



III Seminario de Citogenética

Bubión (Granada)

30 de junio–3 de julio de 2004



III Seminario de Citogenética

Bubión (Granada)

30 de junio–3 de julio de 2004

Organización

Juan Pedro M. Camacho
Josefa Cabrero
María Dolores López-León
Francisco Perfectti
Ángel Martín-Alganza

Alumnos colaboradores

Mohamed Abdelaziz Mohamed
María Teruel Artacho
María Inmaculada Manrique Poyato
Eugenia Elisabeth Montiel Jiménez
Antonio Jesus Muñoz Pajares

Con la colaboración de:

Sociedad Española de Genética
Universidad de Granada
Ayuntamiento de Bubión
Banco Santander Central Hispano
Cámara de Comercio de Granada
Oleo Mediterránea 2000
Genesys Instrumentación S.L.

Programa

30 de junio — Llegada

21.30 Copa de bienvenida
en la Casa de la Cultura de Bubión
(Patrocinado por la Universidad de Granada)

1 de julio

Primera Sesión

Moderador: María Jesús Puertas

- 9,00–9,30** Presentación
- 9,30–10,30** Barbara McClintock's controlling elements: the full story
—Jones, RN
- 10,30–10,50** Análisis del ADN satélite Msat-160 en especies de los géneros *Microtus* y *Pitymys*
—Acosta MJ, Marchal JA, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, Sánchez A
- 10,50–11,10** DNA repetitivo en el escarabajo *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae): caracterización y localización cromosómica
—Muñoz M, Lorite P, Palomeque T
- 11,10–11,40** Café
- 11,40–12,00** Estudio del DNA satélite en diversas especies del género *Aphaenogaster* (Hymenoptera, Formicidae)
—Palomeque T, Carrillo JA, Muñoz M, Lorite P
- 12,00–12,20** El ADN ribosómico 5S en algunos moluscos bivalvos
—Insua A, Freire R, López-Piñón MJ, Méndez J
- 12,20–12,40** Caracterización molecular y citogenética de rDNA en Ostreidos
—Cross I, Merlo MA y Rebordinos, L.
- 12,40–13,00** Localización cromosómica de los genes de histonas del núcleo octamérico en el mejillón
—Pérez-García C, Hurtado NS, Morán P, Pasantes JJ
- 13,30–17,00** Almuerzo

Segunda sesión

Moderador: Teresa Palomeque

- 17,00–17,20** El enigmático cromosoma de los Dinoflagelados
—Cuadrado A, Alverca E, Franca S, Díaz de la Espina SM, Jouve N
- 17,20–17,40** Aislamiento y caracterización de secuencias de ADN contenidas en los cromosomas I de *Sciara coprophila*
—Olavarrieta L, Loarce L, González Greciano P, Ruiz MF, Goday C, Sánchez L, Fominaya A
- 17,40–18,00** Efectos de un cromosoma B sobre el tamaño nucleolar
—Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM
- 18,00–18,30** Café
- 18,30–18,50** Estudio del tamaño nucleolar en relación al sexo y al nivel de ploidía en *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera)
—Montiel EE, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM
- 18,50–19,10** Inicio de la Meiosis en trigo bajo la acción de la colchicina
—Corredor E, Naranjo T
- 19,10–19,30** Aislamiento, caracterización y localización cromosómica de un DNA repetitivo en la especie de hormiga *Tapinoma Nigerium*
—Lorite P, Muñoz M, Palomeque T
- 21,00** Cena

2 de julio

Tercera sesión

Moderador: Juan Luis Santos

- 9,30–9,50** Secuencia de la recombinación y sinapsis en la meiosis de saltamontes
—Calvente A, Viera A, Page J, Parra MT, Gómez R, Suja JA, Santos JL, Rufas JS
- 9,50.-10,10** Comportamiento de las cohesinas durante la meiosis de ratón
—Gómez R, Parra MT, Viera A, Calvente A, Page J, Rufas JS, Suja JA
- 10,10–10,30** Análisis del proceso sináptico en *Arabidopsis thaliana*
—López E, Cuñado N, Romero C, Pradillo M, Sánchez-Morán E, Santos JL
- 10,30–10,50** Segregación de cromosomas homólogos en mutantes meióticos de *Arabidopsis thaliana*
—Pradillo M, López E, Sánchez-Morán E, Cuñado N, Romero C, Santos JL
- 10,50–11,10** Alteraciones meióticas en mutantes mei1 de *Arabidopsis thaliana*
—Marián A, Martín-Carnes J, Orellana J
- 11,10–11,40** Café
- 11,40–12,00** Alteraciones en el gen ATM de *Arabidopsis thaliana* y su efecto sobre la meiosis
—Montero L, Martín-Carnes J, Orellana J
- 12,00–12,20** ¿Hasta dónde tienen movimiento propio los neocentrómeros de centeno?
—García-Chico R, Sotillo E, González-Sánchez M, Manzanero S, Fernández-Núñez E, González-García M, Puertas MJ
- 12,20–12,40** Translocaciones, telotranslocaciones, micromanipulaciones y otras consideraciones
—Catarino S, Roca A, Vieira R, Fominaya A, Giraldez R

12,40–13,00 Obtención de deleciones cromosómicas en *Hordeum chilense*
—Cabrerera A

13,30–17,00 Almuerzo

Cuarta sesión

Moderador: José L. Bella

17,00–17,20 Nuevas aportaciones al conocimiento citogenético de los Alticinae
(Coleoptera, Chrysomelidae)
—Petitpierre E

17,20–17,40 Aplicación de la W-CGH (hibridación genómica comparativa completa) en estudios interespecíficos
—Pita M, Enciso M, de la Torre J, Fernández JL, Gosálvez J

17,40–18,00 Avances en el estudio de la zona híbrida de *C. parallelus*
—Zabal-Aguirre M, Arroyo F, Volk T, Butlin R, Bella JL

18,00–18,30 Café

18,30–18,50 Evolución de un cromosoma B introducido en una población natural del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*
—Manrique-Poyato MI, Cabrero J, Gómez R, Camacho JPM

18,50–19,10 Evolución de los cromosomas sexuales en el género *Rumex* (Polygonaceae)
—Navajas-Pérez R, de la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M, Garrido-Ramos MA

19,10–19,30 Los efectos parasíticos de los cromosomas B del centeno podrían ser beneficiosos a largo plazo
—González-Sánchez M, Chiavarino M, Jimenez G, Manzanero S, Rosato M, Puertas MJ

21,00 Cena

3 de julio

9,00–14,00 Excursión

14,00–17,00 Almuerzo

Quinta sesión

Moderador: Eduard Petitpierre

17,00–17,20 Cromosomas sexuales gigantes en *Microtus*: evolución de los bloques heterocromáticos
—Marchal Ortega JA

17,20–17,40 Estudio de la expresión de los lugares frágiles en *Mandrillus sphinx* (F. Cercopithecidae, Primates)
—Ruiz-Herrera A, García F, Ponsà M, Garcia M

17,40–18,00 Evaluación de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos: estrés oxidativo
—Enciso Lorences M, Gosálvez J, Fernández Álvarez JL

18,00–18,30 Café

18,30–19,00 Perspectivas de la Citogenética en España

19,00–20,00 Reunión de la Sección de Citogenética

21,00 Cena de clausura

Primera Sesión

Moderador: María Jesús Puertas

Análisis del ADN satélite Msat-160 en especies de los géneros *Microtus* y *Pitymys*

Acosta MJ, Marchal JA, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, Sánchez A

La familia de ADN satélite Msat-160 ha sido descrita en varias especies del género *Microtus* y se compone por monómeros de 160 pares de bases repetidos en tándem. En el presente trabajo hemos caracterizado este ADN satélite en la especie *Microtus nivalis*, que es considerada bastante primitiva dentro de este grupo e incluso situada por algunos autores en un género aparte. Además hemos descrito este ADN satélite en dos nuevas especies, *Pitymys savii* y *Pitymys duodecimcostatus*, ambas pertenecientes a un género estrechamente relacionado con el género *Microtus*.

