

3. RESULTADOS

3.1 Organización molecular de la región cromosómica *Adh* de *D. melanogaster* en *D. repleta* y *D. buzzatii*

La organización molecular de la región cromosómica de 1,944 Mb que rodea al locus *Adh* en *D. melanogaster* ha sido analizada en dos especies del grupo *repleta*: *D. repleta* y *D. buzzatii*. La gran cantidad de información genética y molecular y la disponibilidad de la secuencia de esta región en la especie *D. melanogaster* hacen que sea ideal para llevar a cabo estudios comparativos de su organización molecular en diferentes especies. Los resultados de este análisis, llevados a cabo en colaboración con el laboratorio de Michael Ashburner en la Universidad de Cambridge, se publicaron en la revista *Chromosome Research* volumen 8 páginas 375-385 con el título:

Molecular organization of the *Drosophila melanogaster Adh* chromosomal region in *D. repleta* and *D. buzzatii*, two distantly related species of the *Drosophila* subgenus
Josefa González, Esther Betrán, Michael Ashburner & Alfredo Ruiz.

3.2 Mapa físico del cromosoma X de *D. repleta* y *D. buzzatii*

Para elaborar el mapa físico del cromosoma X de *D. repleta* y *D. buzzatii* se han hibridado un total de 112 clones: 29 clones génicos, 63 cósmidos y 20 fagos P1. Todos estos clones contienen DNA del genoma de la especie *D. melanogaster*. Se hibridaron, en primer lugar, sobre los cromosomas politénicos de esta especie para comprobar que su localización coincidía con la esperada de acuerdo con lo descrito previamente por otros autores (Madueño *et al.* 1995; BDGP; FlyBase). Los clones que contenían DNA del cromosoma X se hibridaron después sobre los cromosomas de *D. repleta* y *D. buzzatii*.

3.2.1 Hibridaciones sobre *D. melanogaster*

Todos los clones se localizaron en la misma banda o en bandas adyacentes a las descritas previamente (Madueño *et al.* 1995; BDGP; FlyBase) a excepción de cuatro: los cósmidos 72A3, 87G7 y 93H7 y el P1 DS08585. El cósmido 72A3 hibridó en X(1D) en vez de en X (10A1-11); el cósmido 87G7 hibridó en X(8C) en vez de en X(14A1-9); el cósmido 93H7 hibridó en 2R(53D-E) en vez de en X(3B-C) y el P1 DS08585 hibridó en 3L(69A) en vez de en X(19C1-2). Probablemente esta hibridación diferencial sea debida a errores en el etiquetado de los clones durante la manipulación de las genotecas de manera que los nombres no fueron correctamente asignados. De estos clones, los que hibridaron en el cromosoma X o 3L de *D. melanogaster* se han utilizado para la elaboración del mapa físico de los cromosomas X y 4 respectivamente en *D. repleta* y *D. buzzatii* (ver Tabla 8 y apartado 3.3.1).

3.2.2 Hibridaciones sobre *D. repleta* y *D. buzzatii*

Los 110 clones que en *D. melanogaster* hibridaron en el cromosoma X se hibridaron también sobre los cromosomas politénicos de *D. repleta* y *D. buzzatii*. La localización de los 73 clones del cromosoma X de *D. melanogaster* que hibridaron en *D. repleta* y *D. buzzatii* se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Localización citológica de los 110 marcadores del cromosoma X de *D. melanogaster* hibridados en este estudio. En parentesis se indican los genes cuya localización se conoce en *D. repleta/D. buzzatii* y están incluidos en clones genómicos también hibridados.

Marcador	Señales de hibridación	
	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. repleta/D. buzzatii</i>
23E12	1A	A3i-k
125H10	1B1-4	C3b, B3ab
198A6 (<i>sc</i>)	1B1-4	B3ab
165H7	1B3-7	B3ab
171D11	1B2-7	A4f, B3ab, F4b
65F1	1B7-10	F4b
63B3	1B	-
11F6	1B1-10	-
72A3 [#]	1D	-
29F10	1E1-5	-
123F11	2B1-10	-
17A9	2B1-6	múltiples
<i>BR-C</i>	2B4-7	-
129E12 (<i>arm</i>)	2B9-16	A2d, B3f, C4a ^b
<i>arm</i>	2B15	C4a
<i>csw</i>	2D3	D3d
28C2	2E	A2d, B1h, D2f-g
155E2	3B2-4	B1e
95B7	3C1-12	-
<i>Sgs4</i>	3C	-
<i>w</i>	3C2	B4a
<i>Pig-1</i>	3C10-11	-
<i>CG6450</i>	4A2	C2d-e
84H4	4C1-16	múltiples ^b
<i>peb</i>	4C5-6	B1a-b
65G11	4D1-7	A4b, C3a, E1a, F1c-f ^b
<i>CG4165</i>	4F9	C3b
123D11	4F1-14	-

142A8	5B1-10	G1f-g
143G11 (<i>CG3585, Ubi-p5E</i>)	5D1-E8	A4f, C2h
<i>CG3585</i>	5D6-8	A4f
173C3 (<i>Fum</i>)	6B1-C13	D3f-g
60H5	6F1-7A8	C1g-h
125A5 (<i>Sxl</i>)	6F1-7A8	C1g-h ^b
DS05565	7A6-8	-
DS07048	7B	-
DS00188	7B1-6	E1d
190F5	7D1-22	A4a ^b
<i>sn</i>	7D	C1c-d ^f
DS05036	7E2-5	-
97G10	7F1-10	múltiples ^b
DS09021	8B5-8	E3b ^f
87G7 [#]	8C	-
DS07346	8C1-2	-
<i>rdgA</i>	8C4-7	E3d
164F6	8D1-12	E3g
190E8	8D1-12	D2c-d
<i>CG12132</i>	8D8	-
DS00473	8E1-4	-
<i>Yp2</i>	9A4-5	F1b
<i>Yp1</i>	9A4-5	F1b
32D11 (<i>Yp2</i>)	9A1-5	múltiples ^b
186C8	9F1-13	D1b
36A5	9F1-10A11	D1b
<i>Lsp1alpha</i>	10A	2(D3e)
11G9	10A1-2	B1e ^f múltiples ^b
DS02496	10A1-2	A1e-f
<i>sisA</i>	10B5-8	-
DS07965	10C1-2	-
<i>RpII215</i>	10C4-5	A1d-e
<i>CkIIbeta</i>	10E2-3	-

14E6	10F1-11	múltiples ^b
<i>CG1559</i>	10F6-7	G2b ^r
167B1	11B1-19	A3b
<i>CG11056</i>	11B14	A4d
61A7	11B1-C4	A3b
144B11	12A1-10	D3e ^b
<i>CG1716</i>	12A	X(F3g), 4(C3cd)
DS03614	12A3-10	-
DS05708	12B1-B2	-
<i>Yp3</i>	12BC	-
171A8	12E1-11	F2g, F2j
191A7	12D1-4	C3f
176C7	13E1-18	C3a
<i>sd</i>	13F1-3	C4c-e
8C2 (<i>sd</i>)	13D1-5	D1c-d
192D9	14F1-6	G2i ^b
116C6	14E1-4	F4a
143D3	14F1-15A11	B2e-f
148H11	15A1-11	H1f
DS05647	15E1-4	D1g ^r
189B1	15E1-F9	-
194F2	15F1-9	E3e
DS04269	15F6-9	F2h
96C3	16C1-10	B1b
56F9	16C1-10	B1b, B2b
199E12	16E1-F8	A3k ^b
114E10	16F1-8	F2b
DS07826	17A1-2	-
DS07843	17A5-12	-
37C10	17C1-7	E3a
DS07456	17D1-6	A4f
108H1	17D1-6	múltiples ^b
<i>CG7282</i>	17E4	B1g

CG7358	17E6	E4c-d
108C8	18C1-9	A2a ^b
60H9	18C1-9	A2a
94E9	18D1-13	D3j
173H11	18D1-13	B2f-g
Zw	18D	B1h ^f
163H9	19E1-8	B1b-c
DS03594	19D1-3	B1c-d, F3c
78D4	19F1-6	-
CG14616	20A1	-
fog	20A4-5	-
153F10	20A1-C3	G2d
DS02945	20A1-2	C1e ^f
DS08593	20A3	-
174F6	20A1-C3	4(G5d)
163A11	20D1-2	-

^b Clon hibridado sólo en *D. buzzatii*

^r Clon hibridado sólo en *D. repleta*

[#] Clon incorrectamente etiquetado.

En la Figura 5 se muestran ejemplos de dos de estas hibridaciones. La mayoría de clones (59/73) hibridaron en las dos especies del grupo *repleta* analizadas. Sin embargo, 8 clones hibridaron sólo en *D. buzzatii* y 6 clones sólo en *D. repleta* (ver Tabla 8). Esta hibridación diferencial en *D. repleta* y *D. buzzatii* podría ser debida a diferencias en la organización molecular del cromosoma X en estas dos especies. Por ejemplo se ha comprobado que en algunos casos la zona en la que hibridan estos clones no presenta la misma morfología en las dos especies: en una es una zona de bandas definidas mientras que en la otra es una zona descondensada. Uno de los clones que hibridó en las dos especies, el cósmido 11G9, en *D. repleta* dio una única señal en la banda B1e del cromosoma X mientras que en *D. buzzatii* dio señales múltiples en todos los cromosomas. Este es el único caso de un clon que muestra patrones de hibridación diferente en las dos especies del grupo *repleta* analizadas.

Figura 5. Resultados de las hibridaciones realizadas con el gen *corkscrew* (*csw*) y el cósmido 163H9. Los dos clones proceden del cromosoma X de *D. melanogaster*.

De los 37 clones restantes, 6 cósmidos (17A9, 84H4, 97G10, 32D11, 14E6 y 108H1) dieron señales múltiples en todos los cromosomas (Figura 6). Para uno de estos clones, 32D11 y para el clon 11G9 se repitieron las hibridaciones a 37°C y 30°C en lugar de a 25°C, que es la temperatura a la que se realizan las hibridaciones sobre *D. repleta/D. buzzatii*. La idea de utilizar temperaturas más restrictivas era la de eliminar las uniones más débiles y conservar aquella o aquellas en las que el porcentaje de apareamiento entre la sonda y su secuencia diana fuera más elevado. Sin embargo no se obtuvo ninguna señal de hibridación con ninguna de las dos temperaturas. Estos cósmidos contienen probablemente algún tipo de secuencia repetitiva responsable de este patrón de hibridación. Como se puede ver en la Figura 6 en el caso del cósmido 32D11 una de las señal de hibridación se observa en el telómero del cromosoma 2. Esto sugiere que este cósmido podría contener elementos transponibles. Debido a que no se han utilizado para la realización de los mapas estos 6 clones no se han contabilizado como resultados positivos de hibridación. Finalmente 31 clones no produjeron ninguna señal de hibridación.

Se analizó el contenido en DNA repetitivo y el porcentaje de GC de los 6 cósmidos que dieron señales de hibridación múltiple así como de una muestra de 6 cósmidos que dieron una única señal de hibridación (198A6, 155E2, 164F6, 96C3, 60H9 y 163H9) y de 4 cósmidos que no hibridaron (63B3, 11F6, 123F11 y 95B7). Se utilizó el programa RepeatMasker accesible en la dirección <http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask>. Este programa identifica secuencias repetidas de baja complejidad y secuencias repetitivas dispersas. Se comparó únicamente el contenido en DNA satélite puesto que la cepa de *D. melanogaster* que se utilizó para construir la genoteca de cósmidos no es la única que se utilizó para secuenciar el genoma de esta especie de manera que el contenido en elementos transponibles puede variar. Los cósmidos que dieron señales múltiples tienen en promedio un mayor porcentaje de DNA satélite (4,89%) comparados con los clones que dieron una única señal (3%) y los clones que no hibridaron (2,76%). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. El porcentaje más elevado de GC (46,23%) corresponde al grupo de cósmidos que dieron una única señal. Este porcentaje es sin embargo muy parecido al de cósmidos que no hibridaron (46,14%) y al de cósmidos que dieron señales múltiples (44,62%).

Figura 6. Resultados de las hibridaciones realizadas con el gen *Lsplalpha* y los cósmidos 32D11 y 11G9. Los tres clones proceden del cromosoma X de *D. melanogaster*.

De los 73 clones que han dado resultados positivos 70 hibridaron en el cromosoma X de *D. repleta* y/o *D. buzzatii* como era de esperar de acuerdo con las homologías cromosómicas establecidas (Tabla 1). Un clon génico (*CG1716*) dio dos señales de hibridación en dos cromosomas diferentes: X(F3g) y 4(C3c-d). La secuencia de este gen presenta homología con la secuencia de dos genes de *D. melanogaster* (BDGP): *absent, small, or homeotic discs 1 (ash1)* que está localizado en 3L(76B9) y *CG4976* localizado en 3R(98B2). Se ha interpretado la señal en el cromosoma X de *D. repleta* y *D. buzzatii* como la correspondiente al ortólogo del gen *CG1716* en estas especies. La señal del cromosoma 4 en *D. repleta* y *D. buzzatii* puede ser atribuida tentativamente al gen ortólogo de *ash1*. Los clones *Lsplalpha* y 174F6, que en *D. melanogaster* hibridaron en el cromosoma X, en *D. buzzatii* hibridaron en 2(D3e) y 4(G5d), respectivamente (ver Figura 6). Por lo tanto estos clones no fueron utilizados para la elaboración del mapa físico del cromosoma X en las especies del grupo *repleta* analizadas.

La mayoría de clones que dieron resultados positivos producían una única señal de hibridación en el cromosoma X de *D. repleta* y/o *D. buzzatii* (61/73), 5 clones (4 cósmidos y 1 fago P1) dieron 2 señales, 3 cósmidos dieron tres señales y 1 cósmido dio 4 señales. Para intentar dilucidar a que son debidas estas señales se hibridaron genes que se sabía estaban incluidos dentro de los clones genómicos que producían más de una señal de hibridación (Madueño *et al.* 1995). Así se hibridó el gene *arm* incluido en el cósmido 129E12. Como se puede ver en la Tabla 8, la localización del gen *arm* (C4a) coincide con una de las tres señales (A2d, B3f y C4a) del cósmido en el que está incluido. También se hibridó el gen *CG3585* incluido en el cósmido 143G11. Este cósmido, que produce dos señales de hibridación (A4f y C2h), contiene además el gen *Ubi-p5E*. Cada una de las señales producidas por el clon 143G11 coincide con la localización de uno de estos dos genes (Tabla 7 y Tabla 8). También se subclonó el cósmido 28C2 que producía 3 señales de hibridación en las bandas A2d, B1h y D2f-g. Uno de los subclones de este cósmido producía las señales B1h y D2f-g. Se digirió este subclon en 2 fragmentos, se hibridaron y se vio que cada uno de ellos producía una única de las dos señales. La hibridación de estos subclones permitió por tanto separar físicamente 2 de las 3 señales producidas por el cósmido 28C2. En conjunto, estos resultados permiten considerar que los clones que producen más de una señal de hibridación en el cromosoma X de *D. repleta* y/ o *D. buzzatii* contienen puntos de rotura fijados durante la divergencia de las especies comparadas.

