma X (elemento A) de *D. melanogaster* en *D. virilis*. Obtienen una estima de 1,98 inversiones fijadas por genoma y por millón de años. Los autores concluyen que la diferencia entre las tasas de evolución del genoma obtenidas a partir del estudio de una región del cromosoma X y de una región autosómica sugiere que el cromosoma X evoluciona más rápido que los autosomas. Mediante cartografía comparativa de marcadores en 3 especies del grupo *virilis* Vieira *et al.* (1997a; 1997c) encuentran que el cromosoma X (elemento A) tiene hasta cuatro veces más inversiones que el cromosoma 3 (elemento D). Este resultado parece apoyar la hipótesis de una mayor tasa evolutiva del cromosoma X respecto a la de los autosomas. Sin embargo, los autores destacan que en ese mismo grupo de especies la tasa evolutiva del cromosoma 2 (elemento E) es sólo ligeramente inferior a la del cromosoma X.

Ranz *et al.* (1999) estudiaron la organización de una región de 1,6 Mb del cromosoma 3R de *D. melanogaster* (elemento E) en las especies *D. repleta*, *D. buzzatii* y *D. virilis*. Obtienen una tasa de fijación de inversiones para este elemento cromosómico de 0,72 inversiones fijadas por millón de años. Posteriormente Ranz *et al.* (2001) comparan la distribución de 158 marcadores en el elemento cromosómico E entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*. Estiman una tasa de 0,92 inversiones fijadas por millón de años durante la divergencia de estas especies. Estos autores destacan que esta estima es similar a la obtenida por Segarra *et al.* (1995) para el cromosoma X.

Los datos empíricos obtenidos no son por tanto concluyentes respecto a la existencia de una mayor tasa evolutiva del cromosoma X comparada con la tasa evolutiva de los autosomas en el género *Drosophila*.

Tabla 4. Estimaciones de la tasa de fijación de reordenaciones en diferentes elementos cromosómicos en el género *Drosophila*.

Especies comparadas	Tiempo de divergencia (Ma)	Elemento cromosómico estudiado	Número marcadores	Tasa fijación inversiones /Ma	Referencia
<i>D. melanogaster-D. pseudoobscura</i>	30	A	32	1	Segarra <i>et al.</i> 1995
<i>D. melanogaster-D. virilis</i>	40	A	10	0,4	Vieira <i>et al.</i> 1997c
<i>D. virilis-D. montana</i>	9	A	46	0,61	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. virilis-D. novamexicana</i>	3,8	A	48	0,39	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. novamexicana-D. montana</i>	9	A	46	0,61	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. melanogaster-D. virilis</i>	40	B	3	0,19	Nurminsky <i>et al.</i> 1996
<i>D. virilis-D. montana</i>	9	D	43	0,11	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. virilis-D. novamexicana</i>	3,8	D	43	0,13	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. novamexicana-D. montana</i>	9	D	43	0,17	Vieira <i>et al.</i> 1997a
<i>D. virilis-D. montana</i>	9	E	34	0,44	Vieira <i>et al.</i> 1997c
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	E	41	0,72	Ranz <i>et al.</i> 1999
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	E	158	0,92	Ranz <i>et al.</i> 2001

1.4.3 Dinámica evolutiva del genoma eucariótico

Las tasas de evolución cromosómica expresadas como número de puntos de rotura fijados entre dos especies por megabase y por millón de años, permiten hacer comparaciones entre diferentes organismos. En la Tabla 5 se muestran algunas de las estimas obtenidas a partir de la comparación de mapas entre especies. Cuando se comparan estas tasas se observa que la estima para el número de puntos de rotura fijados en las especies del género *Drosophila* (Ranz *et al.* 2001) es 3,5 veces superior a la estima obtenida para las especies de plantas más dinámicas (*Arabidopsis thaliana* y *Brassica nigra*, Lagercrantz 1998) y dos ordenes de magnitud superior al resto de estimas (Tanksley *et al.* 1992; O'Brien *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2001). No se puede descartar que el número estimado de reordenaciones entre dos especies determinadas aumente cuando se hagan estudios más detallados como ya se ha visto en algunas especies de mamíferos (Sun *et al.* 1999; Puttagunta *et al.* 2000; Müller *et al.* 2000; Frönicke y Wienberg 2001). Sin embargo, las estimas para *Drosophila* siguen siendo superiores a las de mamíferos. Recientemente la comparación del orden de los genes en la secuencia del DNA de dos especies de levadura, *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Seoighe *et al.* 2000), ha permitido obtener una estima de la tasa de evolución de estas especies de 0,28 interrupciones por Mb y por Ma. Esta tasa es superior a la obtenida para *Drosophila* (Ranz *et al.* 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la resolución de las técnicas con las que se han realizado los dos trabajos es muy diferente y por tanto los resultados no son comparables. Además existen factores que pueden estar implicados en una mayor tasa evolutiva en el género *Drosophila*, entre ellos tiempo de generación más corto, y un menor efecto detrimental de las inversiones sobre la fertilidad (ver apartado 1.2.4.2).

La comparación de los mapas físicos de varias especies ha puesto de manifiesto que las inversiones tienen un papel principal en la dinámica evolutiva no solamente en *Drosophila* sino en los genomas eucariotas en general (Huynen *et al.* 2001). Seoighe *et al.* (2000) y Llorente *et al.* (2000) destacan la elevada frecuencia de inversiones a lo largo de la evolución de levaduras. La comparación de los mapas de humanos y del pez *Danio rerio* (zebrafish) sugiere que las inversiones han sido más frecuentes que las translocaciones aunque los dos tipos de cambio han jugado un papel importante a lo largo de la evolución del genoma de los vertebrados (Postlethwait *et al.* 2000).

Tabla 5. Tasas de evolución cromosómica en diferentes especies obtenidas a partir de la comparación de mapas.

Especies comparadas	Marcadores/Mb	Tamaño del genoma (Mb) ^a	Tiempo de divergencia (Ma)	Disrupciones por Mb y Ma	Referencia
<i>Lycopersicon/Solanum</i>	0,27	950	10	0,00052	Tanksley <i>et al.</i> 1992
<i>Arabidopsis thaliana/Brassica nigra</i>	2,91	145	35	0,018	Lagercrantz 1998
<i>Homo sapiens/Danio rerio</i>	0,76	3.000	450	0,00017	O'Brien <i>et al.</i> 1999
<i>Homo sapiens/Mus musculus</i>	0,86	3.000	110	0,00077	Kumar <i>et al.</i> 2001
<i>Mus musculus/Rattus norvegicus</i>	0,21	3.000	40	0,00049	Kumar <i>et al.</i> 2001
<i>D. melanogaster/D. repleta</i>	5,64	28	62	0,06567	Ranz <i>et al.</i> 2001

^a el tamaño del genoma es el de la especie que se utilizó como referencia en cada una de las comparaciones.