El análisis de las secuencias de los diferentes monómeros y de las secuencias consenso para cada especie indica que este ADN satélite presenta una alta variabilidad intra e interespecífica. Mediante hibridación in situ fluorescente este ADN satélite se localizó en *M. nivalis* en todas las regiones centroméricas, a excepción de la del cromosoma Y, mientras que en *P. duodecimcostatus* se localizó exclusivamente en la región centromérica de un único par autosómico. Estos resultados de FISH están de acuerdo con los obtenidos en otras especies de micrótidos, siendo la localización cromosómica una característica muy variable en esta familia de ADN satélite.

El estudio filogenético de las secuencias del Msat-160 permite agrupar la mayoría de los monómeros por especies. Sin embargo, los monómeros de *M. cabreræ* y de las especies de *Pitymys* están agrupados en una misma rama, lo que sugiere una estrecha relación entre estas especies. Estos datos, junto con la presencia de este ADN satélite en *M. nivalis* y en las especies del género *Pitymys* podría suponer un dato a favor de la inclusión de estas especies en el género *Microtus*.

DNA repetitivo en el escarabajo *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae): caracterización y localización cromosómica

Muñoz M, Lorite P, Palomeque T

La familia Chrysomelidae es una de las familias más ricas en número de especies dentro del orden Coleópteros. Los Crisomélicos son insectos generalmente fitófagos, tanto en fase larvaria como adulta, estando generalmente especializados en determinadas especies vegetales. Dentro de esta familia se encuentra el género *Chrysolina*, género que presenta más de 400 especies con una distribución prácticamente mundial.

En este trabajo se ha caracterizado una secuencia de DNA repetitivo en la especie *Chrysolina carnifex*. El DNA genómico de la especie *Chrysolina carnifex* se digirió con una batería de enzimas de restricción. La digestión con EcoRV generó una banda en geles de agarosa de aproximadamente 440 pb. Este DNA repetitivo fue clonado y secuenciado (clones CCAE). El patrón de hibridación Southern de este DNA es complejo, no obteniéndose las escaleras típicas de los DNAs repetidos en tándem. La hibridación de DNA genómico digerido con EcoRV genera dos bandas, una correspondiente al fragmento clonado de 440 pb y una banda de 200 pb, visible en algunas restricciones con este enzima. El alineamiento de los ocho clones secuenciados da lugar a una secuencia consenso de 436 pb, existiendo variaciones debidas a la existencia de inserciones y deleciones en varios de las secuencias clonadas.

La hibridación in situ con sondas marcadas con biotina revela que este DNA repetitivo está localizado en las regiones pericentroméricas de todos los bivalentes meióticos.

La secuencia consenso está parcialmente enriquecida en adenina-timina (65%), existiendo algunas repeticiones directas e invertidas a lo largo de la secuencia.

La comparación de esta secuencia con las secuencias depositadas en las bases de datos no permite encontrar similitudes con otros DNAs repetitivos en otras especies de insectos, incluidos el DNA repetitivo encontrado en otra especie del mismo género, *Chrysolina americana*. El DNA repetitivo de esta última especie no está presente tampoco en *Chrysolina carnifex*, lo que indica que son familias de DNA especie-específicas.

Estudio del DNA satélite en diversas especies del género *Aphaenogaster* (Hymenoptera, Formicidae)

Palomeque T, Carrillo JA, Muñoz M, Lorite P

El DNA satélite de la especie *Aphaenogaster subterranea* ha sido estudiado con anterioridad por nuestro grupo. Este DNA satélite presenta una unidad monomérica de 162 pb, es relativamente rico en AT y presenta repeticiones directas e invertidas. Igualmente tiene dos características importantes. En primer lugar existen diferencias en la cantidad de DNA satélite entre castas, teniendo las obreras cuatro veces más DNA satélite que las reinas. En segundo lugar se ha observado transcripción del DNA satélite, lo cual ocurre en ambas hebras del DNA y en diferentes estadios del desarrollo.

A partir de la secuencia del DNA satélite de *Aphaenogaster subterranea* se han diseñado cebadores para detectar la presencia de esta familia de DNA en otras cinco especies del género *Aphaenogaster*. Como control se han amplificado el DNA satélite también en *A. subterranea*, no observándose diferencias entre los monómeros obtenidos por PCR y los obtenidos a partir de la restricción de DNA genómico.

En las cinco especies estudiadas ha sido posible amplificar el DNA satélite, indicando por tanto que es una familia de DNA satélite género-específica. Sin embargo existen diferencias en algunas posiciones de la secuencia pudiendo diferenciarse tres subfamilias distintas. Una primera subfamilia incluye a los monómeros de las especies *A. gibbosa*, *A. iberica* y *A. senilis*. Una segunda subfamilia incluye a los monómeros de las especies *A. subterranea* y *A. dulcinea*, y finalmente una tercera subfamilia formada por los monómeros de la especie *A. cardenai*.

A fin de establecer comparaciones se ha amplificado en las especies estudiadas una región del DNA mitocondrial 16S, observándose que las relaciones filogenéticas obtenidas con el DNA satélite y con el DNA 16S son similares.

El ADN ribosómico 5S en algunos moluscos bivalvos

Insua A, Freire R, López-Piñón MJ, Méndez J

En animales, al igual que en otros eucariotas, el ARN ribosómico (ARNr) 5S está codificado por genes presentes en múltiples copias. Generalmente, cada gen se encuentra asociado a un espaciador no transcrito formando una unidad que se repite en tándem en una o más regiones cromosómicas (ADNr 5S). No obstante, también se han descrito organizaciones más complejas como el ligamiento a otras secuencias repetidas, incluyendo los genes que codifican para los ARNr 18S, 5,8S y 28S (ADNr 18S-28S) o las histonas. A nivel intra- e interindividual, tanto la secuencia del gen como la del espaciador pueden mostrar variación, pero a nivel interespecífico ambas regiones difieren en la capacidad de acumular variantes; mientras la secuencia espaciadora varía la secuencia codificante permanece conservada.