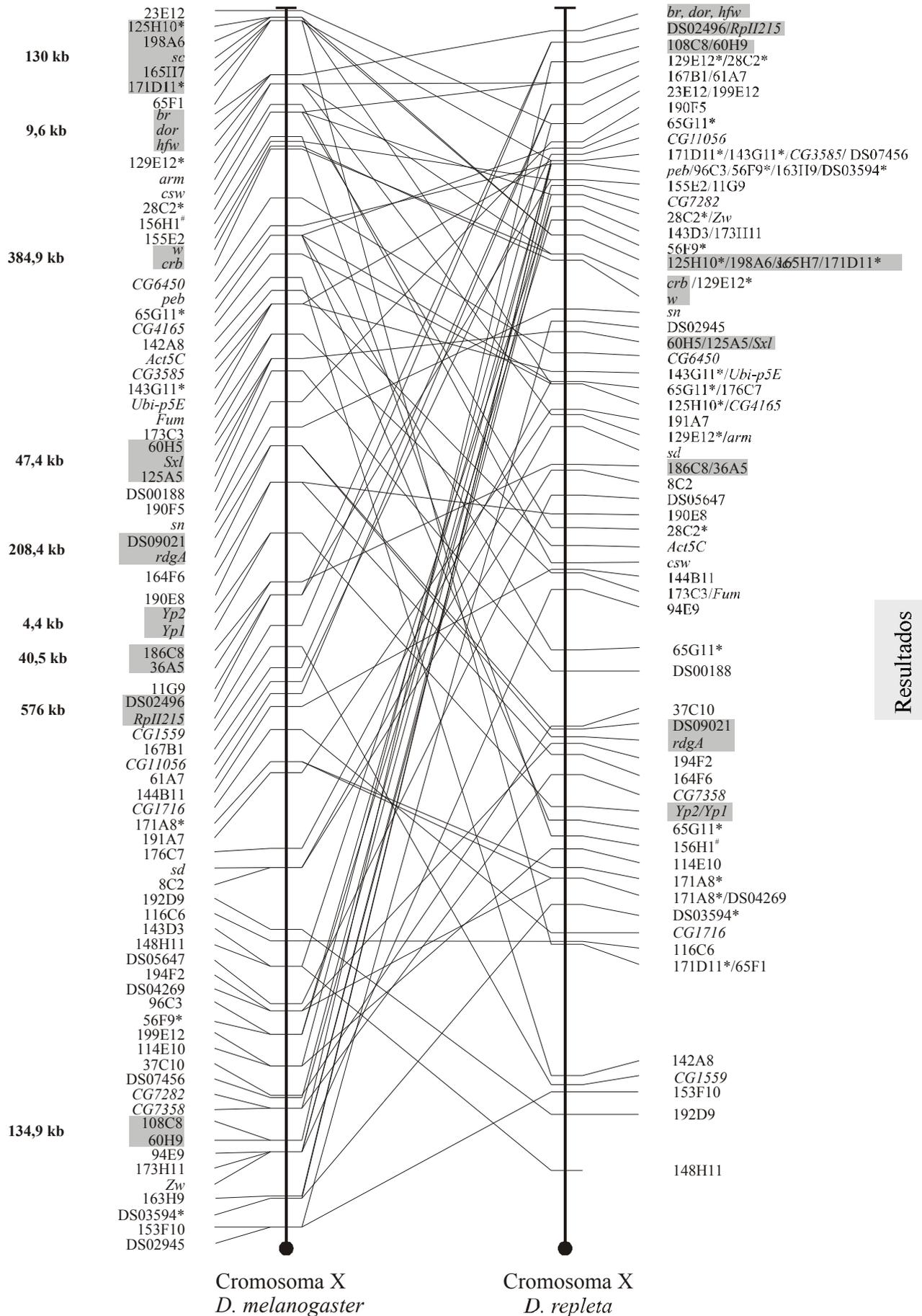
Además de los genes *arm Ubi-p5E* y *CG3585* en *D. repleta* y/o *D. buzzatii* se conoce también la localización de otros 5 genes incluidos en clones genómicos hibridados en este estudio (Tabla 8). Para 2 de estos genes (*sd* y *Yp2*) la localización del gen no coincide con la localización del clon en el que están incluidos. El gen *sd* está localizado en un extremo del cósmido 8C2. Se ha considerado que este clon contiene un punto de rotura fijado entre las especies comparadas. Sólo se obtiene una señal y no dos, como es de esperar cuando el clon contiene un punto de rotura, probablemente debido a que la mayor parte del clon hibrida en una única localización. La otra excepción es el cósmido 32D11. Este cósmido, que produce señales de hibridación múltiples en todos los cromosomas, contiene el gen *Yolk protein 2 (Yp2)*. Este gen ha sido localizado en la banda F1b del cromosoma X. Probablemente el cósmido contiene además de este gen algún tipo de secuencia repetitiva responsable de su patrón de hibridación.

3.2.3 Características del mapa físico del cromosoma X de *D. repleta* y *D. buzzatii*

La porción eucromática del cromosoma X de *D. melanogaster* es aproximadamente 21,8 Mb (Adams *et al.* 2000) y fue dividida por Bridges en las secciones 1-20 (Lefevre 1976). Los marcadores hibridados en este estudio provienen de todas las secciones del cromosoma X de *D. melanogaster* (de 2 a 6 marcadores por sección con un promedio de 3,7 marcadores por sección). La densidad promedio de marcadores es de 1 cada 299 kb.

En la Figura 7 se ha representado el mapa físico del cromosoma X de *D. melanogaster* y el de su cromosoma homólogo en *D. repleta* (cromosoma X).

Figura 7. Comparación de la organización molecular del cromosoma X (elemento cromosómico A) entre *D. melanogaster* y *D. repleta*. Las líneas conectan las posiciones citológicas de los marcadores ortólogos. Los rectángulos sombreados muestran los segmentos conservados, el tamaño de los cuales está indicado. El asterisco (*) indica los clones que dan más de una señal de hibridación. El símbolo (#) indica los clones etiquetados incorrectamente. El marcador que se indica como *crb* corresponde a una señal secundaria obtenida al hibridar con un clon del gen *crumbs* (Ranz *et al.* 1999).



El mapa físico del cromosoma X está formado por 81 marcadores: 71 marcadores localizados en este estudio (no se incluyen ni *Lsp1alpha* ni 174F6 puesto que hibridan en otros cromosomas) más 10 marcadores localizados por otros autores (ver Tabla 7). El tamaño del genoma de las especies del grupo *repleta* es aproximadamente 220 Mb de las cuales un 69% (~150 Mb) es DNA de copia única (Schulze y Lee 1986). La porción eucromática del cromosoma X, que representa un 18% del total (Wasserman 1992), es aproximadamente 27 Mb. La densidad promedio de marcadores en el mapa de *D. repleta* es 1 cada 333 kb.

En la Figura 7 se puede ver que los marcadores no están distribuidos uniformemente a lo largo del cromosoma X de *D. repleta*. Si se divide el cromosoma en 4 partes iguales el número de marcadores en cada cuarto difiere significativamente de lo esperado por azar ($G = 21,20$, g.l. = 3, $P < 0,001$) y sugiere que la densidad génica varía hasta 6 veces entre la porción más distal y la más proximal del cromosoma.

3.2.4 Estima de la tasa de fijación de inversiones en el elemento cromosómico A

La estima para la tasa de fijación de inversiones durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* se ha obtenido utilizando el método de máxima verosimilitud descrito por Ranz *et al.* (1997). En el anexo 1 se muestran las secuencias de las STS de los cósmidos 143G11, 11G9 y 144B11 obtenidas en el presente trabajo y utilizadas para posicionar estos clones en la secuencia. En el anexo 2 se muestra la posición en la secuencia y el tamaño de los segmentos cromosómicos delimitados por los marcadores hibridados en este estudio (ver Tabla 8) y los localizados por otros autores (ver Tabla 7). También se indica el número de puntos de rotura que contiene cada segmento. A partir de estos datos se obtuvo una estima de 118 ± 17 inversiones fijadas (\pm SD) en el elemento cromosómico A durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*.

3.3 Mapa físico del cromosoma 4 de *D. repleta* y *D. buzzatii*

Para elaborar el mapa físico del cromosoma 4 de *D. repleta* y *D. buzzatii* se han hibridado un total de 80 clones: 7 genes y 73 fagos P1. Todos estos clones contienen DNA del genoma de la especie *D. melanogaster*. Se siguió el procedimiento utilizado para el cromosoma X: se hibridaron, en primer lugar, sobre los cromosomas politénicos de esta especie y los clones que contenían DNA del cromosoma 3L se hibridaron también sobre los cromosomas de *D. repleta* y *D. buzzatii*

3.3.1 Hibridaciones sobre *D. melanogaster*

La mayoría de clones (74/80) hibridaron en la localización previamente descrita por otros autores (Madueño *et al.* 1995; BDGP; FlyBase). Los 6 clones restantes hibridaban en otros elementos cromosómicos (DS00079, DS00378, DS03729, DS03215), daban dos señales de hibridación en el cromosoma 3L (DS02952) o señales múltiples en todos los cromosomas (DS06985). La hibridación diferencial probablemente es debida a errores en el etiquetado de los clones durante la manipulación de las genotecas. Estos clones no se utilizaron para la realización del mapa físico del cromosoma 4. Sí se utilizó el clon DS08585 que teóricamente contenía DNA del cromosoma X aunque hibridó en el cromosoma 3L (ver Tabla 9).

3.3.2 Hibridaciones sobre *D. repleta* y *D. buzzatii*

De los 75 clones hibridados en *D. repleta* y *D. buzzatii* 61 (4 genes y 57 fagos P1) dieron resultados positivos: 57 clones hibridaron en las dos especies, tres clones hibridaron sólo en *D. repleta* y 1 sólo en *D. buzzatii* (Tabla 9). En la Figura 8 se muestran algunos ejemplos de estas hibridaciones. Al igual que en el caso del cromosoma X la hibridación en una especie pero no en la otra podría ser debida a la diferente organización molecular de este cromosoma en las dos especies del grupo *repleta* estudiadas. Todos los clones hibridaron en el cromosoma 4 de *D. repleta* y/o *D. buzzatii* como es de esperar de acuerdo con las homologías cromosómicas establecidas (Tabla 1).

Tabla 9. Localización citológica de los 75 marcadores del cromosoma 3L de *D. melanogaster* hibridados en este estudio. En parentesis se indican los genes cuya localización se conoce en *D. repleta/D. buzzatii* y están incluidos en clones genómicos también hibridados.

Marcador	Señal de hibridación	
	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. repleta/D. buzzatii</i> .
DS07291	61F	A2c
DS05739	62A5	-
DS02777	62A10	E1f
DS04710	62B11	E1f, A1a
DS02489	62F3-6	-
DS05034	63A1-2	G3f-g
DS01859	63C5	B3f, C1h
DS07627	63D1-3	C1h
DS03985	63E1	B2e
DS00926	64D1-2	D3e
DS02635	64F1-2	E1c
DS08881	65A6	D4e
DS05402	65B5	D4d-e
DS08305	65C1	D4d
DS00374	65D	C2a ^f
<i>msh-3</i>	65E	-
DS06194	65E1	C1i-C2a
DS05040	66A1-2	B3e-f
<i>CG7185</i>	66C	C2a
DS00606	66C8-D2	B3a
DS00529	66D1-6	C1a
DS04988	66D10-11	C1b
DS05758	66E1-2	-
DS07824	67A1-2	A5a
DS03929 (<i>Hsp 22-26, Hsp 23-27</i>)	67B2-7	D5d
DS03212	67B7-8	E2c
DS00256	67C1-2	D5c
DS04653	68A1-2	G3a

DS01438	68C12-13	F4c-d
DS05904	68F1-2	F4a
DS08585 [#]	69A	C3a
DS08512 (<i>caup, ara</i>)	69D1	C3g
<i>caup</i>	69D3	C3g
<i>ara</i>	69D3	C3g
DS06094	69E6-7	F3b
DS02826	69F3-7	F1b, F3c
DS03501	70B1-3	G1e, G4a
DS00192	70E4-5	G2b-c
DS04421	70F1-6	G1g ^f
DS07775	71A1-2	G4c
DS01772	71B4-C1	-
DS01389	71D1-2	D1a-c
DS02456	71F1-2	F2f
DS03598	72C1-D6	C3a, C3i
DS01052	72F1-2	A4de
DS05180	73A2-3	A4b
DS04370 (<i>tra</i>)	73B5-C1	E2d-e
DS00383	73D4-E2	B4c
DS00052	74A5-B1	B4e
DS06624	74C1-D1	-
<i>Eip74EF</i>	74D2-5	C1e-f
DS03359 (<i>Eip74EF</i>)	74E2-F1	C1e-f
DS07350	75A1-2	C1d ^f
DS03210	75B3-7	-
DS05726	75C1-2	F1f ^b
DS06960	75D3-8	-
DS01293	75E2-7	E4g
DS07819	76A2-4	E4c
DS06334	76D1-E1	-
DS01645	76F1-2	F4i
DS00288	77A4-B1	G1b

DS01393	77B4-C1	E4d-e
DS01369	77E	E3a
DS00239	77E4-F1	E3a
DS05090	78A1-2	A3d
DS00088	78B1-2	G2d, G3d
DS09130	78E1-F2	E4f
DS02213	79A3-4	F4g
DS03596	79D4	G4a
DS04985	79E4-6	-
<i>CklII alpha</i>	80A	-
<i>Rp21</i>	80	-
DS03402	80A1-2	A1f
DS04193	80B1-2	-
DS01343	80B1-2	-

^b Clon hibridado solo en *D. buzzatii*

^r Clon hibridado solo en *D. repleta*

[#] Clon incorrectamente etiquetado

La mayoría de clones (55/61) dieron una única señal de hibridación. Los 6 clones restantes dieron 2 señales. Como siempre que se han hibridado subclones de los clones que producen más de una señal de hibridación (ver apartados 3.1 y 3.2.2) se han conseguido separar físicamente las señales de hibridación, se ha considerado que estos clones contienen un punto de rotura fijado durante la divergencia de las especies comparadas.

Se conoce la localización en *D. repleta* y/o *D. buzzatii* de 6 genes incluidos en clones genómicos hibridados en este estudio (ver Tabla 7 y Tabla 9). Para 3 de ellos (*caup*, *ara* y *Eip74EF*) la localización coincide con la de los clones que los incluyen mientras que los otros 3 (*Hsp22-26*, *Hsp23-27* y *tra*) se han localizado en bandas diferentes. Al igual que los genes del cromosoma X, estos genes se encuentran en uno de los extremos del clon genómico en el que están incluidos. Esto permite considerar que estos clones contienen un punto de rotura fijado y que solo se observa una señal debido a que la mayoría del clon hibrida en una única localización.

Figura 8. Resultados de las hibridaciones realizadas con los fagos P1 DS04710 y DS02826. Los dos clones proceden del elemento cromosómico 3L de *D. melanogaster*.

3.3.3 Características del mapa físico del cromosoma 4 de *D. repleta* y *D. buzzatii*

El cromosoma 3L de *D. melanogaster* está formado por 24,4 Mb de eucromatina (Adams *et al.* 2000) y corresponde a las secciones 60-80 del mapa citológico de Bridges (Lefevre 1976). El número de marcadores hibridados en cada sección varía entre 1 y 6 con un promedio de 3,1. La densidad promedio de marcadores es de 1 cada 400 kb.