En algunas especies de mamíferos se ha visto que las inversiones son cuatro veces más frecuentes que las reordenaciones intercromosómicas (Müller *et al.* 2000). Estos resultados contrastan con lo propuesto por Ehrlich *et al.* (1997) según los cuales las translocaciones son cuatro veces más frecuentes que las inversiones en la evolución cariotípica de los mamíferos.

1.5 Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Comparar la organización molecular de la región *Adh* (elemento cromosómico B) de *D. melanogaster* con la de las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*. La región *Adh* fue la primera región del genoma de *D. melanogaster* completamente secuenciada y anotada. Disponer de toda esta información facilita el análisis de su dinámica evolutiva.
2. Obtener los mapas físicos de los cromosomas X (elemento cromosómico A) y 4 (elemento cromosómico D) en las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*. Para ello se hibridarán *in situ* marcadores provenientes de los cromosomas homólogos en la especie *D. melanogaster*. Los mapas comparativos permiten transferir información de las especies más estudiadas a otras que no lo han sido tanto facilitando así la identificación de marcadores moleculares próximos a genes o secuencias de interés y por tanto su posterior clonación.
3. Comparar la organización molecular de los elementos A y D entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta/D. buzzatii*. Esta comparación nos permitirá contrastar la hipótesis de la conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos y determinar qué tipo de cambios han sido más frecuentes a lo largo de la evolución cromosómica de estas especies.
4. Estimar el número de inversiones fijadas en los elementos cromosómicos A, B y D entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*. Comparar las tasas evolutivas de estos elementos cromosómicos entre sí y con la tasa previamente estimada para el elemento cromosómico E en estas mismas especies. En las especies del grupo *repleta* el elemento cromosómico E es el más dinámico y el elemento D el más conservativo. La comparación de estas estimas permitirá determinar si las diferentes tasas de evolución cromosómica observadas en el grupo *repleta* se mantienen a largas distancias filogenéticas y si el cromosoma X (elemento A) evoluciona más rápido que los autosomas como ha sido propuesto por varios autores.

5. Analizar los segmentos cromosómicos conservados durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta/D. buzzatii*. El análisis del tamaño y del contenido genético de los segmentos conservados proporciona información sobre si su conservación es debida a la acción de la selección natural o si son el resultado de la fijación de un número limitado de reordenaciones cromosómicas con puntos de rotura al azar.

6. Comparar la organización molecular de los elementos A, B y D entre las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*. La comparación de los mapas físicos permitirá comprobar si el número de inversiones fijadas entre estas dos especies y la posición de sus puntos de rotura han sido correctamente descritos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cepas utilizadas

Se han utilizado tres cepas, una para cada especie analizada. Para la especie *D. melanogaster* se utilizó la cepa Canton S (CS) y para la especie *D. repleta* la cepa 1611.1. Ambas provienen del *National Drosophila Species Resource Centre, Bowling Green*. Para la especie *D. buzzatii* se utilizó la cepa 39.13 que proviene de una población salvaje de Carboneras, España (Betrán *et al.* 1997). Las tres cepas son homocariotípicas para la ordenación estándar en todos los cromosomas (Lemeunier y Aulard 1992; Wasserman 1992).

2.2 Protocolos básicos

2.2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados han sido LB y TB. El medio LB se ha utilizado para la obtención de células competentes y el crecimiento de los clones génicos. Para fagos P1 y cósmidos se ha utilizado el medio TB. Este medio es más rico en nutrientes y permite obtener una mayor cantidad de DNA.

2.2.2 Preparación de placas de agar

1. Preparar medio LB.
2. Antes de esterilizar añadir 15 g/l de agar.
3. Esterilizar en el autoclave.
4. Dejar enfriar hasta 50°C antes de añadir sustancias termolábiles (por ejemplo antibióticos).
5. En caso de preparar directamente placas con Amp y/o X-gal, añadir 2 ml por litro de:
X-gal a 20 mg/ml
Amp a 25 mg/ml
6. Repartir el medio entre las placas a razón de unos 20 ml por placa.
7. Cuando el medio se haya solidificado se guardan las placas a 4°C en posición invertida. Las placas se han de sacar de la nevera 1 o 2 horas antes de usarlas para evitar la condensación de humedad.

2.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles se han hecho a una concentración de agarosa del 0,7%. Las electroforesis se realizaban habitualmente a 80V controlando la migración de las bandas mediante los colorantes azul de bromofenol y cianol xileno añadidos al tampón de carga. Los geles se tiñen una vez finalizada la electroforesis para no interferir con la migración del DNA. La tinción se hizo sumergiendo los geles durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio en H₂O destilada.

La estima de la concentración de DNA se realizó a partir de la comparación directa con un DNA de concentración conocida. La estima del tamaño de los fragmentos después de la digestión con enzimas de restricción se hizo comparándolos con DNA del fago digerido con la enzima *HindIII*.

2.3 Clonación de un fragmento de restricción de un clon

El proceso de clonación de un fragmento de restricción de un clon incluye varios protocolos. En primer lugar se extrae DNA del plásmido que queremos subclonar. A continuación se digiere el DNA plasmídico con una enzima de restricción y se separan los fragmentos en un gel de agarosa. Se extrae DNA de la banda o bandas del gel de agarosa que interese y se liga este DNA con DNA del plásmido que se va a utilizar como vector de clonación. El vector se habrá digerido previamente con la misma enzima de restricción con la que hemos digerido el DNA que queremos clonar. Como vector de clonación se ha utilizado el plásmido pBSK. Este plásmido presenta un sitio de clonación múltiple en el interior del gen *lacZ*. Tiene además el gen de resistencia al antibiótico ampicilina. El siguiente paso es transformar células competentes con el producto de la ligación. La cepa bacteriana utilizada ha sido la DH5 f'. Esta cepa presenta una deleción del gen *lacZ* que permite la selección de colonias recombinantes por α -complementación (Sambrook *et al.* 1989). Se siembra el producto de la transformación en placas de LB-ampicilina-Xgal. El antibiótico permite identificar aquellas colonias que han incorporado el plásmido. El Xgal es un análogo de la lactosa que permite diferenciar las colonias transformadas con un plásmido que ha incorporado el inserto (colonias blancas) de las colonias transformadas con plásmido sin inserto (colonias azules). Una vez identificadas las colonias blancas se resiembran y se extrae

DNA plasmídico que se digerirá de nuevo con la misma enzima de restricción que se ha utilizado para clonar. Esto permitirá comprobar que el clon ha incorporado el inserto que interesaba. Una vez comprobados los clones se pueden conservar a -70°C añadiendo a 750 μl de cultivo 250 μl de glicerol.