Aunque los moluscos bivalvos constituyen un grupo importante de invertebrados por su abundancia y diversidad de especies, apenas se ha estudiado el ADNr 5S de estos organismos. En los últimos años, nuestro equipo investigador se ha centrado en la caracterización molecular de la unidad de repetición del ADNr 5S en varias especies y en determinar la localización cromosómica en relación al ADNr 18S-28S mediante hibridación in situ fluorescente. Presentamos los resultados más relevantes obtenidos en los mejillones (*Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis*), los pectínidos (*Aequipecten opercularis* e *Hinnites distortus*) y los berberechos (*Cerastoderma edule* y *C. glaucum*).

Caracterización molecular y citogenética de rDNA en Ostreidos

Cross I, Merlo MA y Rebordinos, L

En los últimos años el análisis de la localización de diversas secuencias de DNA, mediante FISH está centrando el estudio de muchas especies de interés en Acuicultura. En concreto, en nuestro laboratorio estamos realizando un estudio de la localización y caracterización de diversas secuencias en un bivalvo marino de interés acuicola como es *Crassostrea angulata*. Esta especie de la familia Ostreidae se distribuye principalmente por las costas de la provincia de Cádiz y Huelva y parte del Algarve portugués y se suele encontrar en la desembocadura de los rios o en sus zona de influencia. La utilización de fluorocromos específicos, bandeos de restricción y el análisis mediante FISH de secuencias teloméricas (TTAGGG)_n, repeticiones GATA y genes ribosómicos mayores, han formado parte del trabajo llevado a cabo para la caracterización cromosómica de esta especie. Por último, hemos realizado un estudio de la localización cromosómica del 5S rDNA y caracterización molecular del mismo. El análisis ha puesto de manifiesto dos localizaciones de este gen ribosómico en cromosomas diferentes, ninguna de las cuales coincide con la de los genes ribosómicos mayores. Además, la caracterización molecular mediante secuenciación del 5S codificante y su espaciador no transcrito (NTS) ha mostrado de manera sorprendente un ligamiento de este gen con un RNA pequeño nuclear (snRNA), en concreto el U2 snRNA, el cual se encuentra en forma invertida en el espaciador del 5S. Los snRNA son genes que se transcriben a RNA funcionales, que forman unas ribonucleoproteínas implicadas en el proceso de splicing del mRNA. El ligamiento entre el 5S rDNA y el U2 snRNA es la primera vez que se describe en el genoma de un organismo y podría haberse producido por la acción de ciertos mecanismos relacionados con secuencias que se encuentran en forma de repeticiones de tándem como las descritas en este trabajo.

Localización cromosómica de los genes de histonas del núcleo octamérico en el mejillón

Pérez-García C, Hurtado NS, Morán P, Pasantes JJ

La clase Bivalvia incluye algunas de las especies de invertebrados marinos mejor conocidas. Muchas de estas especies presentan un gran interés comercial y se cultivan en todo el mundo. A pesar de ello, la mayoría de los estudios cromosómicos realizados hasta la fecha en bivalvos se basan en el uso de técnicas citogenéticas clásicas, siendo escasos los trabajos en los que se usa la hibridación in situ fluorescente (FISH).

En el género *Mytilus*, los genes de histonas están organizados como repeticiones génicas regulares de las cuatro histonas del núcleo octamérico (H4, H2B, H2A y H3), localizándose de forma independiente los genes que codifican las histonas de unión (H1). Con el fin de localizar los genes de histonas en *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1758) y *Mytilus edulis platensis* (d'Orbigny, 1846) mediante FISH, se obtuvieron preparaciones cromosómicas tanto a partir de tejidos gonadal y branquial de juveniles, como a partir de embriones y larvas. Las sondas para histonas y ADNr 18 + 28S fueron generadas mediante PCR. Los cebadores se diseñaron teniendo en cuenta las secuencias que aparecen en el Genebank (Albig *et al*, 2003; Kenchington *et al*, 1995; White *et al*, 1990).

Los genes de las histonas del núcleo octamérico se encuentran agrupados en dos pares de cromosomas de tamaño medio, un par metacéntrico y un par submeta/subtelocéntrico. Dichas agrupaciones de genes se localizan cerca de la región centromérica sobre el brazo corto del cromosoma metacéntrico y en la región subteloamérica del brazo largo del par submeta/subtelocéntrico. Este último par no se corresponde con ninguno de los dos pares cromosómicos portadores de los NOR.

Segunda sesión

Moderador: Teresa Palomeque

El enigmático cromosoma de los Dinoflagelados

Cuadrado A, Alverca E, Franca S, Díaz de la Espina SM, Jouve N

Los dinoflagelados carecen de histonas y nucleosomas constituyendo los únicos *knock-out* de histonas entre los eucariotas. La característica más peculiar de estos protistas es probablemente la morfología y estructura de sus cromosomas. Son verdaderos eucariotas, con un ciclo celular (G1-S-G2-M) y citoplasma típico, cuando se comparan con otros eucariotas. A pesar de ello, sus cromosomas, permanentemente condensados durante todo el ciclo celular y ultraestructuralmente diferente al resto de eucariotas, son únicos en algunos aspectos. De ahí la semejanza entre los dinocromosomas y los nucleoides bacterianos. Sin histonas y con una proporción proteína/DNA diez veces inferior al resto de eucariotas, la estructura y función de estos cromosomas sigue siendo un enigma. Evidentemente, este grupo ha desarrollado un modo diferente de empaquetar su gran cantidad de DNA (200pg en algunas especies) en cromosomas.

Con el objetivo general de avanzar en el conociendo estructural y funcional de estos cromosomas estamos trabajando con varias especies de dinoflagelados, muy distintas en cuanto a su contenido de DNA y posiciones taxonómicas. *Prorocentrum micans*, *Alexandrium fundyense* y *Amphidinium carterae* son algunas de ellas. Muy importantes son nuestros resultados en torno a la naturaleza lineal de estos cromosomas. Desde el punto de vista estructural elimina cualquiera de los modelos estructurales toroidales, basados en la naturaleza circular de los mismos. Igualmente importantes son las implicaciones evolutivas de nuestros resultados, que sitúan firmemente a los dinoflagelados en el linaje eucariota, más cercanos a los eucariotas superiores que a los inferiores.

Aislamiento y caracterización de secuencias de ADN contenidas en los cromosomas L de *Sciara coprophila*

Olavarrieta L, Loarce L, González Greciano P, Ruiz MF,
Goday C, Sánchez L, Fominaya A

El ciclo biológico de *S. coprophila* se caracteriza por la eliminación específica de los cromosomas de origen paterno en diferente número, en distintos tejidos y en diferentes momentos del desarrollo. El complemento cromosómico de esta especie está constituido por autosomas, cromosomas X y cromosomas accesorios denominados L. Estos cromosomas L, de naturaleza heterocromática, también son eliminados en la línea somática del embrión temprano. La idea de este trabajo está motivada por el estudio de la impronta genómica que afecta a este tipo especial de cromosomas presentes exclusivamente en la línea germinal.