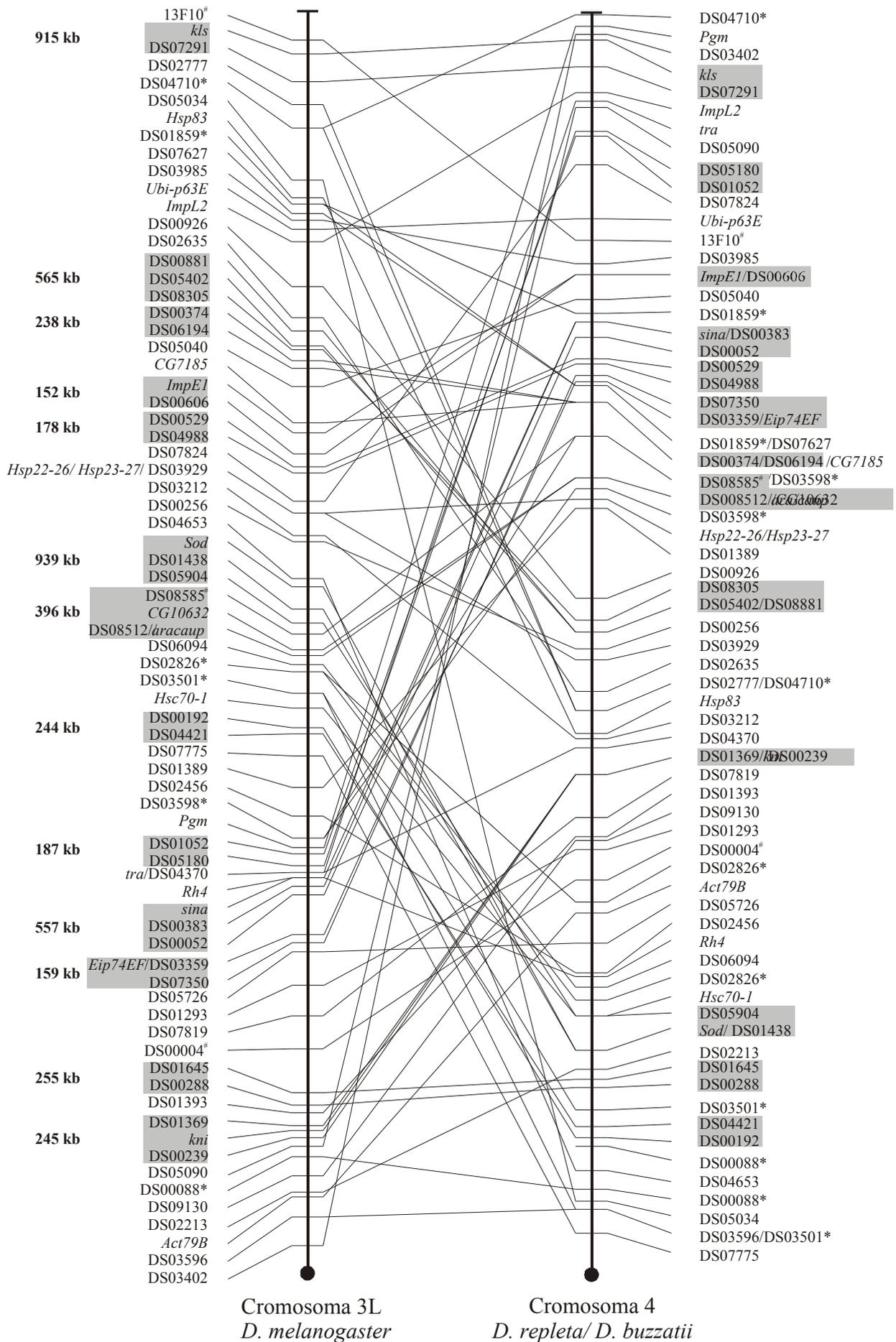
En la Figura 9 se ha representado el mapa físico del cromosoma 3L de *D. melanogaster* y el de su homólogo (cromosoma 4) en *D. repleta/D. buzzatii*. Se han incluido los 61 marcadores hibridados en este estudio (Tabla 9) más 18 marcadores hibridados por otros autores (Tabla 7). El cromosoma 4 tiene un tamaño aproximado de 27 Mb (Schulze and Lee 1986; Wasserman 1992) y la densidad promedio de marcadores es de uno cada 342 kb.

A diferencia de lo observado en el cromosoma X, los marcadores se distribuyen uniformemente a lo largo del cromosoma 4 de *D. repleta/D. buzzatii* ($G = 1,72$, g.l. = 3, $P > 0,05$).

3.3.4 Estima de la tasa de fijación de inversiones en el elemento cromosómico D

En el anexo 3 se muestra la posición en la secuencia y el tamaño de los segmentos cromosómicos delimitados por los marcadores hibridados en este estudio (Tabla 9) y los localizados por otros autores (Tabla 7) en el elemento cromosómico D. También se indica el número de puntos de rotura que contiene cada segmento. A partir de estos datos, utilizando el método descrito por Ranz *et al.* (1997), se obtuvo una estima de 56 ± 8 inversiones fijadas (\pm SD) en este elemento cromosómico durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*.

Figura 9. Comparación de la organización molecular del cromosoma 3L de *D. melanogaster* con la de su homólogo (cromosoma 4) en *D. repleta/D. buzzatii* (elemento cromosómico D). Ver leyenda de la Figura 7.



3.4 Tasas de hibridación en los diferentes elementos cromosómicos

Si consideramos en conjunto los resultados obtenidos para los tres elementos cromosómicos estudiados el 75,8% de los clones (160/211) han hibridado en los cromosomas de *D. repleta* y/o *D. buzzatii*. La distribución de las hibridaciones por tipo de clon y cromosoma se puede ver en la Tabla 10. No hay diferencias en cuanto a la tasa de hibridación entre diferentes tipos de clones ($G = 3,31$, g.l. = 2, $P > 0,05$) pero sí hay diferencias significativas entre elementos cromosómicos ($G = 20,69$, g.l. = 2, $P < 0,001$).

El cromosoma X muestra la menor proporción de hibridaciones exitosas (63,4%), significativamente inferior a la de los autosomas estudiados (86,14%) ($G = 11,59$, g.l. = 1, $P < 0,001$). Esta diferencia parece ser debida principalmente a cósmidos ($G = 10,11$, g.l. = 1, $P < 0,01$) y fagos P1 ($G = 17,69$, g.l. = 1, $P < 0,001$) más que a los genes, que muestran una tasa de hibridación parecida ($G = 0,34$, g.l. = 1, $P > 0,05$).

Tabla 10. Número de clones de DNA hibridados (número de clones ensayados) sobre los cromosomas politénicos de *D. repleta/D. buzzatii*.

Cromosoma <i>D. melanogaster</i>	Clones génicos	Cósmidos	Fagos P1	Total
X	20 (29)	45 (62)	8 (19)	73 (110)
2L			26 (26)	26 (26)
3L	4 (7)		57 (68)	61 (75)
Total	24 (36)	45 (62)	91 (113)	160 (211)

3.5 Anexos a los resultados

Anexo 1. Secuencias de las STS terminales de los cósmidos 143G11, 11G9 y 144B11.

143G11 (STS T)

GGGCAAAAAAAAACTCCCATCCANTAAATAGANGAANGTTAANCCCANNATCCNGAACA
AGCAANNAANCCCCNAAATCAACANCTTTTGATCTTCNCCGAAAATTTTTTTAAGAACG
GACNCACTCTGTCCAATTACAACATCCAGNGNGNAATCAACCCTTCACTTGCTCCTGCTT
CTNCTTNTTGCCATNCAAAAATCTTTNTAAAAACCCCTCACTGGNAAGACCATCACCTTGAA
GTTTAACCCATCCAATACCATCAAANACTTCAAANCCANAATCNACAACAAGAATTGAAT
CCCCCAAANCATCACCTTTTTGATTTTCNCCGAAAACNANNTTAAGAACGNACNTACTC
TNTCCAACACTACACATCCANAANNATCAACCCTTCACTTCACTTTAATTGNTAAAAANC
AAANAACAATTTACCCCANCANCCATGCAAAAAACAAACCCCCCAAATTTCCAAATCAA
NTNCTTNCCTATTACCTATTAAATACCAANANCCGCNTNCTTTTTTAAAACAAAATTGGGG
GGGGTTGTGNAACAAAANTCCTNAAAAANCTNAACNTTCCCAACCAAATTAANAAAANAN
CAAANTTTTTTTNAAATNTTTTTCATNAAAAANTTTCNNAACCCATTTNTTAAANAATTCCCTT
TAACTTTTTCTTNTTCCAAAAANAANAAAAAAATTTCCCNCTTNNTTTTTTGACAANNNTTNC
ATAAAATTTAACTNAAATNTTTTTNAAAAACCCCAACNAACAATTTCCNNAANCAAAACACGTN
CTTCCACNACNNNTTCTTANTTANCNCANAAANTAAACCNAANACCCCCACCCCAA
TNCTTCCCNAANAAAAACNAAATTTAAATTTTCCCNNTAAAAAATCNAACTTCNCTTT
CCCTAAACNNCCNAACAAACANNAANNTTTTCNCAACANATNTAACCCCAANANNAN
AANATNNTTTNNCNCNCCCCCCCCNAAAAAC

11G9 (STS T)

NANGGNGCNTGTGGAGAANGNNGTNNGTCCGGGNTNCAANTGGNGNAANTACCAACTGGN
TTCTCTTATGCANGGGGATACTAATCNGGTGTGNGCAAGTTTNGGCTGATTCTGNTACCG
NTAGACTAAAAATTTCAAGCACTGTGCAGAGNGNAAAAAATTTNTTNGGTGTGCTAANAA
AGACNATAACAAAACAAGAGAGAAATGCTATAGTCGAGNNCCCCGACTATCAGATACCCTT
TANTCAGCTAGTGTGAAAGGACCTAATAGCTTNTATAGNTCNTGATATCTCANCCTTNT
ACGGACAGACCGACATGGCTNGGATCGACTTGGNTATTNGATCCTGATCAAGAATATATA
TNNNTNCTNANAGTCCGAAACGCTTCCCTNANGCCTGTACATACTTNTTCAAGGNANCTT
GTNNNACCCTTAGACTNNANGGNGNAACGGNNTANCNANNAGANNCANGCNNNGGGGN
GCACCNAACAANANANNANNGNNGNANCGGTAGNANNGCGCTNANNNGNNGGATANCAAG
ACNACCTCGGGGGNTCNCGNNNCATGNNNGGAAGATGCCCGAANTCGGCGNNGTNNTGGA
NNNTNAGGAAGCCTNNAANNGANAACNCACNACNTTNCNNNCNACGGGANNTGCGNTGGN
CGTCTNNANANACTNTNNGTACGGCACATGNNNGGGCTGACTATGCNCANATAAANNCAN
ANGACNNAGCAGNNCNCNTNCGNGACNGAGCGNGNCGCGNCTTGCCGNNATGGCGNNAC
CCGAGAACAGGTNACAGCTAGANTNANGNGAGCAGCCCGCNTCCAGAGTANGGNGTNN
TGCATGGGNNNACAGGCAANANCACTACAGCGATANAAAGTGNCGANGTGGGAGGTAT
ANCGCGNAGNCGGNNAGATGANAGNNANNNAGCANNAGCCGTNTANAGAGGNGCCGCAN
NCNGACCCNCGTAANNNNANGCNANNCNAGATNGTANACNGANNTAGCTAGGNNCNCNG
CCNCGCAGCGNCGAGTGCNNCANGAAGCGTNNGTGTTNNTGNCNGTNCGCGNTCGGCA
TNAGACAGNAGNNCNCAGCANANAGTNNGACNCGNGNCGNGGANGGGAGNNGNNANCA
GTGGACNNGNACCAGNNCNA

144B11(STS T)

NAGGNNNGTGAAGAATGGNNNGGCNGGGTCNAAATGGGGAAACACACACTCTGGCGCCCT
CTGGGGGTGTCCAATGACANAGCGTTTCGATGACTGCGAACAAGTGATCACCGATGGCAG
GCGAAGTAAGTGAATCATATCCGTGATGGTTAGCAANGAACTAGGATTTTNNAGTAATTAA
ATTGTAATATAAAATACATATATGTTCAAATCTTAAGTCAATAGGTTCTTATGATAAGTA
TAAGTTAAATTAAGTCGATAACTGNTAACCCAATTTTGGTAACTGTATCCCTTTTATTTT
CTACTTTATAAAACCCGTATAAACATCCATTTCATTGGTGCAGGTTGATTGGNTCGTGCCAG
TCTTAAAAAAAAACATATATGTACCTATTATATAGATCTAGTCATAGTCGTAGATACCGA
ATCCCGCTCCAATTCCTTAGTNGACTAACCNGGTGNCAATGGGTCAAGGATCATCNGG
GGCTTNNAGNTAACCGANNNGCATTTNNCAGGGNGGNCCCAATGANTGTGGGGGGATNG
TAAATNCCAATGTNAGNCTGCGGAANNNTGGTACATAAACNGNNNTGGGCAAAAANGCCGC
GGTNTNAGCAGAAGCCGTGCGGAACCNACAAACGGTGTCTGAANCCNTTNGGTNAGNAA
CNGGCTTGCGNNGGANACGTGAGGGGTGGGTNTNAAGAGNNNGGGNGTTGCNANGGAN
CACGNGCACTGGTTGGNANANACGGCATGTGAANNAAGANCNANTNAGNGGGGCGGGNNG
TGACNNANNTNAGGGNNNNCNGCGCCACNGGAGTGNCNCAGNNGTGNGCAGTGTGNNNN
GNCAAGCACANCNNNNGANNGCNCCAANTGGGNCGAGGTGTGGGGGNAANC GTTGGAGAA
NGTNCGGGGGCGNTGGGGGNGNCNTGNGNANGCGNCAAATGNGGGGGCGCGCNCGAAN
AGANTNGATTGGGCAGGNATGGGNANNCGGNNCCGAGNGCNCANGATGNCAAGGTNCGNN
GGGNCCNCNTCTTGTGGNNACCNNNCCGGGANGNAGCNNNGGCGGTNGNGGTNGAANGN
CGGNA

Anexo 2. Segmentos cromosómicos identificados al comparar el cromosoma X de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*. Los marcadores se han posicionado sobre la secuencia del genoma de la especie *D. melanogaster*. El centrómero (C) y el telómero (T) también se han utilizado como marcadores. Se indica el tamaño relativo de los segmentos (l_i) así como el número de puntos de rotura.