2.3.1 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

1. Inocular una colonia con el asa de Kohl en 3 ml de medio LB o TB al que se ha añadido previamente el volumen suficiente de solución de antibiótico. Dejar agitando toda la noche a 37°C .
2. Poner 1,5 ml de cultivo en un eppendorf, centrifugar 1 minuto y decantar. Añadir 1 ml más, centrifugar y decantar.
3. Eliminar bien el sobrenadante, decantando o con pipeta Pasteur.
4. Resuspender el sedimento en 100 μl de tampón de lisis celular frío (50 mM glucosa; 10 mM EDTA pH 8; 25 mM Tris HCl pH 8). Poner en hielo.
5. Añadir 200 μl de solución de desnaturalización (NaOH 0,2 M; SDS 1%) recién preparada. Se mezcla el contenido invirtiéndolo rápidamente hasta que quede casi transparente. Se mantiene el tubo en hielo durante 5 minutos.
6. Añadir 150 μl de tampón de neutralización frío (11,5 ml ácido acético glacial; 60 ml acetato potásico 5 M; 28,5 ml H_2O destilada). Se agita suavemente en posición invertida hasta que se forme un precipitado y se deja en reposo durante 10 minutos en hielo.
7. Centrifugar durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
8. Desproteínizar con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1). Agitar vigorosamente hasta su homogeneización.
9. Centrifugar 5 minutos. Transferir la fase acuosa a otro eppendorf.
10. Desproteínizar con 1 volumen de cloroformo-isoamilalcohol (24:1). Mezclar por inversión.
11. Centrifugar 1 minuto. Transferir la fase acuosa a otro eppendorf.
12. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar suavemente por inversión y dejar 10 minutos a -20°C .
13. Centrifugar 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
14. Añadir 500 μl de etanol al 70%. Centrifugar 5 minutos.
15. Secar el sedimento al vacío o al aire.

16. Disolver en 15-20 μl de tampón TE pH 7,5 y añadir 1 μl de solución de RNasa A (10 mg/ml). Incubar 30 minutos a 37°C.

2.3.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción

1. Preparación de la mezcla de reacción en un tubo eppendorf estéril:

x μl de DNA

1 μl de tampón concentrado x10

1 μl de enzima (o la cantidad mínima posible)

hasta 10 μl de agua destilada estéril

2. Centrifugación breve para hacer bajar las gotas.

3. Incubar a 37°C durante 2 horas.

2.3.3 Obtención de un fragmento de restricción de un gel

Se ha usado el *kit* GENE CLEAN[®] de la casa comercial BIO 101 Inc.

1. Se pone el gel teñido con bromuro de etidio sobre una placa de vidrio colocada sobre el transiluminador. Con la protección adecuada para la radiación UV se recorta con una cuchilla la parte del gel que contiene la banda que se quiere obtener.

2. El fragmento de gel se pesa dentro de un eppendorf tarado. Hay que procurar que el peso del fragmento de gel que se extrae no supere 0,4 g.

3. Se añaden 2,5 volúmenes de la solución de NaI para deshacer la agarosa.

4. Se pone en un baño a 55°C durante 5 minutos. Al cabo de 2 minutos se saca el tubo, se agita y se deja otra vez en el baño hasta completar los 5 minutos. Si la agarosa no se ha deshecho del todo hay que mantener las condiciones hasta conseguirlo.

5. Se añaden 5 μl de suspensión GLASSMILK[®]. El tubo que contiene la suspensión stock se debe agitar vigorosamente con el vórtex hasta resuspenderla completamente antes de tomar una alícuota.

6. Dejarlo en hielo durante 5 minutos. Cada 1 o 2 minutos comprobar si el material está en suspensión y agitarlo si hace falta.

7. Centrifugar durante 5 segundos y eliminar el sobrenadante.

8. Lavar el sedimento con 500 μl de solución NEW tres veces, con centrifugaciones de 5 segundos y resuspendiendo bien el sedimento (si es necesario pasarlo por la punta de la pipeta). La última eliminación del sobrenadante tiene que ser exhaustiva.

9. Elución del DNA: se resuspende el sedimento en 10 μ l de TE, se deja en el baño a 55°C 2 o 3 minutos y se centrifuga durante 30 segundos. Se recupera el sobrenadante que contiene al menos un 80% del DNA de la banda electroforética.

2.3.4 Ligación

1. Se pone en un tubo eppendorf:

x μ l de DNA del inserto

y μ l de DNA del vector digerido

hasta 8 μ l de agua destilada estéril

(generalmente las cantidades de inserto y de vector se ponen en relación 3:1)

2. Se deja a 65°C durante 5 minutos.

3. Se deja el tubo en hielo durante 10 minutos.

4. Centrifugación corta para hacer bajar las gotas.

5. Se añade:

1 μ l de tampón concentrado x10

1 μ l de ligasa

6. Se deja a 16°C toda la noche (o unas horas durante el día si los extremos son cohesivos).

7. Se puede hacer electroforesis de comprobación si interesa y si se dispone de material suficiente.

2.3.5 Obtención de células competentes

1. Cultivo de noche de células de la cepa DH5 f' en medio LB.

2. Inocular 20 ml de medio de cultivo LB con 0,2 ml de cultivo de noche. Se deja en agitación a 37°C hasta que la densidad óptica a longitud de onda 550 nm sea igual a 0,4 (aproximadamente 3 horas).

3. Enfriar el cultivo en hielo durante 20 minutos. Repartir en dos tubos de 10 ml.

4. Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm a 4° C.

5. Decantar el sobrenadante. Resuspender las células en 4,5 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril.

6. Dejar 30-45 minutos en hielo.

7. Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante.

8. Resuspender muy suavemente en 1 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril.
9. Dejar 1 hora en hielo.
10. Añadir un 15% de glicerol y hacer alícuotas de 50 o 100 µl que se guardarán a -70°C.

2.3.6 Transformación

1. Dejar descongelar una alícuota (50-100 µl) de células competentes en hielo.
2. Mezclar suavemente y en frío el DNA de la reacción de ligado con la alícuota de células competentes (el volumen de DNA no ha de superar el 10% del total para evitar problemas de ósmosis).
3. Se deja 20 minutos en hielo.
4. Se incuba 2 minutos a 42°C en un baño o estufa.
5. Se añade 1 ml de medio LB, previamente calentado a 37° C, y se mezcla suavemente.
6. Incubar 1 hora a 37°C.
7. Extender, con una asa de Digralsky, en placas de agar-Amp-Xgal a razón de 0,1 ml por placa.

2.4 Sondas

Se han utilizado como sondas un total de 218 clones que contienen DNA de la especie *D. melanogaster*: 36 clones génicos, 63 cósmidos y 119 fagos P1.