El ADN de 40 cromosomas L, aislados a partir de células germinales premeióticas, se utilizó para construir una genoteca cromosómica mediante el método LA-PCR. La comparación de las secuencias nucleotídicas clonadas en 102 clones con las existentes en los bancos de datos ha revelado la existencia de 13,8% de clones que no presentan secuencias homólogas en otros organismos y de 86,2% de clones con homología a diferentes secuencias de genomas de microorganismos, plantas o humano. A partir de las secuencias nucleotídicas de 29 clones, se diseñaron cebadores específicos para su utilización en PCR con el ADN genómico de *S. coprophila* y cromosómico de L. Los clones se seleccionaron en base a los siguientes criterios: 1) Clones sin homología; 2) Clones con homología a secuencias repetidas; y 3) Clones con homología a secuencias presumiblemente de copia única. Los resultados mostraron la existencia de secuencias específicas de los cromosomas L y de secuencias presentes también en la línea somática.

Efectos de un cromosoma B sobre el tamaño nucleolar

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM

El saltamontes *Eyprepocnemis plorans* posee genes para ARN ribosómico en la región paracentromérica de todos los cromosomas del complemento normal (A) y en la región distal del cromosoma B, aunque sólo suelen estar activos los localizados en los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y X. Recientemente hemos observado actividad nucleolar asociada al cromosoma B de algunos individuos de la población de Torrox (Málaga). Para analizar el efecto que esta actividad extra pudiera tener sobre el área nucleolar total por célula, hemos medido ésta en espermatozoides sometidos a impregnación argéntica, y procedentes de individuos capturados en dicha población en 1999 y 2003. Los resultados obtenidos revelan un incremento temporal del grado de actividad nucleolar del cromosoma B. Además observamos, en leptotene y diplotene, un efecto par-impar del cromosoma B sobre la cantidad total de área nucleolar, mostrando los individuos con número par de cromosomas B un área nucleolar significativamente mayor que los individuos con número impar. El análisis de las diplotenes, que ha permitido medir el área nucleolar contribuida por cada uno de los cromosomas del complemento, ha mostrado que este patrón par-impar está limitado al área nucleolar producida por los cromosomas A. Esto podría constituir una respuesta del genoma hospedador al número de cromosomas B.

Estudio del tamaño nucleolar en relación al sexo y al nivel de ploidía en *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera)

Montiel EE, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM

El tamaño nucleolar es un indicador del estado metabólico de la célula y, en algunas circunstancias, es proporcional al grado de expresión de los genes para ARNr. En una primera aproximación a la investigación del significado biológico del tamaño nucleolar, hemos analizado éste en relación al sexo y al nivel de ploidía en una especie de Himenópteros, la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis*, donde los machos y hembras normales son haploides y diploides, respectivamente. Además, hemos analizado machos PSR (portadores de un cromosoma B), machos diploides y hembras triploides, así como cuatro tipos diferentes de ginandromorfos que difieren en el grado de feminización. Un análisis previo, mediante citometría de flujo, de dos tejidos diferentes, hemolinfa y ganglio cerebral, confirmó los niveles de ploidía mencionados en el ganglio pero no en la hemolinfa, donde se produce un ajuste del nivel de ploidía en los machos acercándose al nivel diploide, similar al de las hembras normales. Esto nos llevó a descartar la hemolinfa como tejido apropiado para el estudio del tamaño nucleolar. Por otra parte, tres tipos de ginandromorfos resultaron ser haploides y el restante era diploide aunque, inesperadamente, este último no era el de mayor grado de feminización. El análisis de núcleos interfásicos de ganglios de todos los tipos de individuos mencionados, sometidos a impregnación argéntica, reveló varios hechos interesantes: 1) los núcleos son de mayor tamaño en machos que en hembras, en contra de lo esperado de sus niveles de ploidía, 2) las hembras muestran más nucleolos que los machos, en correspondencia con su mayor ploidía, 3) el tamaño nucleolar aumenta con el nivel de ploidía pero no depende del sexo, 4) los ginandromorfos se parecen a las hembras en tamaño nuclear y nucleolar, pero su número de nucleolos es similar al de los machos.

Inicio de la Meiosis en trigo bajo la acción de la colchicina

Corredor E, Naranjo T

El comienzo de la meiosis en los trigos poliploides se caracteriza por una redistribución de los cromosomas en el interior del núcleo adoptando éstos la configuración en bouquet. Paralelamente a la concentración de telómeros en un polo, en el opuesto, los centrómeros se asocian íntimamente en estructuras multiméricas a las que se ha atribuido un papel en la corrección del apareamiento homeólogo. Por otra parte, la administración de colchicina en la fase sensible de la interfase premeiótica produce un apareamiento cromosómico irregular. Con el fin de averiguar si el efecto de la colchicina guarda relación con los movimientos cromosómicos responsables de la formación del bouquet y de las asociaciones centroméricas complejas, se inyectaron espigas inmaduras con colchicina. Entre dos y cuatro días después de la inyección de colchicina, se seleccionaron anteras en una fase temprana de la meiosis que fueron analizadas mediante hibridación in situ con sondas teloméricas y centroméricas. La agrupación de telómeros resultó seriamente afectada por el tratamiento, observándose múltiples focos con varios telómeros agregados que aparecían dispersos por la periferia del núcleo en lugar de concentrados en una zona reducida,. Esta situación puede interpretarse como una etapa intermedia de la formación del bouquet bloqueada por la acción de la colchicina. En cambio, la agrupación de centrómeros se producía siguiendo un patrón similar en células tratadas y sin tratar. Antes de la formación del bouquet el número de señales se aproximaba al número haploide. Al comenzar la agrupación de telómeros, la mayoría de los meiocitos presentaban una distribución desigual de centrómeros, con varios señales de gran tamaño resultantes de la asociación múltiple de centrómeros, y otras de tamaño menor, que podrían corresponder a pares de centrómeros asociados o incluso a cromosomas individuales. Antes de la desorganización del bouquet, las estructuras multicentroméricas eran resueltas, volviendo a observarse un número de señales cercano al número haploide.

Aislamiento, caracterización y localización cromosómica de un DNA repetitivo en la especie de hormiga *Tapinoma nigerrimum*

Lorite P, Muñoz M, Palomeque T

La digestión de DNA genómico de la especie *Tapinoma nigerrimum* con HindIII genera una banda de 200 pb (TANI) que ha sido clonada y secuenciada. Las hibridaciones Southern usando la secuencia TANI como sonda no generan las escaleras típicas que se obtienen con el DNA repetitivo organizado en tándem. A partir de esta secuencia se han diseñado cebadores para amplificar la región localizada entre dos de estas secuencias, obteniéndose únicamente una banda de 1kb, que hemos denominado TANIPCR. El extremo 5' está constituido por una secuencia similar a la secuencia TANI mientras que existe menor similitud entre las secuencias TANI y el extremo 3' de las secuencias TANIPCR. Las hibridaciones Southern con las secuencias TANIPCR tampoco generan las escaleras típicas de los DNAs repetitivos en tándem.

Ninguno de los dos tipos de secuencias guarda similitud con otras secuencias depositadas en las bases de datos.

La hibridación in situ usando como sonda las secuencias TANIPCR pone de manifiesto que se encuentran localizadas preferentemente a nivel pericentromérico en todos los cromosomas de la especie, si bien en algunos de ellos estas secuencias se encuentran extendidas por otras regiones cromosómicas.