Marcadores que delimitan el segmento	Posición inicial	Posición final	Tamaño del segmento	Tamaño relativo (l_i)	Puntos de rotura ^a
C-23E12	0	52.567	52.567	0,00243	>1
23E12	52.567	90.473	37.906	0,00175	0
23E12-125H10	90.473	99.334	8.861	0,00041	>1
125H10-65F1	99.334	308.890	209.556	0,00967	3
65F1- <i>br</i>	308.890	1.406.534	1.097.644	0,05066	>1
<i>br-dor</i>	1.406.534	1.416.145	9.611	0,00044	0
<i>dor</i> -129E12	1.416.145	1.613.748	197.603	0,00912	>1
129E12	1.613.748	1.653.748	40.000	0,00185	2
129E12- <i>csw</i>	1.653.748	1.841.301	187.553	0,00866	>1
<i>csw</i>	1.841.301	1.858.769	17.468	0,00081	0
<i>csw</i> -28C2	1.858.769	1.874.781	16.012	0,00074	>1
28C2	1.874.781	1.928.265	53.484	0,00247	2
28C2-156H1 [#]	1.928.265	2.246.367	318.102	0,01468	>1
156H1 [#]	2.246.367	2.286.367	40.000	0,00185	0
156H1 [#] -155E2	2.286.367	2.411.012	124.645	0,00575	>1
155E2	2.411.012	2.449.691	38.679	0,00179	0
155E2- <i>w</i>	2.449.691	2.539.884	90.193	0,00416	>1
<i>w-crb</i>	2.539.884	2.924.742	384.858	0,01776	0
<i>crb</i> -CG6450	2.924.742	3.766.557	841.815	0,03885	>1
CG6450	3.766.557	3.775.770	9.213	0,00043	0
CG6450- <i>peb</i>	3.775.770	4.426.972	651.202	0,03005	>1
<i>peb</i>	4.426.972	4.435.429	8.457	0,00039	0
<i>peb</i> -65G11	4.435.429	4.718.645	283.216	0,01307	>1
65G11	4.718.645	4.758.645	40.000	0,00185	3
65G11-CG4165	4.758.645	5.228.917	470.272	0,02170	>1
CG4165	5.228.917	5.235.562	6.645	0,00031	0

<i>CG4165-142A8</i>	5.235.562	5.463.268	227.706	0,01051	>1
142A8	5.463.268	5.503.268	40.000	0,00185	0
142A8- <i>Act5C</i>	5.503.268	5.709.638	206.370	0,00952	>1
<i>Act5C</i>	5.709.638	5.712.584	2.946	0,00014	0
<i>Act5C-143G11</i>	5.712.584	6.054.801	342.217	0,01579	>1
143G11	6.054.801	6.090.186	35.385	0,00163	1
143G11-173C3	6.090.186	6.479.475	389.289	0,01797	>1
173C11	6.479.475	6.516.226	36.751	0,00170	0
173C11-60H5	6.516.226	6.875.346	359.120	0,01657	>1
60H5-125A5	6.875.346	6.922.776	47.430	0,00219	0
125A5-DS00188	6.922.776	7.400.932	478.156	0,02207	>1
DS00188	7.400.932	7.454.307	53.375	0,00246	0
DS001888-190F5	7.454.307	7.648.841	194.534	0,00898	>1
190F5	7.648.841	7.688.841	40.000	0,00185	0
190F5- <i>sn</i>	7.688.841	7.779.710	90.869	0,00419	>1
<i>sn</i>	7.779.710	7.783.386	3.676	0,00017	0
<i>sn-DS09021</i>	7.783.386	8.610.666	827.280	0,03818	>1
DS09021- <i>rdgA</i>	8.610.666	8.819.082	208.416	0,00962	0
<i>rdgA-164F6</i>	8.819.082	8.986.837	167.755	0,00774	>1
164F6-190E8	8.986.837	9.064.758	77.921	0,00360	1
190E8- <i>Yp2</i>	9.064.758	9.846.124	781.366	0,03606	>1
<i>Yp2-Yp1</i>	9.846.124	9.850.490	4.366	0,00020	0
<i>Yp1-186C8</i>	9.850.490	10.649.842	799.352	0,03689	>1
186C8-11G9	10.649.842	10.733.047	83.205	0,00384	1
11G9-DS02496	10.733.047	10.785.716	52.669	0,00243	>1
DS02496- <i>RpII215</i>	10.785.716	11.361.687	575.971	0,02658	0
<i>RpII215-CG1559</i>	11.361.687	11.669.003	307.316	0,01418	>1
<i>CG1559</i>	11.669.003	11.673.106	4.103	0,00019	0
<i>CG1559-167B1</i>	11.673.106	12.353.746	680.640	0,03141	>1
167B1	12.353.746	12.396.187	42.441	0,00196	0
167B1- <i>CG11056</i>	12.396.187	12.416.145	19.958	0,00092	>1
<i>CG11056</i>	12.416.145	12.417.518	1.373	0,00006	0
<i>CG11056-61A7</i>	12.417.518	12.665.232	247.714	0,01143	>1
61A7	12.665.232	12.681.788	16.556	0,00076	0

61A7-144B11	12.681.788	12.965.863	284.075	0,01311	>1
144B11	12.965.863	13.005.863	40.000	0,00185	0
144B11-CG1716	13.005.863	13.172.719	166.856	0,00770	>1
CG1716	13.172.719	13.180.539	7.820	0,00036	0
CG1716-171A8	13.180.539	13.500.278	319.739	0,01476	>1
171A8	13.500.278	13.540.278	40.000	0,00185	1
171A8-191A7	13.540.278	13.668.957	128.679	0,00594	>1
191A7	13.668.957	13.708.957	40.000	0,00185	0
191A7-176C7	13.708.957	15.471.598	1.762.641	0,08135	>1
176C7	15.471.598	15.511.598	40.000	0,00185	0
176C7-8C2	15.511.598	15.554.755	43.157	0,00199	>1
8C2	15.554.755	15.607.081	52.326	0,00241	1
8C2-192D9	15.607.081	16.107.169	500.088	0,02308	>1
192D9	16.107.169	16.147.169	40.000	0,00185	0
192D9-116C6	16.147.169	16.221.796	74.627	0,00344	>1
116C6	16.221.796	16.261.796	40.000	0,00185	0
116C6-143D3	16.261.796	16.384.204	122.408	0,00565	>1
143D3	16.384.204	16.424.204	40.000	0,00185	0
143D3-148H11	16.424.204	16.497.740	73.536	0,00339	>1
148H11	16.497.740	16.537.740	40.000	0,00185	0
148H11-DS05647	16.537.740	16.849.079	311.339	0,01437	>1
DS05647	16.849.079	16.880.175	31.096	0,00144	0
DS05647-194F2	16.880.175	16.929.890	49.715	0,00229	>1
194F2	16.929.890	16.978.149	48.259	0,00223	0
194F2-DS04269	16.978.149	17.012.745	34.596	0,00160	>1
DS04269	17.012.745	17.091.660	78.915	0,00364	0
DS04269-96C3	17.091.660	17.397.623	305.963	0,01412	>1
96C3-56F9	17.397.623	17.460.224	62.601	0,00289	1
56F9-199E12	17.460.224	17.580.884	120.660	0,00557	>1
199E12	17.580.884	17.620.884	40.000	0,00185	0
199E12-114E10	17.620.884	17.745.273	124.389	0,00574	>1
114E10	17.745.273	17.785.273	40.000	0,00185	0
114E10-37C10	17.785.273	18.332.475	547.202	0,02525	>1
37C10	18.332.475	18.372.475	40.000	0,00185	0

37C10-DS07456	18.372.475	18.438.182	65.707	0,00303	>1
DS07456	18.438.182	18.523.456	85.274	0,00394	0
DS07456-CG7282	18.523.456	18.588.836	65.380	0,00302	>1
CG7282	18.588.836	18.594.147	5.311	0,00025	0
CG7282-CG7358	18.594.147	18.627.733	33.586	0,00155	>1
CG7358	18.627.733	18.631.893	4.160	0,00019	0
CG7358-108C8	18.631.893	19.099.929	468.036	0,02160	>1
108C8-60H9	19.099.929	19.234.808	134.879	0,00622	0
60H9-94E9	19.234.808	19.284.701	49.893	0,00230	>1
94E9	19.284.701	19.322.266	37.565	0,00173	0
94E9-173H11	19.322.266	19.324.481	2.215	0,00010	>1
173H11	19.324.481	19.363.090	38.609	0,00178	0
173H11-Zw	19.363.090	19.406.146	43.056	0,00199	>1
Zw	19.406.146	19.411.032	4.886	0,00023	0
Zw-163H9	19.411.032	20.009.915	598.883	0,02764	>1
163H9-DS03594	20.009.915	20.110.309	100.394	0,00463	1
DS03594-153F10	20.110.309	20.895.805	785.496	0,03625	>1
153F10	20.895.805	20.935.805	40.000	0,00185	0
153F10-DS02945	20.935.805	21.204.596	268.791	0,01240	>1
DS02945	21.204.596	21.244.596	40.000	0,00185	0
DS02945-T	21.244.596	21.668.026	423.430	0,01954	>1

#Clon incorrectamente etiquetado

^a>1 indica que el segmento contiene al menos un punto de rotura

Anexo 3. Segmentos cromosómicos identificados al comparar el elemento D de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*. Los marcadores se han posicionado sobre la secuencia del genoma de la especie *D. melanogaster*. El centrómero (C) y el telómero (T) también se han utilizado como marcadores. Se indica el tamaño relativo de los segmentos (l_i) así como el número de puntos de rotura.

Marcadores que delimitan el segmento	Posición inicial	Posición final	Tamaño del segmento	Tamaño relativo (l_i)	Puntos de rotura ^a
C-13F10 [#]	0	237.267	237.267	0,01023	>1
13F10 [#]	237.267	277.267	40.000	0,00172	0
13F10 [#] - <i>kls</i>	277.267	415.411	138.144	0,00596	>1
<i>kls</i> -DS07291	415.411	1.330.055	914.644	0,03944	0
DS07291-DS02777	1.330.055	1.590.707	260.652	0,01124	>1
DS0277-DS04710	1.590.707	1.794.382	203.675	0,00878	1
DS04710-DS05034	1.794.382	2.786.788	992.406	0,04279	>1
DS05034	2.786.788	2.868.476	81.688	0,00352	0
DS05034- <i>Hsp83</i>	2.868.476	3.167.498	299.022	0,01289	>1
<i>Hsp83</i>	3.167.498	3.171.186	3.688	0,00016	0
<i>Hsp83</i> -DS01859	3.171.186	3.366.033	194.847	0,00840	>1
DS01859-DS07627	3.366.033	3.429.445	63.412	0,00273	1
DS07627-DS03985	3.429.445	3.526.327	96.882	0,00418	>1
DS03985	3.526.327	3.603.029	76.702	0,00331	0
DS03985- <i>Ubi-p63E</i>	3.603.029	3.874.286	271.257	0,01170	>1
<i>Ubi-p63E</i>	3.874.286	3.876.935	2.649	0,00011	0
<i>Ubi-p63E</i> - <i>ImpL2</i>	3.876.935	4.198.787	321.852	0,01388	>1
<i>ImpL2</i>	4.198.787	4.199.843	1.056	0,00005	0
<i>ImpL2</i> -DS00926	4.199.843	5.320.657	1.120.814	0,04833	>1
DS00926	5.320.657	5.382.415	61.758	0,00266	0
DS00926-DS02635	5.382.415	5.799.091	416.676	0,01797	>1
DS02635	5.799.091	5.814.931	15.840	0,00068	0
DS02635-DS08881	5.814.931	6.061.148	246.217	0,01062	>1
DS08881-DS08305	6.061.148	6.626.291	565.143	0,02437	0
DS08305-DS00374	6.626.291	6.738.357	112.066	0,00483	>1
DS00374-DS6194	6.738.357	6.976.029	237.672	0,01025	0

DS06194-DS05040	6.976.029	7.334.477	358.448	0,01546	>1
DS05040	7.334.477	7.396.470	61.993	0,00267	0
DS05040-CG7185	7.396.470	8.232.228	835.758	0,03604	>1
<i>CG7185</i>	8.232.228	8.237.170	4.942	0,00021	0
<i>CG7185-ImpEI</i>	8.237.170	8.307.455	70.285	0,00303	>1
<i>ImpEI</i> -DS04988	8.307.455	8.637.469	330.014	0,01423	1
DS04988-DS07824	8.637.469	9.089.762	452.293	0,01950	>1
DS07824	9.089.762	9.168.173	78.411	0,00338	0
DS07824-DS03929	9.168.173	9.293.682	125.509	0,00541	>1
DS03929	9.293.682	9.370.095	76.413	0,00329	1
DS03929-DS03212	9.370.095	9.397.798	27.703	0,00119	>1
DS03212-DS00256	9.397.798	9.486.524	88.726	0,00383	1
DS00256-DS04653	9.486.524	10.812.058	1.325.534	0,05716	>1
DS04653	10.812.058	10.898.564	86.506	0,00373	0
DS04653- <i>Sod</i>	10.898.564	11.031.061	132.497	0,00571	>1
<i>Sod</i> -DS05904	11.031.061	11.970.528	939.467	0,04051	0
DS05904-DS08585 [#]	11.970.528	12.145.238	174.710	0,00753	>1
DS08585 [#] -DS08512	12.145.238	12.540.997	395.759	0,01706	0
DS08512-DS06094	12.540.997	12.724.692	183.695	0,00792	>1
DS06094	12.724.692	12.763.790	39.098	0,00169	0
DS06094-DS02826	12.763.790	12.912.673	148.883	0,00642	>1
DS02826	12.912.673	13.000.010	87.337	0,00377	1
DS02826-DS03501	13.000.010	13.338.075	338.065	0,01458	>1
DS03501	13.338.075	13.406.215	68.140	0,00294	1
DS03501- <i>Hsc70-1</i>	13.406.215	13.870.641	464.426	0,02003	>1
<i>Hsc70-1</i>	13.870.641	13.874.111	3.470	0,00015	0
<i>Hsc70-1</i> -DS00192	13.874.111	14.436.761	562.650	0,02426	>1
DS00192-DS04421	14.436.761	14.680.415	243.654	0,01051	0
DS04421-DS07775	14.680.415	14.825.574	145.159	0,00626	>1
DS07775	14.825.574	14.902.104	76.530	0,00330	0
DS07775-DS01389	14.902.104	15.169.612	267.508	0,01153	>1
DS01389	15.169.612	15.252.285	82.673	0,00356	0
DS01389-DS02456	15.252.285	15.627.632	375.347	0,01618	>1
DS02456	15.627.632	15.702.894	75.262	0,00325	0

DS02456-DS03598	15.702.894	15.938.486	235.592	0,01016	>1
DS03598	15.938.486	16.022.423	83.937	0,00362	1
DS03598-Pgm	16.022.423	16.026.640	4.217	0,00018	>1
Pgm.	16.026.640	16.028.994	2.354	0,00010	0
Pgm-DS01052	16.028.994	16.284.419	255.425	0,01101	>1
DS01052-DS05180	16.284.419	16.471.364	186.945	0,00806	0
DS05180-DS04370	16.471.364	16.471.961	597	0,00003	>1
DS04370	16.471.961	16.643.362	171.401	0,00739	1
DS04370-sina	16.643.362	16.752.496	109.134	0,00471	>1
sina-DS00052	16.752.496	17.309.281	556.785	0,02401	0
DS00052-DS03359	17.309.281	17.454.605	145.324	0,00627	>1
DS03359-DS07350	17.454.605	17.613.313	158.708	0,00684	0
DS07350-DS05726	17.613.313	18.159.227	545.914	0,02354	>1
DS05726	18.159.227	18.199.235	40.008	0,00173	0
DS05726-DS01293	18.199.235	18.731.276	532.041	0,02294	>1
DS01293	18.731.276	18.795.284	64.008	0,00276	0
DS01293-DS07819	18.795.284	19.072.825	277.541	0,01197	>1
DS07819	19.072.825	19.157.531	84.706	0,00365	0
DS07819-DS00004#	19.157.531	19.290.959	133.428	0,00575	>1
DS00004#	19.290.959	19.370.959	80.000	0,00345	0
DS00004#-DS01645	19.370.959	19.848.868	477.909	0,02061	>1
DS01645-DS00288	19.848.868	20.103.663	254.795	0,01099	0
DS00288-DS01393	20.103.663	20.193.019	89.356	0,00385	>1
DS01393	20.193.019	20.273.019	80.000	0,00345	0
DS01393-DS01369	20.273.019	20.409.816	136.797	0,00590	>1
DS01369-DS00239	20.409.816	20.655.245	245.429	0,01058	0
DS00239-DS05090	20.655.245	20.770.817	115.572	0,00498	>1
DS05090	20.770.817	20.816.077	45.260	0,00195	0
DS05090-DS00088	20.816.077	20.951.724	135.647	0,00585	>1
DS00088	20.951.724	21.029.368	77.644	0,00335	1
DS00088-DS09130	21.029.368	21.358.773	329.405	0,01420	>1
DS09130	21.358.773	21.446.161	87.388	0,00377	0
DS09130-DS02213	21.446.161	21.566.338	120.177	0,00518	>1
DS02213	21.566.338	21.651.578	85.240	0,00368	0

DS02213- <i>Act79B</i>	21.651.578	21.824.234	172.656	0,00744	>1
<i>Act79B</i>	21.824.234	21.825.844	1.610	0,00007	0
<i>Act79B</i> -DS03596	21.825.844	22.101.851	276.007	0,01190	>1
DS03596	22.101.851	22.188.454	86.603	0,00373	0
DS03596-DS03402	22.188.454	22.724.687	536.233	0,02312	>1
DS03402	22.724.687	22.808.419	83.732	0,00361	0
DS03402-T	22.808.419	23.191.913	383.494	0,01654	>1

#Clon incorrectamente etiquetado

^a>1 indica que el segmento contiene al menos un punto de rotura

4. DISCUSIÓN

4.1 Organización molecular de la región *Adh* de *D. melanogaster* en las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*

La región cromosómica de 2,9 Mb que rodea al locus *Alcohol dehydrogenase* (*Adh*) en la especie *D. melanogaster* ha sido genéticamente caracterizada a un nivel superior al de cualquier otra región cromosómica de tamaño comparable en cualquier otro metazoo. Esta es la razón por la que fue escogida como la primera región del genoma de *D. melanogaster* en ser completamente secuenciada y analizada (Ashburner *et al.* 1999). Disponer de la secuencia hace que esta región sea ideal para llevar a cabo estudios comparativos de su organización molecular en diferentes especies. Este tipo de análisis 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). Los estudios comparativos de regiones cromosómicas realizados hasta ese momento se habían centrado en el estudio de la evolución de complejos génicos (Martínez-Cruzado *et al.* 1988; Hooper *et al.* 1992; Maier *et al.* 1993; Stathakis *et al.* 1995) o de un número limitado de marcadores de una determinada región cromosómica (Nurminsky *et al.* 1996; Vieira *et al.* 1997c; Ranz *et al.* 1999). En el caso de la región *Adh*, los clones analizados en este trabajo, recubren totalmente la región de manera que se ha podido realizar un análisis exhaustivo de la misma. Se han identificado todos los segmentos conservados y se han localizado tentativamente los puntos de rotura fijados durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta/D. buzzatii*.