Clones génicos: las características de los clones génicos hibridados se detallan en la Tabla 6. En total se han hibridado 36 genes: 14 proceden del proyecto *Drosophila gene collection* (Rubin *et al.* 2000b) y los 22 restantes han sido proporcionados por diferentes autores.

Cósmidos: son plásmidos híbridos que contienen lugares *cos* en cada extremo. Los lugares *cos* son reconocidos durante el rellenado de las cabezas de los fagos . Este tipo de vectores permite clonar fragmentos de hasta 50 kb. Los 63 cósmidos utilizados en este trabajo (ver apartado 3.2) proceden de la genoteca del *European Drosophila Genome Project* (Madueño *et al.* 1995). El vector cosmídico utilizado en la construcción de esta genoteca es el Lorist6 (Gibson *et al.* 1987).

Tabla 6. Clones génicos hibridados en este estudio.

Gen	Nombre del clon	DNA	Inserto (kb)	Referencia
<i>ara</i>	<i>ara</i>	cDNA	2,8	Gómez-Skarmeta <i>et al.</i> 1996
<i>arm</i>	E9	cDNA	3,1	D. G. McEwen (comunicación personal)
<i>BR-C</i>	paaDm527	-	-	Andres <i>et al.</i> 1993
<i>caup</i>	<i>caup</i>	cDNA	4	Gómez-Skarmeta <i>et al.</i> 1996
<i>CG1559</i>	LD30316	cDNA	6,03	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG1716</i>	SD01656	cDNA	4,94	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG3585</i>	pDmY19S1b	Genómico	8	Kraemer <i>et al.</i> 1998
<i>CG4165</i>	LD34905	cDNA	4,06	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG6450</i>	SD02391	cDNA	4,68	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG7185</i>	LD25239	cDNA	2,8	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG7282</i>	LD25641	cDNA	5,11	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG7358</i>	GH14795	cDNA	3,5	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG11056</i>	LD44990	cDNA	3,98	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG12132</i>	LD28902	cDNA	5,86	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CG14616</i>	GH02989	cDNA	3,7	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>CKIIalpha</i>	pAPB21	cDNA	1,5	A. Bidwai (comunicación personal)
<i>CKIIbeta</i>	pAPB22	cDNA	0,94	A. Bidwai (comunicación personal)

<i>csw</i>	Y1.22	cDNA	-	Perkins <i>et al.</i> 1992
<i>Eip74EF</i>	pE74AcDNA	-	-	Andres <i>et al.</i> 1993
<i>fog</i>	SD02223	cDNA	4,58	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>Lsp1alpha</i>	pR ^a Lsp1_	Genómico	8	McClelland <i>et al.</i> 1981
<i>msl-3</i>	-	cDNA	1,9	Gorman <i>et al.</i> 1995
<i>peb</i>	GH10905	cDNA	5,76	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>Ptg1</i>	pB'	-	0,75	Andres <i>et al.</i> 1993
<i>rdgA</i>	GH23785	cDNA	5,26	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>RpII215</i>	LD43558	cDNA	5,01	Rubin <i>et al.</i> 2000b
<i>Rp21</i>	pKc1G	Genómico	4,4	Kay <i>et al.</i> 1988
<i>sd</i>	pNBE21	cDNA	3,2	Campbell <i>et al.</i> 1991
<i>Sgs4</i>	pRH0.75	Genómico	0,75	McGinnis <i>et al.</i> 1983
<i>sisA</i>	-	-	0,98	L. Sanchez (comunicación personal)
<i>sn</i>	P5	cDNA	3,3	Paterson y O'Hare 1991
<i>Yp1</i>	pYP1	Genómico	3,8	Barnett <i>et al.</i> 1980
<i>Yp2</i>	pYP2	Genómico	2	Barnett <i>et al.</i> 1980
<i>Yp3</i>	pYP3	Genómico	3,9	Barnett <i>et al.</i> 1980
<i>w</i>	pWXX	Genómico	4,8	O. Cabré (comunicación personal)
<i>Zw</i>	_DmG21	Genómico	13	Ganguly <i>et al.</i> 1985

Fagos P1: este tipo de vector permite clonar fragmentos de hasta 100 kb (Sternberg *et al.* 1990). Los 113 fagos utilizados en este estudio (ver apartados 3.2 y 3.3) provienen de la genoteca del *Berkeley Drosophila Genome Project* (Hartl *et al.* 1994; Kimmerly *et al.* 1996).

2.4.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA de plásmidos y cósmidos se ha hecho siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1. Para la extracción de DNA de fagos P1 se ha seguido también el mismo protocolo introduciendo modificaciones en los siguientes puntos:

1. Inocular una colonia con el asa de Kohl en 5 ml de medio TB al que se ha añadido previamente el volumen suficiente de solución de antibiótico y IPTG 1mM. Dejar agitando toda la noche a 37°C.
4. Resuspender el sedimento en 200 µl de tampón de lisis celular.
5. Añadir 300 µl de solución de desnaturalización.
6. Añadir 250 µl de tampón de neutralización.

2.5 Técnica de hibridación *in situ*

La técnica de hibridación *in situ* se basa en la hibridación específica de un ácido nucleico marcado con la secuencia o secuencias complementarias existentes en una sección de tejido, células o cromosomas preservados morfológicamente. Los principales pasos de la hibridación *in situ* (Figura 4) implican en primer lugar la preparación del material biológico y el marcaje de la sonda. El proceso de hibridación *in situ* propiamente dicho se puede dividir en 5 etapas: prehibridación, hibridación, posthibridación, revelado y visualización (Leitch *et al.* 1994).

Durante la prehibridación se eliminan las proteínas básicas que podrían interaccionar con la sonda y se deshidrata el material biológico sumergiéndolo en etanoles a diferentes concentraciones. Este último paso asegura que la sonda no se disuelva en ningún resto residual de solución de prehibridación.