Se ha realizado una genoteca parcial de DNA genómico en esta especie, habiéndose aislado 8 clones diferentes que contienen las repeticiones TANIPCR. En otras especies de hormigas se ha detectado la asociación entre la heterocromatina y elementos genéticos móviles del tipo mariner. El análisis de los clones de la genoteca, pone de manifiesto también la asociación entre los elementos mariner y las secuencias TANIPCR, ya que en todos los clones de la genoteca aislados en los que es posible amplificar por PCR las secuencias TANIPCR también se puede amplificar los elementos mariner.

Tercera sesión

Moderador: Juan Luis Santos

Secuencia de la recombinación y sinapsis en la meiosis de saltamontes

Calvente A, Viera A, Page J, Parra MT, Gómez R, Suja JA, Santos JL, Rufas JS

La relación entre los procesos de sinapsis y recombinación en la meiosis está siendo objeto de amplia discusión en los últimos años en el campo de la meiosis. Hasta el momento se han descrito dos situaciones, por un lado encontramos que en levaduras y ratón la sinapsis es posterior a la producción de dobles roturas en el ADN y es dependiente de este proceso. Por el contrario, en *D. melanogaster* y *C. elegans*, se puede producir sinapsis en ausencia de recombinación. Para intentar dilucidar la secuencia temporal de ambos procesos en saltamontes, organismos modelo en Citogenética, se ha estudiado la localización de las proteínas γ -H2AX, Rad51 y SMC3 en las especies *Locusta migratoria* y *Eyprepocnemis plorans*. La histona γ -H2AX es una variante fosforilada de H2AX que se encuentra en los lugares donde se han producido dobles roturas en el ADN. La recombinasa Rad51 se localiza en los nódulos de recombinación tempranos. La proteína SMC3, perteneciente al complejo de cohesina, nos ha permitido distinguir indirectamente la dinámica del proceso sináptico. Comparando la secuencia temporal, mediante inmunolocalización, de la expresión de éstas proteínas a lo largo de la profase de la primera división meiótica, hemos determinado que en saltamontes, el inicio de la recombinación precede a la formación del complejo sinaptonémico.

La presencia de γ -H2AX en el cromosoma X y en los cromosomas accesorios B₁ y B₂₄ de *E. plorans* desde cigotena hasta paquitena podría estar indicando posibles funciones alternativas de la fosforilación de la histona H2AX en la espermatogénesis de saltamontes. En ratón, se han postulado posibles funciones de la γ -H2AX en el silenciamiento de los cromosomas sexuales desde cigotena tardía hasta diplotena. Los cromosomas X y B de *E. plorans* muestran además una organización similar de su cromatina, por ejemplo, ambos presentan una heteropiconosis diferencial con DAPI y una organización de los ejes cromatídicos distinguible de los autosomas. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que los cromosomas B estudiados derivan del X y/o que la composición de su cromatina y su condensación anticipada podrían determinar la presencia de determinadas proteínas en momentos específicos de la meiosis.

Comportamiento de las cohesinas durante la meiosis de ratón

Gómez R, Parra MT, Viera A, Calvente A, Page J, Rufas JS, Suja JA

Se ha propuesto que en la meiosis de mamíferos, al igual que ocurre en levaduras, los complejos de cohesina localizados en los brazos cromosómicos se degradan durante la transición metafase I/anafase I para permitir la correcta segregación de los cromosomas homólogos. Por otro lado, los complejos de cohesina que persisten en el centrómero sólo serían degradados durante la transición metafase II-anafase II.

Hemos analizado mediante inmunofluorescencia la distribución de las subunidades de cohesina Smc3, Rad21, Rec8 y STAG3 a lo largo de la meiosis en machos de ratón utilizando una técnica de aplastado. Esta metodología, comparada con el esparcido, permite preservar la condensación y posición de los cromosomas en los espermatocitos durante las dos divisiones meióticas. Además, esta técnica permite la identificación inequívoca de las distintas etapas de la meiosis.

Hemos observado que Smc3, Rec8 y STAG3 están presentes únicamente en el dominio intercromatídico de los bivalentes en metafase I, mientras que Rad21 se localiza en el dominio interno de los centrómeros. Las subunidades Smc3, Rec8 y STAG3 desaparecen del dominio intercromatídico durante la transición metafase I/anafase I, permanecen próximas a las regiones centroméricas en anafase I, y finalmente desaparecen en telofase I. Ninguna de estas tres subunidades se ha encontrado en los centrómeros de cromosomas en metafase II. Rad21, al igual que la proteína estructural del elemento lateral del complejo sinaptonémico SCP3, abandona los centrómeros en telofase I coincidiendo con la separación de los cinetocoros hermanos. Las proteínas Rad21 y SCP3 no se detectan en cromosomas en metafase II. Todos estos resultados han sido verificados utilizando dos anticuerpos mono-específicos diferentes frente a las subunidades Rad21, Rec8 y Smc3 del complejo de cohesina.

Nuestros resultados demuestran que Rad21 no es reemplazada por Rec8 durante la meiosis de mamíferos, tal y como se había propuesto previamente, sino que ambas coexisten pero con una localización distinta, Rad21 en los centrómeros, y Rec8 en los brazos de los bivalentes en metafase I. La distribución de Rad21 nos permite sugerir que esta subunidad mantiene la cohesión entre cinetocoros hermanos, la cual es necesaria para que los centrómeros se monoorienten, y por tanto los bivalentes puedan congregarse a la placa ecuatorial durante la metafase I. Además, dado que ninguna de las subunidades que hemos analizado aparece en los centrómeros de cromosomas en metafase II, sugerimos que o bien existen otras cohesinas aún no caracterizadas, o bien otras proteínas centroméricas, serían responsables de mantener la cohesión centromérica hasta la anafase II.

Análisis del proceso sináptico en *Arabidopsis thaliana*

López E, Cuñado N, Romero C, Pradillo M, Sánchez-Morán E, Santos JL

Se ha estudiado el proceso sináptico en *Arabidopsis thaliana* tanto mediante la inmunodetección de la proteína Asy1, localizada en la cromatina asociada con los elementos axiales y los elementos laterales del complejo sinaptonémico (CS), como a través de la visualización de estas estructuras proteicas mediante microscopía electrónica. Los resultados obtenidos son similares con ambas metodologías.

Se han analizado núcleos en los estadios de leptotena, cigotena y paquitena. En cigotena temprana, la formación del CS empieza en regiones cromosómicas subterminales. Posteriormente, en cigotena media, se observan fragmentos de CS en regiones intersticiales. En bivalentes individuales pueden coexistir regiones con CS completamente formado y otras totalmente asinápticas. En un mismo núcleo, la extensión de la sinapsis puede variar entre bivalentes. La longitud de las regiones sinapsadas tiene mayor variabilidad en los núcleos más tempranos. En núcleos en cigotena tardía, los fallos en la sinapsis están asociados con entrelazamientos (interlockings) entre bivalentes o elementos laterales. En los núcleos en paquitena siempre aparecen cinco bivalentes, por lo que estos se utilizaron para determinar las longitudes relativas de los cromosomas de esta especie.