Se analizaron 1,944 Mb que rodean al locus *Adh* mediante la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) de 26 fagos P1 que contenían DNA de esta región. Todos los clones hibridaron en el cromosoma 3 de *D. repleta/D. buzzatii*, homólogo al cromosoma 2L de *D. melanogaster* (elemento B; ver Tabla 1). La región *Adh* está representada en las especies del grupo *repleta* en seis posiciones cromosómicas distintas. Esto implica 5 puntos de rotura fijados durante la divergencia de estas especies. La densidad de puntos de rotura en esta región, 2,57 puntos de rotura por Mb, es tres veces inferior a la estimada para el elemento cromosómico E, 8,14 puntos de rotura por Mb (Ranz *et al.* 2001). Esta diferencia es probablemente debida a las diferentes tasas evolutivas de los elementos cromosómicos B y E ya que la región *Adh* es para varias características una región “típica” del genoma (Ashburner *et al.* 1999).

Se han localizado de forma aproximada los puntos de rotura fijados durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta/D. buzzatii*. Cuando el punto de rotura estaba situado entre dos fagos P1 se tuvo en cuenta la posición de los clones en la secuencia del genoma de *D. melanogaster*. Cuando el punto de rotura estaba situado dentro de un fago P1 se tuvo en cuenta el contenido genético del clon ya que se asume que la probabilidad de que se fije un punto de rotura es más elevada en las regiones intergénicas (Cirera *et al.* 1995; Cáceres *et al.* 1999a) que dentro de genes (Schneuwly *et al.* 1987) y también la intensidad de las señales.

El tamaño de los segmentos conservados en el elemento cromosómico B a lo largo de la evolución del genoma de estas especies varía entre 50 y 531 kb con un tamaño promedio de 324 kb. No se han detectado evidencias de restricción funcional en estos segmentos (Nadeau y Taylor 1984). Este resultado concuerda con el del análisis de la secuencia llevado a cabo por Ashburner *et al.* (1999) en el que no encontraron evidencia de asociación funcional entre genes en esta región. Sin embargo, el hecho de que los segmentos estén conservados no excluye que en su interior se hayan producido microrreordenaciones que no pueden ser detectadas por la técnica de FISH. Por ejemplo en *D. melanogaster* los loci *Adh* y *Adh-related (Adhr)* están organizados en tándem (Jeffs *et al.* 1994; Brogna y Ashburner 1997). Estos genes provienen probablemente de una duplicación que tuvo lugar hace 180 Ma, antes de la radiación del género *Drosophila* (Russo *et al.* 1995). Especies del subgrupo *mulleri*, entre ellas *D. buzzatii*, tienen tres genes *Adh*: *Adh-Finnegan (Adh-F)*, *Alcohol dehydrogenase-2 (Adh-2)* y *Alcohol dehydrogenase-1 (Adh-1)* (Sullivan *et al.* 1994; Begun 1997). *Adh-F* es probablemente el resultado de una duplicación anterior a la radiación del grupo *repleta* (Throckmorton 1982) mientras que *Adh-2* y *Adh-1* son el resultado de una duplicación más reciente (Sullivan *et al.* 1990; Menotti-Raymond *et al.* 1991; Russo *et al.* 1995). Por lo tanto, al menos en la especie *D. buzzatii*, el gen *Adh* incluido en uno de los segmentos conservados identificados en este estudio, ha sufrido dos duplicaciones desde la divergencia de esta especie con *D. melanogaster*.

4.2 Mapas físicos de los elementos A y D de *D. repleta* y *D. buzzatii*

La disponibilidad de mapas físicos de una especie proporciona puntos de entrada a su genoma a partir de los cuales es más fácil clonar genes o otras secuencias de interés. La cartografía comparativa de marcadores en dos o más especies permite además transferir información de las especies más estudiada a otras que no lo han sido tanto (Tanksley *et al.* 1995). El grado de transferencia de información depende del nivel de reorganización que hayan sufrido los genomas que se están comparando (Ranz *et al.* 2001). Actualmente se dispone de mapas físicos de los genomas de muchas especies (Devos y Gale 2000; Murphy *et al.* 2001). Dentro del género *Drosophila*, además de la especie *D. melanogaster*, que ha sido secuenciada (Adams *et al.* 2000), se dispone de mapas físicos del genoma de especies del grupo *virilis* (Lozovskaya *et al.* 1993; Hartl y Lozovskaya 1995); del grupo *obscura* (Segarra *et al.* 1995;1996) y de la especie *D. buzzatii* (Laayouni *et al.* 2000). Además se dispone también del mapa físico del cromosoma 2 (elemento E) en la especie *D. repleta* (Ranz *et al.* 2001).

El nivel de reorganización del genoma en *Drosophila* es muy elevado y esto hace que la posibilidad de transferir información a otras especies sea pequeña. Sin embargo, la información posicional del mapa del cromosoma 3R de *D. melanogaster* (Adams *et al.* 2000) se utilizó para clonar los puntos de rotura de una inversión en la especie *D. buzzatii* (Cáceres *et al.* 1999a) quedando así demostrada la utilidad práctica de la cartografía comparativa en estas especies.

Los mapas físicos de los elementos A y D en las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* se han construido a partir de la hibridación *in situ* de marcadores provenientes de la especie *D. melanogaster*. Los marcadores utilizados han sido genes, cósmidos y fagos P1. La tasa de hibridaciones exitosas no fue igual para todos los elementos estudiados. En el cromosoma X (elemento A) hibridaron el 66,4% (73/110) de los clones ensayados, en el cromosoma 3 (elemento B) el 100% (26/26) y en el cromosoma 4 (elemento D) el 81,3% (61/75). Estas diferencias son estadísticamente significativas (ver apartado 3.4). El cromosoma X tiene una tasa de hibridaciones exitosas inferior a la de los autosomas y esta diferencia parece ser debida principalmente a cósmidos y fagos P1. Una posible explicación a estos resultados podría ser una mayor tasa evolutiva de los loci ligados a este cromosoma. Charlesworth *et al.* (1987) proponen 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) compararon la divergencia nucleotídica entre genes ligados al cromosoma X y genes autosómicos en las especies *D. melanogaster* y *D. simulans*. No encontraron diferencias estadísticamente significativas aunque el nivel de divergencia era ligeramente más elevado en los genes ligados al X que en los autosómicos. El 100% de hibridaciones exitosas en el cromosoma 3 es probablemente debido a la técnica utilizada que en este caso fue la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) ya que cuando se hibridaban las preparaciones de *D. repleta/D. buzzatii* se amplificaba la señal utilizando dos capas adicionales de reactivos de revelado (ver apartado 2.6).

La densidad promedio de marcadores de un mapa físico indica la distancia promedio a la que está un gen o secuencia de interés de uno de los marcadores localizados en el mapa. La densidad de marcadores en los dos mapas realizados en este trabajo es similar. El mapa del cromosoma X de *D. repleta/D. buzzatii* (elemento A) está formado por 81 marcadores: 71 localizados en el presente trabajo (Tabla 8) y 10 localizados por otros autores (Tabla 7). La densidad promedio de marcadores en este mapa es de 1 cada 333 kb. El mapa del cromosoma 4 (elemento D) de *D. repleta/D. buzzatii* contiene 79 marcadores: 61 hibridados en el presente estudio (Tabla 9) y 18 hibridados por otros autores (Tabla 7). La densidad promedio de marcadores es para este cromosoma de 1 cada 342 kb.

4.3 Conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos

Los resultados obtenidos confirman una vez más (Steinemann 1982; Steinemann *et al.* 1984; Loukas y Kafatos 1986; Whiting *et al.* 1989; Papaceit y Juan 1993; entre otros) la hipótesis de la conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos propuesta por Muller (1940) y Sturtevant y Novitski (1941). Los marcadores que en *D. melanogaster* están localizados en el cromosoma X, en *D. repleta* y *D. buzzatii* están también localizados en este cromosoma (elemento A); los marcadores del brazo cromosómico 2L de *D. melanogaster* están localizados en el cromosoma 3 de *D. repleta* y *D. buzzatii* (elemento B) y los marcadores del brazo cromosómico 3L de *D. melanogaster* se localizan en el cromosoma 4 de *D. repleta* y *D.*

buzzatii (elemento D). Solo se han encontrado dos excepciones a las homologías cromosómicas establecidas: el gen *Lsp1alpha* y el cósmido 174F6 (ver apartado 4.3.1).

La conservación del contenido genético de los elementos cromosómicos en el género *Drosophila* se debe a la ausencia de reordenaciones intercromosómicas. Los tipos de cambios cromosómicos más frecuentes a lo largo de la evolución del género han sido las inversiones paracéntricas y las fusiones/ fisiones céntricas que no dan lugar a intercambio de material genético entre distintos elementos cromosómicos. Los otros dos tipos de cambios descritos, inversiones pericéntricas y translocaciones, son muy poco frecuentes (Clayton y Guest 1986). Las especies analizadas en este estudio son un buen material para detectar reordenaciones intercromosómicas ya que el cariotipo de *D. repleta* y *D. buzzatii* tiene la conformación ancestral del género, cinco cromosomas acrocéntricos y un cromosoma puntiforme (Muller 1940; Sturtevant y Novitski 1941) mientras que en el cariotipo de *D. melanogaster* los elementos cromosómicos B y C y los elementos D y E están fusionados formando 2 cromosomas metacéntricos. La fusión de dos elementos en un único cromosoma podría permitir el intercambio de material genético entre elementos mediante inversiones pericéntricas. Sin embargo los datos obtenidos para los elementos cromosómicos B y D no muestran la existencia de ninguna inversión pericéntrica fijada a lo largo de la evolución de estas especies.

En mamíferos, a pesar de que las translocaciones han jugado un papel importante en la reorganización del genoma, existe una gran conservación del contenido genético del cromosoma X entre diferentes especies (Lander *et al.* 2001). Esta conservación del contenido genético del cromosoma X se piensa que es debida a la necesidad de mantener un nivel de expresión adecuado de los genes ligados al X mediante los mecanismos de compensación de dosis (Hartl y Lozovskaya 1994; Graves 1996). En *Drosophila*, aunque no podemos descartar que los mecanismos de compensación de dosis jueguen también un papel importante, probablemente la conservación del contenido genético no solo del cromosoma X sino también de los autosomas sea debida a la ausencia de reordenaciones intercromosómicas (Powell 1997).

4.3.1 Estima de la tasa de transposición en el género *Drosophila*

De los 160 marcadores (ver Tabla 10) que han sido localizados en las especies del grupo *repleta*, *D. repleta* y/o *D. buzzatii*, solamente dos no hibridan en el elemento

cromosómico esperado de acuerdo con las homologías cromosómicas establecidas. Estas dos excepciones son el gen *Larval serum protein 1 alpha* (*Lsplalpha*) y el cósmido 174F6.

El gen *Lsplalpha* codifica la cadena alfa de la proteína LSP-1. Las proteínas LSP-1 y LSP-2 son las más abundantes en el suero de la larva. Estas proteínas están codificadas por cuatro genes: los genes *Lsplalpha*, *Lsplbeta* y *Lsplgamma* codifican las tres subunidades que forman la proteína LSP-1 y el gen *Lsp2* codifica la única subunidad de la que está formada la proteína LSP-2. Cada uno de estos genes está presente en una única copia en el genoma (Lepesant *et al.* 1982). El gen *Lsplalpha* está localizado en el cromosoma X de *D. melanogaster* (elemento A) pero hibrida en el cromosoma 2 de *D. repleta* y *D. buzzatii* (elemento E). Este gen también está localizado en el elemento E en 8 especies pertenecientes a los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* (Brock y Roberts 1983). Estos autores estudiaron la localización de los genes *Lsplalpha*, *Lsplbeta* y *Lsplgamma* en 14 especies del género *Drosophila*. En las especies del grupo *melanogaster* el gen *Lsplalpha* estaba localizado en el elemento A, el gen *Lsplbeta* en el elemento B y el gen *Lsplgamma* en el elemento D. En las otras 8 especies analizadas, pertenecientes a los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora*, los genes *Lsplalpha* y *Lsplbeta* estaban localizados en el elemento E. Basándose en análisis de heteroduplex de los genes *Lsplalpha*, *Lsplbeta* y *Lsplgamma* Smith *et al.* (1981) propusieron que la duplicación en tándem de un gen ancestral habría dado lugar a los genes *Lsplbeta* y *Lsplgamma* y más recientemente se habría producido la duplicación del gen *Lsplbeta* dando lugar al gen *Lsplalpha*. Posteriormente a la duplicación se habría producido el cambio de localización cromosómica de estos genes. Se ha sugerido que el gen *Lsplalpha* se ha transpuesto recientemente al cromosoma X en las especies del grupo *melanogaster* ya que este gen no presenta compensación de dosis (Smith *et al.* 1981).

El cósmido 174F6 está localizado en la zona de transición entre la eucromatina y la heterocromatina del cromosoma X (elemento A) de *D. melanogaster* (Madueño *et al.* 1995). Sin embargo, hibrida en la banda G5d próxima al centrómero del cromosoma 4 de *D. repleta* (elemento D). Este clon contiene el gen *suppressor of forked* (*su(f)*) (Madueño *et al.* 1995). El análisis de una región de 33 kb que rodea a este gen en la especie *D. melanogaster* muestra que la mayoría de esta región está formada por secuencias repetitivas. De hecho el gen *su(f)* está flanqueado por una secuencia repetida directa de 1,5 kb (Tudor *et al.* 1996). Secuencias homólogas a esta repetición de 1,5 kb

se encuentran en las regiones de transición entre la eucromatina y la heterocromatina de los brazos cromosómicos 2L (elemento B), 2R (elemento C) y 3L (elemento D) de la especie *D. melanogaster*. El cambio de localización cromosómica de este cósmido podría ser debido a eventos de recombinación ectópica entre estas secuencias homólogas que se encuentran en posiciones diferentes del genoma (Yi y Charlesworth 2000).

Si a los 160 marcadores hibridados en este estudio sumamos los hibridados por otros autores en las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* (Ranz *et al.* 1997; 1999; 2001; Ranz 1998) se puede obtener una estima de la tasa de transposición en el género *Drosophila*. Estos autores han analizado un total de 168 marcadores en los elementos cromosómicos A, D y E y no detectaron ninguna transposición. Por tanto, considerando todos los marcadores en conjunto, de un total de 328 marcadores, solo se han detectado las dos transposiciones descritas en este estudio. Esto supone una tasa de $4,9 \times 10^{-5}$ transposiciones por gen y por millón de años.