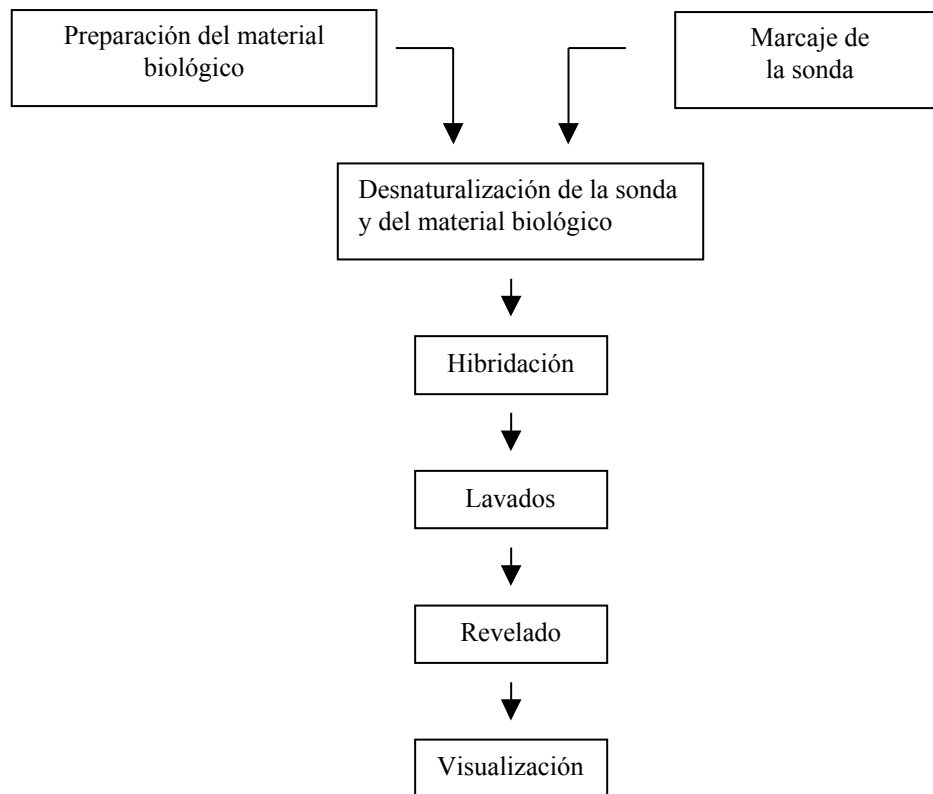


Figura 4. Esquema de los principales pasos de la técnica de hibridación *in situ*.

La hibridación comienza con la desnaturalización de la sonda y del material sobre el que se va a hibridar la sonda. Se han utilizado dos temperaturas de hibridación diferentes: 25°C cuando se hibridaban las preparaciones de *D. repleta* y *D. buzzatii* y 37°C para las preparaciones de *D. melanogaster*.

La temperatura y la concentración de sales de los lavados posthibridación determinan junto a la temperatura de hibridación y la concentración de moléculas desestabilizantes del DNA, como la formamida, la restricción con la que se está llevando a cabo la hibridación, es decir, el porcentaje aproximado de nucleótidos correctamente apareados entre la sonda y el DNA sobre el que se hibrida. La restricción aumenta al aumentar la temperatura, al aumentar la concentración de formamida o al disminuir la concentración de sales

El revelado de la sonda se basa en la utilización de una proteína de alta afinidad por la biotina, la avidina. Esta proteína lleva acoplada la enzima peroxidasa. La avidina se une a las moléculas de biotina y al añadir el sustrato de la peroxidasa (H_2O_2) se

produce la reacción liberándose cationes que son captados por un cromógeno, la diaminobencidina (DAB), que precipita dando lugar a una señal colorimétrica.

El protocolo de hibridación *in situ* utilizado ha sido el descrito por Montgomery *et al.* (1987) con pequeñas modificaciones.

2.5.1 Obtención de preparaciones cromosómicas

Para la obtención de preparaciones cromosómicas es necesario en primer lugar siliconizar los cubreobjetos y tratar los portaobjetos para aumentar la adherencia del material biológico y evitar así la pérdida de material durante el proceso de hibridación *in situ*. Para las hibridaciones con clones del cromosoma X de *D. melanogaster* se han utilizado preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de larvas hembra. La eficiencia de hibridación en el cromosoma X de las hembras es comparable a la de los autosomas mientras que el único cromosoma X de los machos muestra una tasa de hibridación reducida (Pardue *et al.* 1987).

2.5.1.1 Siliconizado de cubreobjetos

1. Hervir ácido clorhídrico 1 N en un vaso de precipitados.
2. Colocar 50-100 cubreobjetos y moverlos con una varilla mientras hierven durante 5 minutos.
3. Aclarar los cubreobjetos con H₂O destilada y dejar secar 20 minutos.
4. Sumergir los cubreobjetos uno a uno en etanol y dejar secar.
5. En una campana de gases pasar los cubreobjetos uno a uno por una solución Repel-Silane (20 g/l dimetilclorosilano en 1,1,1-triclorometano) y dejar secar dentro de la campana.
6. Lavar los cubreobjetos uno a uno en etanol y dejar secar. Guardarlos a temperatura ambiente en una caja protegidos del polvo.

2.5.1.2 Tratamiento de portaobjetos

1. Hervir ácido clorhídrico 1 N en un vaso de precipitados.
2. Colocar los portaobjetos de 20 en 20 y dejar hervir 5 minutos.

3. Poner los portaobjetos en una cubeta con H₂O destilada. Sacarlos y pasarlos uno a uno bajo un chorro de H₂O destilada. Opcionalmente se pueden dejar toda la noche en una cubeta con H₂O destilada.
4. Secar los portaobjetos durante una hora.
5. Poner los portaobjetos en una cubeta con solución SSC Denhart (0,012 g polivinilpirrolidona; 0,012 g ficoll; 0,012 g albúmina de suero bovino; 90 ml 20xSSC (3 M NaCl; 0,3 M Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O); 600 ml H₂O destilada) en una baño a 65°C. Dejarlos en esta solución entre 2 y 3 horas.
6. Poner los portaobjetos en una cubeta con etanol:ácido acético (3:1) durante 20 minutos.
7. Sumergir los portaobjetos durante 2 segundos unas 10 veces en una cubeta con etanol al 95%.
8. Dejar secar y guardarlos a 4°C.

2.5.1.3 Disección de las glándulas salivares

1. Lavar la zona de trabajo con alcohol.
2. Colocar una gota de ácido acético al 45% (recién preparado) sobre un portaobjetos limpio.
3. Poner sobre el acético una larva de tercer estadio y diseccionarla bajo la lupa con dos pinzas: unas sujetando la larva por la parte distal y las otras por la parte proximal. Estirar en línea recta de modo que queden a la vista las glándulas salivares.
4. Con dos alfileres finos eliminar la grasa que queda adherida a las glándulas.
5. Poner sobre un cubreobjetos siliconizado 8 µl de solución ácido láctico:H₂O destilada:ácido acético (1:2:3).
6. Transferir las glándulas a esta gota donde se dejan 8-10 minutos.
7. Dejar caer con cuidado un portaobjetos tratado sobre el cubreobjetos.
8. Girar el portaobjetos y mirarlo al microscopio. Se han de ver los núcleos y dentro de ellos los cromosomas separados por la acción del ácido láctico.
9. Picar sobre el cubreobjetos con una punta de pipeta para romper los núcleos y separar bien los cromosomas.
10. Poner un pliegue de papel absorbente sobre el cubreobjetos y presionar con el pulgar. Hay que evitar el desplazamiento del cubreobjetos para evitar que los cromosomas se rompan.