Podemos concluir que, en general, el proceso sináptico en *A. thaliana* es similar al descrito en otras especies de plantas. Sin embargo, la asociación de los telómeros de los cromosomas en una región del núcleo en la transición leptotena-cigotena, bouquet, es menos evidente que en otras especies. También, la elevada frecuencia de multivalentes observada en células en metafase I de poliploides sugiere la existencia de varios puntos autónomos de inicio de sinapsis por cromosoma.

Segregación de cromosomas homólogos en mutantes meióticos de *Arabidopsis thaliana*

Pradillo M, López E, Sánchez-Morán E, Cuñado N, Romero C, Santos JL

La correcta segregación de los cromosomas homólogos a polos opuestos en anafase I depende normalmente de la existencia previa de una conexión física entre ellos. Generalmente, la recombinación recíproca y la cohesividad de cromátidas hermanas son los factores responsables de esta conexión. En ausencia de recombinación meiótica se espera una segregación al azar de los cromosomas homólogos en anafase I. Sin embargo, en diversos organismos como, por ejemplo, *Drosophila melanogaster* y *Schizosaccharomyces pombe*, se han descrito sistemas que son independientes de la recombinación y, sin embargo, promueven una segregación correcta.

Se ha tratado de determinar si en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* existe algún sistema similar. Para ello, se ha estudiado la segregación de los cromosomas homólogos en anafase I en dos mutantes meióticos: asy (asináptico) y dsy (desináptico), que se caracterizan por presentar una elevada frecuencia de univalentes en metafase I. El comportamiento de los cromosomas 2, 4 y 5 se ha analizado detalladamente mediante la utilización de sondas de ADN ribosómico 45S y 5S que permiten su identificación. Se discuten los resultados obtenidos y su relación con el origen diferente de los univalentes en ambos mutantes.

Alteraciones meióticas en mutantes MEI1 de *Arabidopsis thaliana*

Marián A, Martín-Carnes J, Orellana J

Se ha considerado que MEI1 es un gen específico de la meiosis en *Arabidopsis thaliana* ya que no se ha descrito previamente su existencia en otros organismos. Dicho gen se compone de 16 intrones y 17 exones los cuales codifican para una proteína de 972 aminoácidos. La proteína Meil contiene cinco dominios BRCT y está implicada en procesos de reparación de DNA relacionados con la replicación. En el presente trabajo, se ha secuenciado este gen en las siguientes especies afines a *Arabidopsis thaliana*, i.e., *Arabidopsis pumila*, *Arabidopsis griffithiana*, *Arabidopsis shokei* y *Arabidopsis lasiocarpa*. Al analizar dichas secuencias se ha podido determinar que *A. pumila* y *A. griffithiana* presentan entre ellas una elevada similitud con respecto a la secuencia de este gen. Así mismo, las secuencias de MEI1 en *A. shokei* y *A. thaliana* poseen una gran homología. Sin embargo, la secuencia de bases correspondiente al gen MEI1 en *A. lasiocarpa* presenta notables diferencias con respecto a *A. thaliana* así como a las demás especies afines, debido a la pérdida de ciertos intrones y exones, lo que indicaría que o bien estas regiones no son fundamentales para la actividad del gen, o que este gen no es imprescindible para el correcto desarrollo de la meiosis o quizás, esta función es asumida por otro gen alternativo en esta especie. Por otro lado, se han aislado distintos mutantes meil1 obtenidos mediante la inserción de T-DNA en la región codificante de dicho gen. Estas mutaciones provocan una elevada fragmentación cromosómica observable a partir de diplotena, provocando así, una gran alteración de la segunda división meiótica que da lugar al desarrollo de políadas. Como consecuencia de estas alteraciones se produce una gran esterilidad en este tipo de plantas. Además de estos efectos fenotípicos, durante el transcurso de la profase meiótica, se han observado diferencias con respecto al ecotipo normal. La combinación de diferentes tipos de sondas con la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) ha permitido detectar un retraso en el comienzo del apareamiento de los cromosomas homólogos que tiene lugar a lo largo de leptotena y cigotena en estos mutantes con respecto al patrón observado en el ecotipo del que proceden.

Alteraciones en el gen ATM de *Arabidopsis thaliana* y su efecto sobre la meiosis

Montero L, Martin-Carnes J, Orellana J

El gen ATM, así como otros genes relacionados con la reparación del daño genético, está implicado en procesos meióticos. En el presente estudio se ha analizado el comportamiento cromosómico en diferentes fases de la meiosis de plantas mutantes del gen ATM de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos por inserción de T-DNA en la secuencia de dicho gen. El análisis se ha llevado a cabo empleando la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), utilizando sondas localizadas en distintas regiones cromosómicas. Al comparar el comportamiento meiótico de estos individuos frente a los ecotipos silvestres de los que procedían las plantas mutantes, se ha observado que la meiosis transcurre normalmente durante los primeros estadios de la profase meiótica, sin que se hayan apreciado diferencias significativas. En los mutantes, al igual que en las plantas control, se pudo constatar que las regiones centroméricas sufrían un marcado agrupamiento durante zigotena temprana, además de mantenerse el patrón de apareamiento existente tanto en estas regiones como en zonas intersticiales y teloméricas. Sin embargo, durante la metafase de la primera división meiótica comienzan a apreciarse diferencias entre los mutantes y las plantas normales, ya que se ha podido constatar que en esta fase existe un cambio en la distribución de los quiasmas, aumentando el número de quiasmas proximales respecto al ecotipo silvestre. Las alteraciones son mucho más acusadas en el periodo de transición entre la metafase y la anafase de la primera división meiótica, donde se produce una severa fragmentación cromosómica y la aparición de puentes entre cromosomas homólogos, probablemente debidos a fallos en la formación de quiasmas. Posiblemente, todas estas alteraciones sean las responsables de la formación de políadas, así como de tétradas con fragmentos acéntricos dispersos, durante la segunda división meiótica. Estas modificaciones del patrón normal de desarrollo de la meiosis explicarían la elevada esterilidad observada en las plantas mutantes.

¿Hasta dónde tienen movimiento propio los neocentrómeros de centeno?

García-Chico R, Sotillo E, González-Sánchez M, Manzanero S, Fernández-Núñez E, González-García M, Puertas MJ

Se han estudiado varios aspectos de los neocentrómeros terminales de centeno en meiosis. En primer lugar se cruzaron plantas con y sin ellos para determinar el posible control genético sobre su formación. La segregación obtenida podría explicarse si existieran dos genes cuyos productos actuaran en trans y determinaran la actividad neocéntrica, de tal modo que los individuos sin neocentrómeros llevarían todos los alelos no-activadores, mientras que un alelo activador permitiría la activación de algunos neocentrómeros. Los individuos con cuatro alelos activadores mostrarían la máxima frecuencia de neocentrómeros por célula.

Se ha utilizado inmunolocalización con anti-tubulina para observar si existe interacción entre los neocentrómeros y los microtúbulos del huso. En la mayoría de los casos se observó interacción por el extremo de los microtúbulos y unos pocos neocentrómeros se observaron sin microtúbulos.