Esta cifra es una subestima. En primer lugar no incluye genes repetidos en tándem como las histonas o RNA ribosómicos que a menudo muestran transposición (Steinemann *et al.* 1984; Fitch *et al.* 1990). Además sólo se han detectado las transposiciones que han tenido lugar entre elementos cromosómicos diferentes. El patrón de bandas de los cromosomas politénicos entre especies tan alejadas como son *D. melanogaster* y *D. repleta* es tan diferente que no permite detectar las transposiciones que tienen lugar dentro de un mismo cromosoma aunque de hecho existen. Este es por ejemplo el caso de los genes anidados *Rhodopsin 4 (Rh4)* y *seven in absentia (sina)*. El gen *sina* está localizado en un intrón del gen *Rh4* en el brazo cromosómico 3L de *D. melanogaster* (elemento D) (Montell *et al.* 1987). Sin embargo en *D. virilis* (Neufeld *et al.* 1991) y *D. repleta* y *D. buzzatii* (Ranz 1998) estos dos genes están localizados en el elemento D pero en posiciones cromosómicas alejadas. Al analizar la secuencia de estos dos genes en *D. virilis* y compararla con la de *D. melanogaster* se vio que el gen *Rh4* carecía de intrón en la especie *D. virilis* (Neufeld *et al.* 1991). Este resultado sumado al estudio de las regiones que flanquean estos genes en las dos especies llevó a los autores a proponer que la organización ancestral era la asociación entre los genes *Rh4* y *sina* y que un RNA mensajero del gen *Rh4* se retrotranscribió y se insertó en una posición citológica diferente del mismo elemento cromosómico en el linaje que conduce a *D. virilis*. Esta hipótesis se ve corroborada por los resultados obtenidos en este estudio. Los fagos P1 DS00383 y DS00052 están

localizados 75 kb aguas abajo respecto al gen *sina* en la especie *D. melanogaster*. Estos dos clones hibridan en la misma región cromosómica que *sina* en *D. repleta* y *D. buzzatii* (banda B4c-e) mientras que *Rh4* hibrida en una posición diferente (banda F2g-h). Este resultado indica que es el gen *Rh4* el que ha cambiado de localización cromosómica y este cambio ha tenido lugar antes de la divergencia entre las especies del grupo *repleta* y *D. virilis* que tuvo lugar hace aproximadamente unos 30 millones de años (Neufeld *et al.* 1991).

Se ha propuesto que la tasa de transposición es más elevada en el subgénero *Sophophora* que en el *Drosophila* (Tonzetich *et al.* 1990). En este trabajo se han analizado dos especies del subgénero *Drosophila* y en todos los casos las hibridaciones en las dos especies han sido coincidentes. El único clon que hibridó de forma diferencial, el cósmido 11G9, en *D. repleta* dio una única señal en la banda B1e del cromosoma X mientras que en *D. buzzatii* dio señales múltiples en todos los cromosomas. Este resultado no parece deberse a una transposición sino probablemente a que el clon contiene algún tipo de secuencia repetitiva existente en *D. buzzatii* pero no en *D. repleta*. El no detectar transposiciones entre las especies del subgénero *Drosophila* está de acuerdo con lo esperado según la hipótesis de Tonzetich *et al.* (1990). La observación de un mayor número de inversiones y fusiones céntricas fijadas en el subgénero *Sophophora* (Sperlich y Pfriem 1986; Powell 1997; Ranz *et al.* 1999) apunta también a una mayor tasa evolutiva en el linaje que conduce a este subgénero.

Para obtener mejores estimas de la tasa de transposición en el género *Drosophila* sería necesario el análisis de especies próximas en las que los cromosomas politénicos puedan ser comparados y por lo tanto las transposiciones intracromosómicas puedan ser detectadas.

4.4 Tasas de fijación de inversiones en el genoma de *Drosophila*

Los mapas físicos obtenidos en *D. repleta/D. buzzatii* para los elementos A (Figura 7) y D (Figura 9) y para una región de 1,944 Mb del elemento B (apartado 3.1) permiten llevar a cabo una comparación detallada de la organización molecular de estos elementos con la de sus cromosomas homólogos en *D. melanogaster*.

Como se puede ver en las Figuras 7 y 9 a lo largo de la evolución de estas dos especies se ha producido una gran reorganización del orden de los genes a lo largo de los cromosomas. La correlación por rangos de Spearman es en ambos casos no significativa. El valor del estadístico R para el cromosoma X es $R = 0,062$ ($P > 0,05$; 6 empates); y para el cromosoma 4: $R = 0,184$ ($P > 0,05$; 2 empates). Este resultado indica que el orden de los genes se ha aleatorizado completamente. La reorganización del contenido genético de los elementos A y D puede ser atribuida a la fijación de inversiones paracéntricas si consideramos que las tasas de transposición son bajas (ver apartado 4.3.1) y que este tipo de inversiones es el cambio cromosómico más frecuente a lo largo de la evolución del género (Clayton y Guest 1986; Powell 1997).

Utilizando el método de máxima verosimilitud descrito por Ranz *et al.* (1997) se ha estimado el número de inversiones fijadas durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* para los elementos cromosómicos A y D. Para el elemento A la estima, basada en el análisis de 81 marcadores, es de 118 ± 17 inversiones fijadas (\pm SD). La estima del número de inversiones fijadas en el elemento cromosómico D es de 56 ± 8 y está basada en el análisis de 79 marcadores.

La estima para el número de inversiones fijadas en el elemento B se obtuvo comparando la localización de 26 marcadores que recubren totalmente una región de 1,944 Mb que rodea al locus *Adh* (ver apartado 3.1). Si extrapolamos los datos obtenidos para esta región a la totalidad del cromosoma se obtiene una estima para el número de inversiones (\pm SD) de 30 ± 13 . Esta extrapolación está basada en varias consideraciones. En primer lugar, podemos considerar la región que rodea al locus *Adh* como una región “típica” del genoma (Ashburner *et al.* 1999). En segundo lugar, el análisis de cuatro regiones del elemento cromosómico E de tamaños comprendidos entre 0,7 y 1,8 Mb mostró que no había diferencias significativas entre ellas en la densidad de puntos de rotura fijados (Ranz *et al.* 2001).

El coeficiente de variación de las estimas para los elementos cromosómicos A y D es bajo (14%) y comparable al de la estima obtenida para el elemento E (12%) en estas mismas especies (Ranz *et al.* 2001). Sin embargo, el coeficiente de variación de la estima para el elemento B es más elevado (43%). Esta diferencia se debe al número de marcadores utilizados para la construcción de los mapas físicos ya que la precisión de las estimas está directamente relacionada con el número de marcadores (Schoen 2000). Sin embargo, simulaciones por ordenador llevadas a cabo con el método descrito en Ranz *et al.* (1997) muestran que el coeficiente de variación no es una función lineal del

número de marcadores sino que sigue una distribución exponencial negativa (D. Schoen, comunicación personal). Esto implica que una disminución del coeficiente de variación de las estimas para los elementos A y D requeriría un incremento muy elevado del número de marcadores. La estima del número de inversiones fijadas en el elemento cromosómico E está basada en la comparación de 158 marcadores mientras que las estimas para los elementos A y D están basadas en 81 y 79 marcadores respectivamente. Por lo tanto un incremento de 2 veces el número de marcadores conlleva una disminución del coeficiente de variación de tan solo un 2%.

4.4.1 Comparación de las tasas de evolución cromosómica

Las tasas de fijación de inversiones obtenidas para los elementos cromosómicos A, B y D entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* pueden ser comparadas entre si y también con la obtenida por Ranz *et al.* (2001) para el elemento E en estas mismas especies. Sin embargo, debido a que el tamaño de los elementos cromosómicos es diferente las tasas no son directamente comparables. Para que los datos sean comparables se han expresado como densidad de puntos de rotura por Mb, es decir, el número de puntos de rotura estimados dividido por el tamaño en Mb de cada elemento cromosómico en la especie *D. melanogaster*. Como se puede ver en la Tabla 11 la densidad de puntos de rotura varía hasta cuatro veces entre los diferentes elementos cromosómicos y estas diferencias son estadísticamente significativas. La densidad de puntos de rotura más elevada es la del cromosoma X (10,83) aunque también existen diferencias entre las densidades de los tres autosomas analizados. El elemento E presenta la densidad más elevada (8,14), el elemento D una densidad intermedia (4,63) y el elemento con la densidad más baja es el B (2,57). La densidad promedio para la totalidad del genoma es de 6,54 puntos de rotura por Mb lo que supone un total de 393 inversiones paracéntricas fijadas durante la divergencia de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* (Tabla 11). Si consideramos 62 millones de años como el tiempo de divergencia entre los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* a los que pertenecen estas dos especies (Beverly y Wilson 1984; Russo *et al.* 1995) obtenemos estimas para la tasa de evolución de los diferentes elementos cromosómicos que oscilan entre 0,021 (elemento B) y 0,087 (elemento A) puntos de rotura fijados por Mb y por Ma. La tasa de evolución del genoma en su conjunto es de 0,053 puntos de rotura fijados por Mb y por Ma.

Tabla 11. Tasas de evolución cromosómica de los diferentes elementos cromosómicos desde la divergencia entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta*. Los datos para el elemento cromosómico E son de Ranz *et al.* (2001).

Elemento cromosómico	A	B	D	E	A-F
Tamaño de la eucromatina (Mb) en <i>D. melanogaster</i>	21,8	23,0	24,4	28,0	120
Número estimado de puntos de rotura	236 ± 33	59 ± 25	113 ± 16	228 ± 28	785
Densidad de puntos de rotura (por Mb) ± SD	10,83 ± 1,56	2,57 ± 1,10	4,63 ± 0,66	8,14 ± 1,00	6,54
Longitud esperada de los segmentos conservados (kb)	92,0	383,3	214,0	122,3	200,5
Número de inversiones fijadas ± SD	118 ± 17	30 ± 13	56 ± 8	114 ± 14	393
Tasa de evolución (disrupciones por Mb por Ma)	0,087	0,021	0,037	0,066	0,053

Las estimas obtenidas para el número de puntos de rotura fijados entre las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* son comparables a las estimas obtenidas para otras especies del género. Segarra *et al.* (1995) comparan los mapas físicos del cromosoma X en las especies *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura* y estiman que se han producido 0,086 puntos de rotura por megabase y por millón de años desde la divergencia de estas dos especies. Esta estima es muy parecida a la obtenida para las especies del grupo *repleta* al analizar este mismo elemento cromosómico (0,087 puntos de rotura por Mb por Ma). Vieira *et al.* (1997a; 1997c) analizan la evolución cromosómica de los elementos A, D y E en tres especies del grupo *virilis* (*D. virilis*, *D. montana* y *D. novamexicana*). Las tasas que obtuvieron fueron 0,036-0,056 puntos de rotura fijados por Mb y por Ma para el cromosoma X (elemento A), 0,032 para el cromosoma 2 (elemento E) y 0,009-0,014 para el cromosoma 3 (elemento D). Por tanto en las especies del grupo *virilis* se observa el mismo patrón evolutivo que en las especies del grupo *repleta*: el cromosoma X evoluciona más rápido que los autosomas y hay diferencias entre los autosomas, el elemento E evoluciona más rápido que el D. Esto sugiere que este patrón evolutivo podría ser común para todo el género *Drosophila*.

Ranz *et al.* (2001) proponen que la tasa de evolución en *Drosophila* es dos ordenes de magnitud superior a la tasa en mamíferos y 5 veces superior a la de los linajes de plantas más dinámicos. Hay que tener en cuenta que la resolución de los mapas de las especies del género *Drosophila* es mayor que la de los mapas de las otras especies (ver Tabla 5). Cuando se han realizado estudios comparativos más detallados en mamíferos se ha visto que el número de reordenaciones era superior al descrito previamente (Sun *et al.* 1999; Puttagunta *et al.* 2000; Müller *et al.* 2000; Frönicke y Wienberg 2001). Sin embargo, la tasa de evolución cromosómica en *Drosophila* sigue siendo la más elevada. Existen factores que podrían estar implicados en una mayor tasa evolutiva del género *Drosophila* en comparación con otras especies. Estos factores son tiempo de generación más corto, mayor tasa de mutación y un menor efecto detrimental de las inversiones sobre la fertilidad (Ranz *et al.* 2001). Esta conclusión sigue siendo válida si consideramos la estima obtenida a partir de los datos para los elementos A, B, D y E de forma conjunta. Sin embargo, Seoighe *et al.* (2000) comparando las secuencias de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* estiman que durante la divergencia de estas especies se han producido 1100 inversiones de un solo gen. Esto supone una tasa de fijación de puntos de rotura de 0,28 por Mb y Ma. Esta estima es un orden de magnitud superior a la estima obtenida para las especies del género

Drosophila. Esta diferencia podría ser debida a la diferente escala a la que están realizados los dos estudios. Mientras que las estimas para *Drosophila* se basan en la comparación de mapas físicos, la estima para las dos especies de levadura se ha obtenido a partir de la comparación de la secuencia de los dos organismos (Seoighe *et al.* 2000; Ranz *et al.* 2001).

4.4.2 Factores implicados en las diferentes tasas de evolución cromosómica

Dos tipos de factores pueden estar implicados en las diferentes tasas evolutivas obtenidas para los diferentes elementos cromosómicos en el género *Drosophila*: factores mutacionales y factores selectivos.

Una mayor tasa de fijación de inversiones podría ser debida a una mayor tasa de mutación. En *Drosophila* los elementos transponibles han sido implicados en el origen de las inversiones naturales (Montgomery *et al.* 1991; Lim y Simmons 1994). Cáceres *et al.* (1999a) demostraron que el mecanismo por el cual los elementos transponibles generan inversiones cromosómicas es la recombinación ectópica entre copias de elementos localizadas en orientación inversa en diferentes posiciones del mismo cromosoma. Una mayor tasa de mutación podría por lo tanto ser debida a una mayor proporción de DNA repetitivo o a una mayor tasa de recombinación.

Si consideramos los datos obtenidos a partir del análisis de la secuencia del genoma de *D. melanogaster* (Tabla 12) el cromosoma X, que en este estudio muestra una mayor tasa evolutiva, no tiene una densidad mayor de elementos transponibles que los autosomas (Rizzon *et al.* 2002; C. Rizzon, comunicación personal). Si consideramos la densidad de secuencias microsatélite, en el cromosoma X hay una mayor densidad que en los autosomas (Katti *et al.* 2001). La mayor cantidad de DNA repetitivo en este cromosoma puede ser debida a la presencia de secuencias repetidas que son exclusivas o más abundantes en la eucromatina del X que en la de 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). El mayor contenido en DNA repetitivo del cromosoma X tiene varias implicaciones: podría ser la explicación a la aparente menor densidad génica encontrada en la porción telomérica de este cromosoma en las especies del grupo *repleta* (ver apartado 3.2.3) y también de la frecuente asinapsis de esta región en los cromosomas politénicos de los híbridos interespecíficos en este mismo grupo de especies (Ruiz y Wasserman 1993). Además la densidad de secuencias microsatélite en

los autosomas concuerda con sus tasas evolutivas: el brazo cromosómico 2L es el que tiene la menor tasa evolutiva y también la menor densidad de este tipo de secuencias mientras que los brazos cromosómicos 3L y 3R tienen tasas evolutivas y contenido en DNA satélite intermedios entre el cromosoma X y el brazo cromosómico 2L. Las secuencias microsatélite pueden generar estructuras secundarias que son inestables (Mitas 1997; Moore *et al.* 1999) y pueden estar implicadas en el origen de las reordenaciones cromosómicas (Puttagunta *et al.* 2000; Pletcher *et al.* 2000). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la implicación de las secuencias microsatélites en el origen de las inversiones en *Drosophila*.