11. Observar las preparaciones al microscopio, seleccionar las mejores y colocarlas en una carpeta plana que se dejará en posición horizontal toda una noche.
12. Coger un portaobjetos y sumergirlo en nitrógeno líquido hasta que este deje de burbujear.
13. Colocar el filo de una cuchilla entre una esquina del cubreobjetos y el portaobjetos y tirar hacia arriba hasta que salte el cubreobjetos.
14. Colocar el portaobjetos en una cubeta con etanol al 95% un mínimo de 15 minutos.
15. Dejar secar los portaobjetos y mirar al microscopio para seleccionar las mejores preparaciones que se guardarán a 4°C hasta su hibridación.

2.5.2 Marcaje de sondas por el procedimiento de desplazamiento de mella

La reacción de desplazamiento de mella o “nick translation” se basa en la utilización de dos enzimas: DNasa I y DNA polimerasa. La DNasa I introduce cortes de cadena sencilla en la molécula de DNA. La actividad exonucleasa 5' 3' de la DNA polimerasa elimina mononucleótidos en el extremo 5' del nick. Esta enzima cataliza también la incorporación de nucleótidos marcados y no marcados a las dos cadenas del DNA. El parámetro más crítico en la reacción de “nick translation” es la actividad DNasa I. Si la actividad es demasiado baja la incorporación de nucleótidos marcados es muy baja y las sondas serán demasiado largas. Si es demasiado alta las sondas serán demasiado pequeñas (Leitch *et al.* 1994).

1. Poner en un eppendorf:
 - x μ l de sonda (concentración final 500 ng)
 - y μ l de H₂O estéril hasta un volumen final de 16 μ l
2. Añadir 2,5 μ l de buffer de la reacción de marcaje (100 mM DTT; 100 mM Cl₂Mg; 500 mM Tris HCl pH 8; 1 μ g/ μ l de gelatina).
3. Añadir 3,75 μ l de nucleótidos no marcados (5 mM dATP; 5 mM dGTP; 5 mM dCTP).
4. Añadir 1,25 μ l de 16-biotina-UTP o de digoxigenina-UTP.
5. Añadir 1 μ l de DNasa que previamente hemos disuelto en SM gel (6 mM NaSO₄ x 7H₂O; 0,099 M ClNa; 0,05 M Tris HCl 1 M pH 7,5; 0,1 μ g/ml gelatina).
6. Añadir 0,5 μ l de DNA polimerasa I.
7. Centrifugación corta.

8. Colocar en un baño que esté entre 12°C -14°C durante 90 minutos.
9. Centrifugación corta.
10. Añadir 1,5 µl de EDTA 0,5 M.
11. Incubar en un baño de 65°C durante 5 minutos.
12. Poner en hielo y añadir 2,9 µl de NaOAc 3 M y 58 µl de etanol absoluto frío.
13. Agitar y guardar a -20° C.

Antes de hibridar la sonda se ha de precipitar:

1. Centrifugar la sonda marcada a 4°C durante 15 minutos.
2. Resuspender el DNA en solución de hibridación (10% 20xSSC; 20% dextrán sulfato al 50%; 50% formamida; 8% esperma salmón 5 mg/ml; 12% H₂O estéril).

2.5.3 Prehibridación

1. Incubación de las preparaciones cromosómicas en 2xSSC durante 30 minutos en un baño a 65°C.
2. Poner las preparaciones en una cubeta con etanol al 70% durante 5 minutos.
3. Pasar las preparaciones a otra cubeta de etanol 70% donde se dejarán otros 5 minutos.
4. Pasar las preparaciones a otra cubeta con etanol 95% durante 5 minutos.
5. Dejar secar las preparaciones cromosómicas (mínimo 15 minutos).

2.5.4. Hibridación

1. Poner las preparaciones en una cubeta con solución de desnaturalización (NaOH 0,07 N) durante 2 minutos.
2. Pasar las preparaciones a una cubeta con 2xSSC durante 5 minutos. Repetir 2 veces.
3. Poner las preparaciones en una cubeta con etanol 70% durante 5 minutos. Repetir la operación con otra cubeta de etanol 70% y una tercera con etanol al 95%.
4. Dejar secar las preparaciones al menos 15 minutos.
5. Desnaturalizar la sonda incubándola a 65°C durante 15 minutos.
6. Hacer un pulso para que baje el líquido evaporado y mantener la sonda en hielo.
7. Añadir 20 µl de sonda a la preparación cromosómica.
8. Poner un cubreobjetos sobre la zona donde se ha añadido la sonda. Si quedan burbujas eliminarlas con la punta de la pipeta.

9. Colocar la preparación cromosómica en una cámara húmeda que se incubará un mínimo de 14 horas a 25°C o 37°C.

2.5.5 Posthibridación

1. Poner las preparaciones cromosómicas en una cubeta con 2xSSC a 37°C durante 10 minutos.
2. Repetir la operación con otra cubeta también con 2xSSC a 37°C otros 10 minutos.
3. Pasar las preparaciones a una cubeta de 2xSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos. Repetir la operación.
4. Poner las preparaciones en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos.

2.5.6 Revelado

1. Añadir a 0,210 µl de solución I (10 ml Tris 50 mM pH 7,6; 4% de albúmina de suero bovino) 3,5 µl de reactivo A y 3,5 µl de reactivo B del kit Elite (Laboratorios Vector).
2. Añadir a cada preparación 20 µl de la solución anterior.
3. Poner un cubreobjetos sobre la zona donde se ha añadido la solución. Si quedan burbujas eliminarlas con la punta de la pipeta.
4. Poner las preparaciones en una cámara húmeda y incubar a 37°C durante 45 minutos.
5. Poner las preparaciones en 1xPBS durante 10 minutos. Repetir dos veces.
6. Añadir a cada preparación 500 µl de solución III (5 µg de diaminobencidina; 1 ml de Tris HCl 50 mM pH 7,6; 1 µl de H₂O₂).
7. Poner las preparaciones en una cámara húmeda y incubar a 37°C durante 45 minutos.
8. Poner las preparaciones en 1xPBS de 5 minutos a 1 hora.
9. Preparar la solución de tinción añadiendo 5 ml de Giemsa a 100 ml de tampón P (40% de NaH₂PO₄H₂O 50 mM; 60% Na₂HPO₄ 12 H₂O 50 mM).
10. Poner las preparaciones en la solución de tinción durante 1 minuto.
11. Poner las preparaciones en una cubeta con H₂O destilada. Repetir en otra cubeta de H₂O destilada.
12. Dejar secar las preparaciones.
13. Añadir a cada preparación una gota de montador de preparaciones biológicas y poner un cubreobjetos.