Se irradiaron espigas en meiosis para producir fragmentos acéntricos portadores de heterocromatina subtelomérica y determinar si éstos podían comportarse como neocentrómeros. En ningún caso se observó que los fragmentos acéntricos pudieran formar extensiones hacia los polos. Sin embargo, trozos de cromosomas unidos al resto por un fino hilo de cromatina sí que tenían actividad neocentromérica. Nuestras observaciones indican que las secuencias subteloméricas necesitan un centrómero en cis para activarse como neocentrómeros.

También se ha observado, en varias fases de la meiosis, la posición del telómero en relación a las secuencias subteloméricas presentes en los neocentrómeros.

Translocaciones, telotranslocaciones, micromanipulaciones y otras consideraciones

Catarino S, Roca A, Vieira R, Fominaya A, Giraldez R

Desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio se viene desarrollando una colección de translocaciones en centeno, inducidas mediante irradiación de polen con rayos x. La utilización de la línea marcadora 1RSL, que contiene grandes bloques de heterocromatina en los telómeros del cromosoma 1R, y no tiene heterocromatina en los restantes cromosomas, permite seleccionar todas las translocaciones que afectan al cromosoma 1R.

La posterior caracterización de cada una de las nuevas translocaciones se hace mediante el análisis mitótico y meiótico de las propias plantas portadoras de translocaciones y de descendientes de cruzamientos con otras plantas portadoras de marcadores cromosómicos conocidos. Para cada translocación, se establece la posición precisa del punto de rotura mediante análisis de complejos sinaptonémicos.

Algunas de las translocaciones obtenidas se han perdido, debido a que las plantas portadoras de la translocación no dieron descendencia. Hasta ahora la colección consta de 30 líneas portadoras de translocaciones caracterizadas; 14 de ellas obtenidas por irradiación de la línea 1RSL y 16 con otro origen (Translocation Tester Set, Translocaciones espontáneas aparecidas en los cultivares Ailés y Snoopy). Esto supone un total de 60 puntos de rotura, 18 en el cromosoma 1R y de 4 a 9 en los restantes cromosomas.

Recientemente hemos construido una nueva línea marcadora (1RSLt), en la que el par de cromosomas 1R está sustituido por los correspondientes cromosomas telocéntricos, (1RS y 1RL). Al igual que la línea 1RSL, la línea 1RSLt contiene grandes bloques de heterocromatina en los telómeros del cromosoma 1R, y no tiene heterocromatina en los restantes cromosomas. Mediante la irradiación de esta línea se han aislado translocaciones que afectan a uno de los cromosomas telocéntricos: telotranslocaciones.

Los cromosomas implicados en las translocaciones o telotranslocaciones disponibles pueden identificarse en mitosis y/o meiosis, por lo que es posible llevar a cabo su aislamiento mediante micromanipulación. Nuestro objetivo es la construcción de un mapa físico de marcadores moleculares en centeno. Los primeros resultados son alentadores, habiendo sido posible ubicar distintos microsatélites en determinadas regiones cromosómicas.

Obtención de deleciones cromosómicas en *Hordeum chilense*

Cabrera A

Se ha utilizado la acción gametocida del cromosoma 2C de *Aegilops cylindrica* en la inducción de roturas cromosómicas en *Hordeum chilense* ($2n = 2x = 14$, HchHch) con el fin de obtener deleciones cromosómicas en esta especie y su utilización en la localización física de genes. Los organismos diploides no toleran bien las deleciones por lo que la estrategia seguida permite su obtención en el fondo genético de trigo harinero, Chinese Spring ($2n = 6x = 42$, AABBDD) o de tritórdeo ($2n = 6x = 42$, AABBHchHch). Para ello se ha cruzado la línea de adición disómica para el cromosoma 2C de *Ae. cylindrica* en CS con tritórdeo y la F₁ se ha retrocruzado por trigo harinero y por tritórdeo. La descendencia obtenida se ha autofecundado durante cuatro generaciones o bien se ha retrocruzado con trigo o tritórdeo. Se han identificado y seleccionado plantas fértiles portadoras de deleciones terminales para los cromosomas 1Hch, 3Hch, 4Hch y 6Hch. La evaluación citológica de estas plantas se ha realizado mediante FISH utilizando la secuencia repetida pAs1 que produce un patrón bandas característico de cada par cromosómico en *H. chilense*. El tamaño de las deleciones (en tanto por ciento) se ha determinado como la longitud media del cromosoma que ha sufrido la deleción respecto a la longitud media del cromosoma normal.

Cuarta sesión

Moderador: José L. Bella

Nuevas aportaciones al conocimiento citogenético
de los Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae)

Petitpierre E

Los Alticinae, «flea-beetles» en inglés por su capacidad saltatoria, constituyen la subfamilia más numerosa de los Chrysomelidae con unas 7/,500 especies descritas. Los datos citogenéticos están limitados a unas 250 especies, casi todas neotropicales u holárticas, con un rango amplio de números cromosómicos desde $2n = 6$ a $2n = 64$, y una notable diversidad de sistemas cromosómicos de determinación sexual. Presentamos aquí los resultados de fórmulas meióticas en ocho especies, siete ibero-baleares y una de Uruguay. (*Oedionychus cinctus*) y (*O. limbatus*) tienen $16 + X + Y$ ($2n = 34$), con bivalentes autosómicos pequeños y cromosomas sexuales muy grandes apareados a distancia. (*Macroaltica transversa*) muestra $11 + X + Y$ ($2n = 24$), en concordancia con la fórmula meiótica modal de las *Altica*, género vecino al precedente. *Hermaphysa ruficollis* posee $7 + Xy$ ($2n = 16$), fórmula similar a la de otra especie congénérica, *H. cicatrix* con $7 + X1X2Y$, analizada con anterioridad. *Longitarsus aeruginosus* y *L. australis* tienen $11 + Xy$ ($2n = 24$) y $13 + Xy$ ($2n = 28$), respectivamente, y destaca el primero por ser el valor más bajo hallado hasta ahora en el género. *Psylliodes chalcomerus* con $14 + Xyp$ ($2n = 30$) y *P. obsкуроaeneus* con $15 + Xyp$ ($2n = 32$), fórmulas que se encuentran dentro del rango de variación hallado en otras especies del género, y con la mayoría de las cuáles comparten también el bivalente sexual en «paracaídas» (Xyp). Por último, se discute el posible parentesco citogenético de todas estas especies con respecto a las estudiadas previamente.

Aplicación de la W-CGH (hibridación genómica comparativa completa) en estudios interespecíficos

Pita M, Enciso M, de la Torre J, Fernández JL, Gosálvez, J

La W-CGH (Hibridación Genómica Comparativa Total) se presenta como una técnica eficaz para localizar diferencias a nivel cromosómico existentes entre los genomas de especies relacionadas filogenéticamente. Para llevar a cabo esta particular variante de la Hibridación in situ Fluorescente (FISH) se establece una competición entre dos sondas de DNA total, procedentes de los dos genomas comparados, marcadas de modo que permitirán ser reveladas con fluorocromos que emitan en distintas longitudes de onda. El resultado de esta «competición» entre las sondas se traduce en una hibridación diferencial de éstas, de manera que los resultados observados nos informan de la presencia y distribución de las secuencias en los dos genomas en estudio. Hasta ahora la W-CGH ha sido aplicada exclusivamente en la búsqueda y localización de diferencias cromosómicas en humanos (duplicaciones, deleciones, polimorfismos). En esta comunicación presentamos los resultados de la aplicación de esta técnica para la localización de las diferencias existentes cuando los individuos que se comparan pertenecen a dos especies distintas. Los resultados obtenidos se analizan tanto desde un punto de vista cualitativo: observando qué tipos de secuencias se han visto modificadas a lo largo de la evolución, como cuantitativo; midiendo en qué grado se diferencian los genomas de las especies cuando se estudian incluyendo todo el material genético presente en los genomas.