Una mayor tasa de mutación podría también ser debida a una mayor tasa de recombinación. Se asume que la tasa de recombinación ectópica está correlacionada con la tasa de recombinación meiótica (Montgomery *et al.* 1991). En la especie *D. melanogaster* el cromosoma X tiene una mayor tasa de recombinación que los autosomas lo cual estaría de acuerdo con su mayor tasa evolutiva. Sin embargo la tasa de recombinación de los autosomas 2L, 3L y 3R es muy parecida (Tabla 12) mientras que sus tasas evolutivas son diferentes (Tabla 11). Además se ha de tener en cuenta que las tasas de recombinación varían de unas especies a otras (True *et al.* 1996; Cáceres *et al.* 1999b) por lo que las tasas de *D. melanogaster* no son extrapolables a otras especies del género.

El otro tipo de factores que pueden afectar la tasa de fijación de inversiones son los factores selectivos. Charlesworth *et al.* (1987) proponen que el cromosoma X evoluciona más rápido que los autosomas debido a una mayor probabilidad de fijación de reordenaciones cromosómicas subdominantes y reordenaciones parcial o totalmente recesivas. También se ha propuesto que cuando las reordenaciones cromosómicas tiene un efecto antagónico en los dos sexos tienen una mayor probabilidad de fijación si están ligadas al X que si son autosómicas (Rice 1984). Estas hipótesis concuerdan con una mayor tasa de evolución del cromosoma X. Sin embargo no explican las diferentes tasas evolutivas de los autosomas.

Tabla 12. Características básicas de los elementos cromosómicos de *D. melanogaster*.

Brazo cromosómico	Tamaño (cM/Mb) ^a	Tasa de recombinación (cM por Mb)	Genes ^b		Elementos transponibles ^c		Microsatélites ^d	
			Número	Densidad	Número	Densidad		
X	73,1/21,8	3,35	2 314	106,1	175	8,03	13 658	626,5
2L	55/23,0	2,39	2 378	103,4	213	9,26	6 012	261,4
2R	55/21,4	2,57	2 616	122,2	212	9,91	6 264	292,7
3L	47/24,4	1,93	2 583	105,9	182	7,46	7 157	293,3
3R	63,9/28,0	2,28	3 357	119,9	183	6,54	8 666	309,5
4	3/1,2	2,5	83	69,2	42	35,00	-	-

^aLindsley y Zimm 1992

^bDatos procedentes de la segunda versión de la secuencia del genoma de *D. melanogaster* (Release 2) S. Misra (comunicación personal)

^cC. Rizzon *et al.* 2002; C. Rizzon (comunicación personal)

^dKatti *et al.* 2001.

Una mayor tasa evolutiva sería de esperar en regiones con menos restricciones funcionales como por ejemplo regiones con baja densidad génica ya que si los puntos de rotura de una reorganización se producen dentro de un gen es más probable que la reorganización tenga un efecto deletéreo y que por tanto sea eliminada por la selección natural antes de que llegue a fijarse. Lander *et al.* (2001) comparan las regiones en las que se han fijado puntos de rotura con regiones conservadas del genoma humano y encuentran que la densidad de genes en las regiones en las que se ha fijado un punto de rotura es inferior a la de las regiones de segmentos conservados. Este resultado sugiere que los puntos de rotura tienen una mayor probabilidad de ocurrir o de fijarse en regiones pobres en genes. En *Drosophila* también se ha observado que es más probable que los puntos de rotura de inversiones fijadas se encuentren entre genes (Cirera *et al.* 1995; Cáceres *et al.* 1999a) que dentro de genes (Schneuwly *et al.* 1987). La densidad génica promedio en *Drosophila* es de un gen cada 9 kb aunque varía mucho de unas regiones a otras del genoma (Adams *et al.* 2000). La densidad génica promedio en los diferentes elementos cromosómicos es comparable (Tabla 12). Aparentemente por tanto no hay correlación entre densidad génica y tasa evolutiva. Sin embargo, hay que tener en cuenta que puede haber variación de la densidad génica dentro de un mismo elemento cromosómico. Jabbari y Bernardi (2000) destacan que las regiones ricas en GC pueden tener hasta 7 veces más genes que las regiones pobres en GC. La distribución de los marcadores del cromosoma X hibridados en el presente trabajo en las especies del grupo *repleta* sugiere que hay variaciones en densidad génica de hasta 6 veces entre diferentes regiones de este cromosoma (ver apartado 3.2.3). Teniendo en cuenta la variación en densidad génica existente a lo largo de un determinado elemento cromosómico se puede concluir que brazos cromosómicos ricos en intervalos pobres en genes tendrán una mayor probabilidad de fijación de puntos de rotura que brazos con poca o ninguna variación en densidad génica.

La probabilidad de fijación de las inversiones cromosómicas dependerá además de sus efectos genéticos y fenotípicos. Por ejemplo, en los heterocariotipos las inversiones reducen la recombinación dentro del segmento invertido (Navarro *et al.* 1997) aunque pueden aumentarla en los cromosomas no homólogos (Lucchesi y Suzuki 1968). Por lo tanto la fijación o no de una inversión dependerá de la combinación epistática de alelos incluidos en la inversión (Krimbas y Powell 1992) y de la tasa de recombinación de la especie (Cáceres *et al.* 1999b). En algunos casos las inversiones pueden estar asociadas con la deriva meiótica o “meiotic drive” y ser transmitidas

preferencialmente a la descendencia. Este es el caso por ejemplo de la reordenación “sex-ratio” del cromosoma X (Ashburner 1989). Los machos que presentan esta reorganización producen principal o exclusivamente descendencia femenina mientras que las hembras heterocigóticas para esta ordenación producen tanto descendencia masculina como femenina. Los cromosomas portadores de esta reorganización tienen por tanto una ventaja selectiva debido a la distorsión de la segregación que causan.

Debido por tanto a los múltiples efectos de las inversiones parece poco probable que un único factor pueda explicar la variación en la tasa de evolución entre cromosomas observada en el género *Drosophila*. Es más probable que varios factores, cantidad de DNA repetitivo, tasa de recombinación o densidad génica entre otros, contribuyan a esta variación.

4.5 Segmentos cromosómicos conservados y restricciones funcionales

La comparación de los mapas físicos de los elementos cromosómicos A y D y de la región *Adh* del elemento B nos permiten identificar los segmentos cromosómicos que se han conservado a lo largo de la evolución de las especies *D. melanogaster* y *D. repleta* (apartado 3.1; Figuras 7 y 9). En el elemento A se han identificado 9 segmentos conservados que contienen dos o más marcadores. El tamaño de estos segmentos oscila entre 4,4 kb y 576 kb con un tamaño promedio de 170,7 kb. En el elemento D se han encontrado 13 segmentos conservados que contienen dos o más marcadores. El tamaño de estos segmentos oscila entre 152 kb y 939 kb con un tamaño promedio de 386,9 kb. Además de estos segmentos, formados todos ellos por dos o más marcadores, en el elemento A se han identificado 39 “singletons”, segmentos que contienen un único marcador, y 29 en el elemento D. En la región *Adh* del elemento B estudiada se han identificado 6 segmentos conservados de tamaños comprendidos entre 50 kb y 531 kb con un tamaño promedio de 323,5 kb.

Las estimas obtenidas para el número de inversiones fijadas en los elementos A, B y D nos permiten predecir el tamaño promedio de los segmentos conservados esperados de acuerdo con el nivel de reorganización observado en cada uno de estos elementos cromosómicos. Así el tamaño de los segmentos conservados esperado es de 92 kb, 383,3 kb y 214 kb para los elementos A, B y D respectivamente. En el caso de

los elementos A y D el tamaño observado es mayor que el esperado. Esto es debido a que sólo los segmentos que incluyen dos o más marcadores se han considerado a la hora de estimar el tamaño promedio observado y a que hay un sesgo a la hora de identificar los segmentos conservados: los segmentos grandes son los primeros en ser identificados (Nadeau y Sankoff 1998b). En el caso del elemento B el tamaño promedio observado es menor que el esperado. En este caso la región *Adh* ha sido estudiada completamente de manera que todos los segmentos conservados han sido identificados. Sin embargo hay que tener en cuenta que el error asociado a la estima para el número de inversiones en el elemento B, a partir del cual se estima el tamaño esperado, es elevado.

Existen dos hipótesis que intentan explicar la conservación de segmentos cromosómicos a lo largo de la evolución. Algunos autores argumentan que los genes incluidos en los segmentos conservados pueden representar combinaciones génicas que interactúan funcionalmente y que por tanto son mantenidos como un segmento conservado por la selección natural (Randazzo *et al.* 1993; Maier *et al.* 1993; Wright 1996). Sin embargo, debido a que todos los genomas están filogenéticamente relacionados, los segmentos conservados pueden ser el resultado de la fijación de un número limitado de reordenaciones con puntos de rotura al azar desde la divergencia de las dos especies comparadas (Nadeau y Taylor 1984; Nadeau y Sankoff 1998a). Estudios previos de cartografía comparativa en *Drosophila* (Ranz *et al.* 2001) y otros organismos (Nadeau y Sankoff 1998a; Lander *et al.* 2001; Huynen *et al.* 2001) no han encontrado evidencias de restricciones funcionales. La hipótesis de la conservación de segmentos cromosómicos debida a restricciones funcionales puede ser contrastada comparando la distribución de las longitudes de los segmentos conservados observada con la predicha por esta hipótesis que se aproxima a una distribución exponencial negativa. Como se puede ver en la Figura 10 la distribución observada se ajusta a la esperada. Sólo un segmento en el elemento A y uno en el D no se ajustan a lo esperado. En el elemento A este segmento tiene 576 kb y está delimitado por los marcadores DS02496 y *RpII215*. En el elemento D se han conservado dos segmentos de más de 900kb (el delimitado por *kls* y DS07291 de 915 kb y el delimitado por *Sod* y DS05904 de 939 kb). Estos dos segmentos podrían representar combinaciones génicas que han sido preservadas por la selección natural. Sin embargo, debido a que los fragmentos de 576 kb y 915 kb están formados por tan solo dos marcadores y el segmento de 939 kb por 3 es probable que la localización de marcadores intermedios indicara la existencia de reordenaciones que no se han detectado.

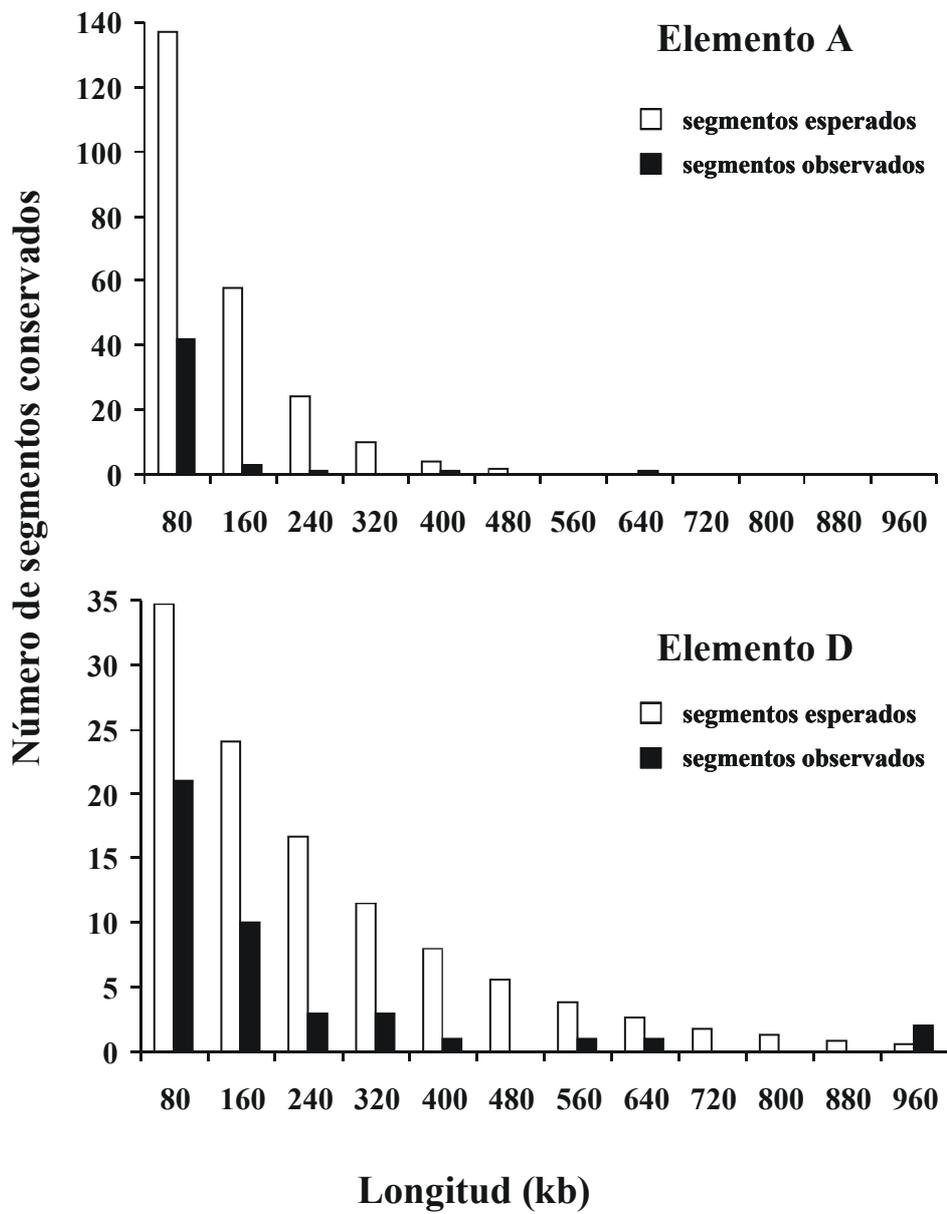


Figura 10. Distribución esperada (blanco) y distribución observada (negro) de la longitud de los segmentos conservados en la comparación *D. melanogaster*/*D. repleta*.

4.5.1 Complejos génicos conservados

Hay algunos ejemplos de complejos génicos en los cromosomas X (complejo *achaete-scute*) y 3L (complejo *iroquois* y complejo *knirps knirps-related*) de *D. melanogaster* que muestran expresión corregulada. La conservación de estos tres complejos génicos en las especies del grupo *repleta* sugiere que la selección natural debe jugar un papel en algunos casos para mantener juntos genes funcionalmente relacionados en *Drosophila*.

4.5.1.1 El complejo *achaete-scute*

El complejo *achaete-scute* (*ASC*) ha sido estudiado de forma exhaustiva en la especie *D. melanogaster* (Modolell y Campuzano 1998). Este complejo, implicado en el desarrollo de las quetas, está localizado en el cromosoma X entre los genes *yellow* (*y*) y *Cytochrome P450-4g1* (*T1*) y tiene un tamaño aproximado de 90 kb. Las unidades de transcripción incluidas en este complejo están separadas por regiones largas de DNA no transcrito y solo cuatro de ellas están implicadas en el desarrollo de órganos sensoriales y del sistema nervioso central. Estos cuatro genes son: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l(1)sc*) y *asense* (*ase*). Esta región contiene varias secuencias reguladoras en cis que corregulan los genes *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*).