2.5.7 Visualización de las señales de hibridación

Las preparaciones hibridadas se han observado con un microscopio Nikon Optiphot-2. Se tomaron fotografías de las preparaciones cromosómicas utilizando las películas EKTAR-25 y Royal Gold 25 ASA de Kodak. Las señales de hibridación tienen un color rosado o azul intenso que contrasta con el color azul-liláceo de los cromosomas. Ejemplos de estas fotografías se muestran en los apartados 3.2 y 3.3.

2.6 Técnica de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* de fluorescencia permite la hibridación simultánea sobre la misma preparación cromosómica de dos clones diferentes. Para ello se deben marcar de forma diferencial los clones. Se ha utilizado 16-biotina-dUTP y digoxigenina-dUTP. Cuando la sonda estaba marcada con biotina el revelado se basa en la utilización de estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy3 o Texas red. Las sondas marcadas con digoxigenina se revelan mediante anticuerpos anti-digoxigenina marcados con el fluorocromo FITC. El protocolo de obtención de preparaciones cromosómicas es el detallado en el apartado 2.5.1.

El protocolo de hibridación *in situ* de fluorescencia se divide también en cinco etapas: prehibridación, hibridación, posthibridación, revelado y detección. El protocolo de prehibridación y hibridación son exactamente iguales a los descritos en los apartados 2.5.3 y 2.5.4. En cuanto a la posthibridación el protocolo de FISH tiene los cuatro pasos descritos en el apartado 2.5.5 y un quinto paso. El revelado de la sonda se hace siguiendo un protocolo diferente.

2.6.1 Posthibridación

1. Poner las preparaciones cromosómicas en una cubeta con 2xSSC a 37°C durante 10 minutos.
2. Repetir la operación con otra cubeta de 2xSSC a 37°C otros 10 minutos.
3. Pasar las preparaciones a una cubeta de 2xSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos. Repetir la operación.
4. Poner las preparaciones en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos.

5. Poner las preparaciones en una cubeta con solución de bloqueo (4% de leche en polvo; 4xSSC) durante 20 minutos.

2.6.2 Revelado

El protocolo de revelado varía si la hibridación se realiza sobre los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* o sobre los cromosomas de *D. repleta*/*D. buzzatii*. En este último caso es necesario amplificar la señal. En ambos casos el revelado se debe hacer en la oscuridad.

El revelado de las sondas hibridadas sobre preparaciones de *D. melanogaster* se hizo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Añadir 100 µl de una solución formada por una dilución 1/200 del anticuerpo de oveja anti-digoxigenina conjugado con FITC y 1/250 de estreptavidina conjugada con Cy3 o Texas red.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Poner las preparaciones en una cubeta con 4xSSC y 0,05% Tween 20% en un baño a 42°C durante 10 minutos.
4. Poner las preparaciones en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 20 µl de montador de preparaciones biológicas y poner un cubreobjetos.
6. Guardar la preparaciones en la oscuridad a 4°C.

Para aumentar la sensibilidad en el revelado de las hibridaciones sobre preparaciones de las especies *D. repleta*/*D. buzzatii* se amplificó la señal. Para ello se añadieron 2 capas más de reactivos de revelado lo que resulta en una amplificación exponencial de la señal. El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Añadir 100 µl de una solución formada por una dilución 1/200 del anticuerpo anti-digoxigenina de ratón (0,5 µg/ml) y 1/250 de estreptavidina Cy3.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Poner las preparaciones en una cubeta con 4xSSC y 0,05% Tween 20% en un baño a 42°C durante 15 minutos.
4. Añadir 100 µl de una solución formada por una dilución 1/100 de anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con digoxigenina (2µg/ml) y 1/250 de biotina.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

6. Poner las preparaciones en una cubeta con 4xSSC y 0,05% Tween 20% en un baño a 42°C durante 15 minutos.
7. Añadir 100 µl de una solución formada por 1/100 de anticuerpo de oveja anti-digoxigenina conjugado con FITC (2µg/ml) y 1/250 de estreptavidina conjugada con Cy3 o Texas red.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
9. Poner las preparaciones en una cubeta con 4xSSC y 0,05% Tween 20% en un baño a 42°C durante 10 minutos.
10. Poner las preparaciones en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Añadir 20µl de montador de preparaciones biológicas y poner un cubreobjetos
12. Guardar las preparaciones en la oscuridad a 4° C.

2.6.3 Visualización de las señales de hibridación

Las preparaciones hibridadas con la técnica de FISH se han observado con un microscopio confocal Bio-Rad MRC 600. Las imágenes capturadas con este microscopio se visualizaban utilizando el programa Photoshop (Adobe). Algunos ejemplos de hibridaciones realizadas con la técnica de FISH se muestran en el apartado 3.1.

2.7 Localización de las señales de hibridación

El resultado de una hibridación se considera positivo cuando la señal o señales se observan en la misma localización de un determinado cromosoma en varios núcleos de la preparación. Para asignar las señales de hibridación a la banda cromosómica correspondiente se utilizaron los siguientes mapas: el mapa de Lefevre para la especie *D. melanogaster* (Lindsley y Zimm 1992), el mapa de Wharton (1942) para *D. repleta* y una reconstrucción del mapa de *D. buzzatii* basada en el mapa de *D. repleta* (Ruiz y Wasserman 1993).

2.8 Secuenciación de STS

La construcción de los mapas físicos en la especie *D. melanogaster* incluía la secuenciación de los extremos de los clones genómicos, cósmidos y fagos P1, para así obtener “sequence tagged sites” o STS (Madueño *et al.* 1995; Hartl *et al.* 1994). Sin embargo, para algunos de estos clones no se consiguió obtener estas secuencias.

En el presente trabajo se intentaron secuenciar utilizando los primers T7 y/o SP6 los extremos de 10 cósmidos y 3 fagos P1 para los que sólo se disponía de una o de ninguna STS terminal. De esta muestra de 13 clones solo se obtuvo una STS de los cósmidos 143G11, 11G9 y 144B11 (ver apartado 3.2.4). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el algoritmo BLASTN.

2.9 Estima de las tasas de evolución cromosómica

Para estimar las tasas de evolución cromosómica de los elementos A y D se compararon los mapas de *D. melanogaster* con los de *D. repleta*. Los mapas de *D. repleta* incluyen los marcadores hibridados en el presente estudio y también los marcadores cartografiados por otros autores en las especies *D. repleta* y/o *D. buzzatii* (Tabla 7). Para algunos marcadores la localización en *D. repleta* se ha inferido a partir de su localización en *D. buzzatii*. Los cromosomas analizados son homosecuenciales en estas dos especies con la excepción de tres regiones invertidas en el cromosoma X. La estima de la tasa evolutiva del elemento B se extrapoló a partir del resultado obtenido para la región *Adh*.