La organización molecular de un segmento de 210 kb delimitado por los marcadores 125H10 y 65F1 que contiene entre otros los genes del complejo *ASC* ha sido analizada en *D. repleta* y *D. buzzatii* (Figura 11). H. Naveira (comunicación personal) localizó el gen *sc* en la banda X (B3ab) en la especie *D. buzzatii*. El cósmido 125H10, que contiene entre otros el gen *ac*, produce dos señales de hibridación una en X(C3b) y otra en X(B3ab). Los dos cósmidos adyacentes 198A6, que contiene los genes *sc* y *l(1)sc* y 165H7 hibridan en X(B3ab). Por tanto es muy probable que sea la región 3' del cósmido 125H10 la responsable de la señal en X(B3ab) y la región 5' la que hibrida en C3b (Figura 11). El cósmido 171D11, situado entre los cósmidos 165H7 y 65F1, produce tres señales de hibridación X(B3ab), X(A4f) y X(F4b). Puesto que el cósmido 65F1 da una única señal en X(F4b) lo más probable es que el extremo 5' del cósmido 171D11 hibride en B3ab, la parte central del cósmido en A4f y el extremo 3' en F4b. Como se puede ver en la Figura 11 los genes del complejo *ASC*, y las secuencias reguladoras localizadas entre ellos, quedan incluidos en un segmento que

está conservado en las especie *D. repleta* y *D. buzzatii*. Este complejo génico también está conservado en *D. virilis* (Beamonte 1990).

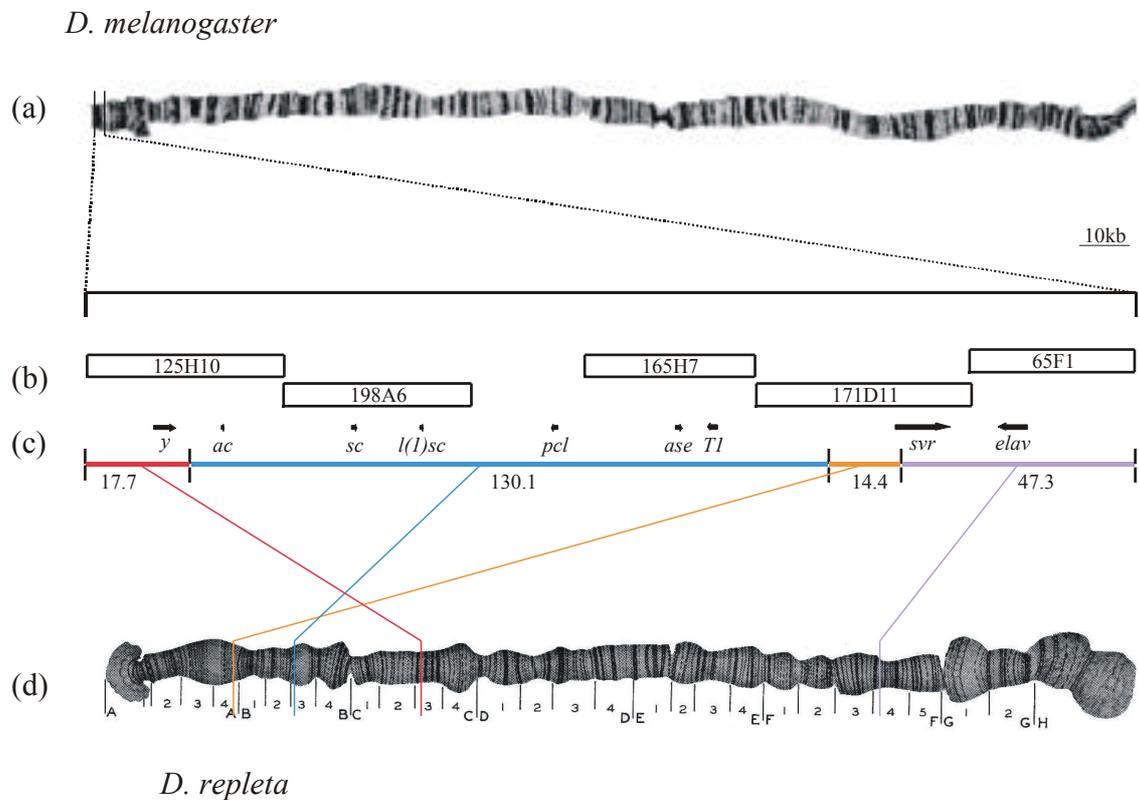


Figura 11. Complejo *achaete-scute* (ASC). (a) Localización del complejo ASC en el cromosoma X (B1-10) de *D. melanogaster*. (b) Ampliación de esta región. Los cósmidos hibridados en el presente estudio se han representado como rectángulos. (c) Segmentos conservados y su tamaño. Las flechas representan los genes localizados en esta región: *yellow* (*y*), *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l(1)sc*), *pepsinogen-like* (*pcl*), *asense* (*ase*), *Cytochrome P450-4g1* (*T1*), *silver* (*svr*), *embryonic lethal, abnormal vision* (*elav*). (d) Localización de los segmentos conservados en el cromosoma X de *D. repleta*.

4.5.1.2 El complejo *iroquois*

El complejo iroquois (*iro-C*) está formado por tres genes *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) y *mirror* (*mirr*) que aparentemente comparten secuencias reguladoras en cis (Gómez-Skarmeta *et al.* 1996; Kehl *et al.* 1998). Este complejo génico está implicado en la especificación de la identidad de diversos territorios del cuerpo de *Drosophila* y en la subdivisión de estos territorios en dominios más pequeños. Estos tres

genes están incluidos en un fragmento de aproximadamente 130 kb en el genoma de *D. melanogaster*. Se han identificado genes homólogos a los del complejo *iro-C* en varias especies de vertebrados. La organización genómica de estos genes está aparentemente conservada en ratón y humanos (Cavodeassi *et al.* 2001).

En las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* los genes *caup* y *ara* hibridan en la misma banda cromosómica. Su localización coincide con la del P1 DS08512, en el que están incluidos, y con la de los marcadores DS08585 y CG10632. Estos marcadores delimitan un segmento conservado de aproximadamente 396 kb. El gen *mirr* no está incluido en ninguno de los marcadores hibridados en este estudio. Por lo tanto en *D. repleta* y *D. buzzatii* al menos la organización de los genes *caup* y *ara* también está conservada.

4.5.1.3 El complejo *knirps knirps-related*

Los genes *knirps* (*kni*) y *knirps-related* (*knrl*) están implicados en la formación de la segunda vena longitudinal del ala de *Drosophila* (Lunde *et al.* 1998). Estos dos genes están incluidos en una región de unas 100 kb en *D. melanogaster* y se ven afectados por una secuencia reguladora en cis, *radius incompletus* (*ri*), situada aguas arriba del gen *kni*. En *D. repleta* estos dos genes y su secuencia reguladora están incluidos en un segmento conservado de aproximadamente 245 kb. Este segmento está formado por los fagos DS01369, que contiene el gen *knrl*, DS00239 y el gen *kni*.

4.5.2 Organización modular del genoma de *Drosophila*

En conjunto los resultados del presente trabajo concuerdan con la organización modular del genoma de *Drosophila* propuesta por Ranz *et al.* (2001). El genoma de *Drosophila* se puede considerar como un mosaico de módulos independientes que pueden cambiar de localización en la eucromatina sin que esto tenga consecuencias para su función. La gran mayoría de veces estos módulos cambian su posición dentro de un mismo cromosoma o brazo cromosómico mediante inversiones paracéntricas y solo ocasionalmente entre cromosomas. Sin embargo, hay algunas restricciones a estos cambios: algunas organizaciones génicas, como por ejemplo complejos de genes corregulados, es muy probable que sean mantenidas por la selección natural.

Las inversiones no solo han tenido un papel predominante en la evolución de las especies del género *Drosophila*. La comparación de la secuencia de los genomas de especies de levaduras muestra la prevalencia de las inversiones en la evolución del orden de los genes en estas especies (Seoighe *et al.* 2000; Llorente *et al.* 2000). En vertebrados, la comparación de los mapas del genoma de *Danio rerio* (zebrafish) y humanos puso de manifiesto que a lo largo de la evolución del genoma de estas dos especies las inversiones han sido más frecuentes que las translocaciones aunque los dos tipos de cambio han jugado un papel importante (Postlethwait *et al.* 2000). La comparación del genoma humano con los genomas de varias especies de mamíferos muestra que las inversiones son cuatro veces más frecuentes que las reordenaciones inter cromosómicas (Müller *et al.* 2000). En conjunto estos resultados sugieren un papel principal de las inversiones en la evolución del genoma eucariota (Huynen *et al.* 2001).

Se ha propuesto que la eucromatina de *Drosophila* contiene dominios de expresión organizados por secuencias aisladoras (Gerasimova *et al.* 2000; Mongelard y Corces 2001). La función de estas secuencias aisladoras es separar el genoma eucariota en dominios de manera que las secuencias reguladoras presentes en un dominio no puedan activar los promotores de genes presentes en otros dominios. Esta organización de la cromatina tiene implicaciones respecto a la distribución de los puntos de rotura: los puntos de rotura que tengan lugar dentro de dominios de expresión independientes tendrán consecuencias más graves que los puntos de rotura entre dominios. Se ha estimado que el tamaño de los dominios de expresión es aproximadamente 250 kb (Gerasimova *et al.* 2000). Este tamaño es parecido al tamaño promedio de los segmentos conservados en el genoma de *Drosophila*. Si el mecanismo de producción de inversiones es la recombinación ectópica entre copias de elementos transponibles (Cáceres *et al.* 1999a) o secuencias homólogas (Pletcher *et al.* 2000) los loops formados por los dominios de expresión podrían facilitar la recombinación al aproximar en el espacio regiones del DNA que de otra manera estarían separadas.

4.6 Comparación de la organización molecular de los elementos A, B y D entre *D. repleta* y *D. buzzatii*

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). De acuerdo con los resultados de Wasserman (1992) y Ruiz y Wasserman (1993) los cariotipos de estas dos especies difieren por 12 inversiones paracéntricas. La especie *D. repleta* tiene fijadas tres inversiones en el cromosoma X (Xa, Xb y Xc) cuatro inversiones en el cromosoma 2 (2a, 2b, 2t⁸ y 2u⁸) y una inversión en el cromosoma 3 (3b). El cariotipo de *D. buzzatii* tiene fijadas cuatro inversiones: tres en el cromosoma 2 (2m, 2n y 2z⁷) y una en el 5 (5g). Estas inversiones se han descrito a partir de la comparación del patrón de bandas de los cromosomas de estas especies. La comparación de la localización de marcadores moleculares en estas dos especies permite identificar con mayor precisión las bandas cromosómicas y determinar si los puntos de rotura de las inversiones descritas han sido correctamente asignados.

4.6.1 Organización molecular del elemento A

El cromosoma X de las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* se diferencia en tres inversiones paracéntricas. Xa, Xb y Xc. Se ha propuesto que los puntos de rotura de estas inversiones son Xa (C4g-D4b), Xb (F1a-F3a) y Xc (F3a-G2a) (Wasserman 1962). Las inversiones Xb y Xc son inversiones en tándem, es decir, comparten un punto de rotura. Esto podría ser un indicio de la existencia de puntos calientes en el genoma donde se acumulan puntos de rotura (Krimbas y Powell 1992). La comparación de los mapas físicos del cromosoma X en las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* pone en duda que estas dos inversiones estén realmente dispuestas en tándem.

En la Figura 12 se muestran dos ejemplos de hibridaciones de marcadores que se han localizado en la región en la que están descritas las inversiones Xb y Xc. El cósmido 171A8 hibrida en la especie *D. repleta* en las bandas F2g y F2j. Estas dos bandas están incluidas en la inversión Xb. Si los puntos de rotura asignados a esta inversión son los descritos en la literatura al hibridar este cósmido sobre la especie *D. buzzatii* se observarían dos señales cercanas (separadas únicamente por dos bandas) y en una posición un poco más telomérica.

Figura 12. Localización en *D. melanogaster*, *D. repleta* y *D. buzzatii* de los cósmidos 114E10 y 171A8.

Sin embargo, como se puede ver en la Figura 12 la hibridación de este cósmido sobre *D. buzzatii* produce dos señales separadas por un mayor número de bandas. En el caso del cósmido 114E10, que en *D. repleta* hibrida en la banda F2b, en *D. buzzatii* se esperaría observar una banda en aproximadamente la misma posición cromosómica. Lo que se observa es una señal mucho más próxima al centrómero.

En la Figura 13 se han representado los marcadores incluidos en las inversiones Xa, Xb y Xc así como los marcadores que flanquean estas inversiones. En el caso de la inversión Xa disponemos de 9 marcadores que están incluidos dentro de la inversión. Como se puede ver en la Figura 13 los marcadores externos a la inversión (A y K) no cambian de posición al comparar *D. repleta* y *D. buzzatii* mientras que los marcadores B-J están invertidos en *D. repleta* respecto a *D. buzzatii*. La posición de los marcadores que flanquean la inversión y la de los marcadores incluidos en la inversión concuerdan con lo esperado si los puntos de rotura de esta inversión son C4g y D4b como se ha propuesto.

Sin embargo, la posición de los marcadores incluidos en las inversiones Xb y Xc no concuerda con lo esperado de acuerdo con los puntos de rotura propuestos para estas inversiones. Los marcadores M-R están incluidos en la inversión Xb y los marcadores S-X en la Xc. Si los puntos de rotura asignados a estas inversiones son los descritos (Wasserman 1962) al comparar *D. repleta* y *D. buzzatii* esperaríamos encontrar los marcadores M-R invertidos y a continuación los marcadores S-W invertidos. Sin embargo el orden de los marcadores observados es diferente (Figura 13). Para explicar el orden de los marcadores observados es necesario proponer la existencia de dos inversiones solapantes. La primera inversión incluye los marcadores O-W. Esta inversión tendría el punto de rotura proximal situado aproximadamente en la banda F1c y el punto de rotura distal en G1e. La segunda inversión que incluye los marcadores M, N, W, V, U, T S y Q tendría el punto de rotura proximal en F1a y el distal en F2i.

Figura 13. Representación gráfica de las inversiones fijadas en el cromosoma X entre las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*. Las líneas discontinuas muestran las inversiones descritas en la literatura y las continuas las inversiones propuestas en este estudio. Además de los marcadores incluidos en las inversiones se han representado también los marcadores externos (A y K para la inversión Xa y L y Y para las inversiones Xb-Xc). Los marcadores representados son: para la inversión Xa, A (*sd*), B (186C8) C (36A5), D (8C2), E (190E8), F (28C2), G (*Act5C*), H (*csw*), I (173C3), J (94E9), K (DS00188). Para las inversiones Xb-Xc los marcadores son: L (CG7358), M (*Yp2*) N (*Yp1*), O (156H1[#]), P (114E10), Q (171A8), R (DS04269) S (DS03594), T (CG1716), U (116C6), V (171D11), W (65F1) X (142A8), Y (153F10).

4.6.2 Organización molecular del elemento B

El cromosoma 3 (elemento B) de la especie *D. buzzatii* es homosecuencial respecto al cromosoma 3 de *D. repleta* con la excepción de la fijación de la inversión 3b en esta última especie. Los puntos de rotura de esta inversión son D3d y E1a (Ruiz y Wasserman 1993). Todos los clones procedentes del cromosoma 2L de *D. melanogaster* hibridaron en el cromosoma 3 de estas especies y fueron localizados en la misma banda en las dos especies. Ninguno de estos clones está incluido dentro de esta inversión o próximo a sus puntos de rotura. Los resultados de las hibridaciones realizadas en este estudio concuerdan por tanto con la organización molecular del cromosoma 3 propuesta para las especies *D. repleta* y *D. buzzatii*.

4.6.3 Organización molecular del elemento D

No se ha descrito ninguna inversión fijada en el cromosoma 4 entre las especies *D. repleta* y *D. buzzatii* (Wasserman 1992). La hibridación de clones procedentes del cromosoma homólogo en *D. melanogaster* (cromosoma 3L) sobre las preparaciones de estas dos especies del grupo *repleta* corroboran esta observación. Todos los clones sin excepción hibridaron en la misma banda cromosómica en las dos especies.