El primer paso es el posicionamiento en la secuencia de todos los clones hibridados con éxito en *D. melanogaster* y *D. repleta* y/o *D. buzzatii*. La mayoría de clones genómicos (cósmidos y fagos P1) hibridados tienen STS terminales (Madueño *et al.* 1995; Hartl *et al.* 1994; Kimmerly *et al.* 1996) que permiten saber su localización exacta en la secuencia del genoma de *D. melanogaster* (Adams *et al.* 2000). Cuando sólo había sido secuenciada una de las dos STS terminales, el tamaño promedio del inserto para cada tipo de clon, 80kb los fagos P1 (Hartl *et al.* 1994) y 40 kb los cósmidos (Madueño *et al.* 1995), y su orientación física se tuvieron en cuenta a la hora de posicionarlos en la secuencia.

Tabla 7. Marcadores localizados por otros autores en las especies *D. repleta* y/o *D. buzzatii*.

Marcador	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. repleta</i> / <i>D. buzzatii</i>	Referencia
<i>sc</i>	X(1B3)	X(B3ab) ^b	H. Naveira (comunicación personal)
<i>br</i>	X(2B3-5)	X(A1) ^r	Kokoza <i>et al.</i> 1992
<i>dor</i>	X(2B6)	X(A1) ^r	Kokoza <i>et al.</i> 1992
<i>hfw</i>	X(2B6)	X(A1) ^r	Kokoza <i>et al.</i> 1992
156H1 [#]	X(3A)	X(F1g)	Ranz 1998
<i>crb</i> *	X(3B)	X(B3f)	Ranz <i>et al.</i> 1999
<i>Act5C</i>	X(5C2-5)	X(D2h-3a)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>Fum</i>	X(5D5)	X(D3b-e) ^b	Naveira <i>et al.</i> 1986
<i>Ubi-p5E</i>	X(5E)	X(C3a)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>Sxl</i>	X(6F5)	X(C1g-h) ^b	H. Naveira (comunicación personal)
13F10 [#]	3L(61B1-3)	4(B1i)	Ranz 1998
<i>kls</i>	3L(61C4)	4(A1g) ^b	Laayouni <i>et al.</i> 2000
<i>Hsp83</i>	3L(63C1)	4(E2b)	Ranz 1998
<i>Ubi-p63E</i>	3L(63F2-4)	4(B1d)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>ImpL2</i>	3L(64B2)	4(A3a)	Ranz 1998
<i>ImpE1</i>	3L(66C1-3)	4(B3a)	Ranz 1998
<i>Hsp22-Hsp26</i>	3L(67B1)	4(D1a)	Ranz 1998
<i>Hsp23-Hsp27</i>	3L(67B1)	4(D1a)	Ranz 1998
<i>Sod</i>	3L(68A8-9)	4(F4c)	Ranz 1998
CG10632	3L(69C4-8)	4(C3g) ^b	Laayouni <i>et al.</i> 2000
<i>Hsc70-1</i>	3L(70C)	4(F4a)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>Pgm</i>	3L(72D1-5)	4(A1a-g) ^b	Naveira <i>et al.</i> 1986
<i>tra</i>	3L(73A8-9)	4(A3c)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>Rh4</i>	3L(73D3-5)	4(F2g-h)	Ranz 1998
<i>sina</i>	3L(73D)	4(B4c)	Ranz 1998
DS00004 [#]	3L(76B3-4)	4(E5e)	Ranz 1998
<i>kni</i>	3L(77E1-2)	4(E3a)	Ranz <i>et al.</i> 1997
<i>Act79B</i>	3L(79B)	4(F1c)	Ranz <i>et al.</i> 1997

^b Clones hibridados solo en *D. buzzatii*

^r Clones hibridados solo en *D. repleta*;

[#] Clon incorrectamente etiquetado

Los clones para los que no se disponía de ninguna STS se posicionaron de acuerdo con su localización citológica (Hartl *et al.* 1994). Cada par de marcadores contiguos en el mapa de la especie *D. melanogaster* (la especie de referencia) delimita un segmento cromosómico de tamaño conocido. Para cada segmento cromosómico se comprobó si estaba o no conservado en la especie *D. repleta*. Se consideraron como segmentos conservados aquellos en los que el orden relativo de marcadores contiguos era equivalente en ambas especies. Los marcadores que producían una única señal de hibridación también se clasificaron como conservados. El resto de segmentos, segmentos no conservados, se asumió que contenían al menos un punto de rotura.

Se utilizó el método de máxima verosimilitud descrito en Ranz *et al.* (1997) para estimar el número de inversiones fijadas en cada elemento cromosómico analizado. Este método considera que si en un determinado elemento cromosómico hay m marcadores localizados en las dos especies comparadas en total hay $m+1$ segmentos, considerando el centrómero y el telómero como marcadores. El método requiere que el tamaño de los segmentos sea estimado en la especie de referencia siendo l_i la longitud relativa de cada segmento i respecto a la longitud total del elemento cromosómico. Cada segmento cromosómico se comprueba si está o no conservado en la otra especie.

Se asume que los puntos de rotura se distribuyen al azar a lo largo del elemento cromosómico. Si n es el número de inversiones fijadas entre las dos especies, $2n$ es el número de puntos de rotura. El número de puntos de rotura en un elemento cromosómico se aproxima a una distribución de Poisson (si $l_i \ll 0,1$ y $2n \gg 30$). Por tanto la probabilidad de que un segmento de longitud l_i esté conservado, es decir que contenga cero puntos de rotura, es e^{-2nl_i} y la probabilidad de que no esté conservado, es decir que contenga al menos un punto de rotura, es de $1 - e^{-2nl_i}$. La probabilidad conjunta de observar un número determinado de segmentos conservados, s , y no conservados $m+1-s$ es:

$$L = \prod_{i=1}^s (e^{-2nl_i}) \prod_{i=s+1}^{m+1} (1 - e^{-2nl_i})$$

El valor de n que maximiza L se encuentra haciendo cero la primera derivada del logaritmo neperiano de L :

$$\frac{d\ln L}{dn} = -2 \sum_{i=1}^s l_i + 2 \sum_{i=1}^{m+1} \frac{l_i}{(-1 + e^{3n l_i})} = 0$$

La varianza de la estima de n se puede calcular como el inverso de la cantidad de información I que es igual a:

$$I = - \frac{d^2 \ln L}{dn^2} = 4 \sum_{i=1}^{m+1} \frac{l_i^2 e^{2n l_i}}{(-1 + e^{3n l_i})^2}$$

Para el cálculo de las tasas de evolución cromosómica se utilizó 62 Ma como tiempo de divergencia entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* (Beverly y Wilson, 1984). Las estimas obtenidas son por tanto conservativas.