Avances en el estudio de la zona híbrida de *C. parallelus*

Zabal-Aguirre M, Arroyo F, Volk T, Butlin R, Bella JL

Una «zona híbrida» es la región donde dos taxa se encuentran, aparean y tienen descendencia híbrida. Estos «laboratorios naturales» permiten el estudio de los agentes evolutivos, de las barreras al flujo genético y de la divergencia genética que esto genera.

Dos subespecies del saltamontes *Chorthippus parallelus*: *C.p. parallelus* y *C.p. erythropus*, generadas en alopatría, forman una zona híbrida de contacto secundario en los Pirineos. La zona híbrida queda constituida por los valles transversales (como el «Valle de Tena») que permiten el contacto entre la subespecie continental y el endemismo ibérico.

Actualmente, los estudios se centran en dos objetivos prioritarios: la detección de genes posiblemente involucrados en la divergencia de estas subespecies y la valoración de la infección de *Wolbachia*, bacteria endoparásita obligada, en la estructuración de la zona híbrida. Estos nuevos datos se contrastan y discuten con los obtenidos en estudios previos.

Evolución de un cromosoma B introducido en una población natural del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*

Manrique-Poyato, MI, Cabrero J, Gómez R, Camacho JPM

La cabecera del río Segura es la única zona de la Península Ibérica donde no se han encontrado cromosomas B en el saltamontes *Eyprepocnemis plorans*. Una de esas poblaciones, situada en El Gallego (Albacete), carecía de cromosomas B en los 82 individuos analizados en 1993. Mediante captura-marcaje-recaptura, realizada en los días 30 de septiembre, 1 y 2 de octubre de 1994, estimamos el tamaño poblacional. Posteriormente, liberamos 50 machos vivos procedentes de la población de Salobreña (Granada), donde el B predominante es B₂ con una frecuencia que se mantiene bastante estable. Con estos datos calculamos una estima de la frecuencia de Bs en la población mezclada de 1994. En los años 1996, 1999, 2000 y 2002, tomamos muestras de la población de El Gallego para realizar un seguimiento de la frecuencia del B₂ introducido, así como de su morfología deducida del patrón de bandeo C y FISH. Los resultados han mostrado que la frecuencia del cromosoma B se incrementó justo después de la introducción, volviendo más tarde a niveles similares a los iniciales. Como control positivo adicional de la introgresión, hemos analizado mediante FISH la presencia de ADNsat en los autosomas S₉, S₁₀ y S₁₁, encontrando ADNsat en el autosoma S₉ de dos machos capturados en 1996. Este ADNsat está presente de forma regular en el autosoma S₉ de Salobreña pero no en poblaciones cercanas a El Gallego ni en varios machos capturados en esta población en 1993. Esto sugiere que los 50 machos introducidos se cruzaron eficazmente y transmitieron sus cromosomas A y B. El análisis de la transmisión del B por una hembra capturada en septiembre de 2000 mostró una tendencia significativa a la eliminación de este cromosoma, que podría explicar la dificultad que está encontrando para incrementar en frecuencia. Finalmente, el cromosoma B que se encuentra en la población, al cabo de unos años, difiere, en tamaño y proporción de ADNr y ADNsat, del B₂ introducido originalmente. Estos resultados son discutidos a la luz del modelo dinámico de evolución de los cromosomas B en esta especie.

Evolución de los cromosomas sexuales en el género *Rumex* (Polygonaceae)

Navajas-Pérez R, De la Herrán R, Ruiz-Rejón C,
Ruiz-Rejón M, Garrido-Ramos MA

En el género *Rumex*, junto a especies hermafroditas, también existen otras especies ginodioicas, polígamas y dioicas. Las especies dioicas pueden incluirse en dos grupos independientemente de su asignación taxonómica. Por un lado, existen especies con sistema cromosómico sencillo XX/XY y con un mecanismo de control genético del sexo basado en la presencia de un cromosoma Y activo, mientras que por otro, existen especies con determinismo complejo XX/XY₁Y₂ y mecanismo de control genético basado en la relación X/A. En la actualidad, existen muchos interrogantes con respecto al origen y la evolución de la dioecia y los cromosomas sexuales en este grupo de plantas.

Datos moleculares obtenidos por nosotros indican que todas las especies dioicas están muy emparentadas entre sí, y que el mecanismo X/A habría derivado de uno basado en la presencia de un Y activo. Además, hemos encontrado que existe una correlación entre la evolución del determinismo sexual y la evolución cariotípica dentro del género, habiéndose producido una reducción del número cromosómico desde un número básico $x = 10$ de hermafroditas, hasta $x = 7$ de dioicas, con estadios intermedios de poligamia y ginodioecia.

Por otro lado, mediante el estudio de varias familias de ADN satélite demostramos que mientras los Ys de sistemas simples parecen estar en estadios incipientes de evolución, los de sistemas XX/XY₁Y₂ han empezado a degenerar por la acumulación de este tipo de secuencias. Asimismo, inferimos de nuestros resultados que algunas secuencias repetitivas presentes en sexuales y en autosomas tienen un origen común. A pesar de ello, un estudio del patrón evolutivo de estas secuencias, nos indica que las tasas evolutivas son menores para los satélites presentes en los Y con respecto a los presentes en autosomas.

Los efectos parasíticos de los cromosomas B del centeno podrían ser beneficiosos a largo plazo

González-Sánchez M, Chiavarino M, Jiménez G, Manzanero S,
Rosato M, Puertas MJ

Los Bs de centeno tienen un fuerte efecto parasítico en la fertilidad, aunque no tienen efecto significativo sobre el vigor. La transmisión de los Bs está determinada genéticamente, de modo que las plantas de la línea H los transmiten en la mayoría de los casos, mientras que los Bs en la línea L suelen formar univalentes y se pierden con frecuencia durante la meiosis.

En este trabajo analizamos variables que afectan al vigor y la fertilidad considerando, no sólo el número de Bs de la planta portadora, sino también su pertenencia a la línea H o L y el número de Bs del parental materno. Nuestros resultados demuestran que los Bs no sólo disminuyen la fertilidad femenina de las plantas con Bs, sino también la de su descendencia, a excepción de las plantas de 0B procedentes de una madre de 4B, que son las más fértiles. De este modo, Los Bs se pueden considerar como un factor selectivo.

Los granos de polen abortan en mayor proporción en las plantas con Bs, en su descendencia y en las plantas H. Pero las plantas de 4B producidas en madres con Bs producen menos polen abortado, indicando que un número elevado de Bs es más deletéreo si se transmite por el polen. Se obtuvo un resultado similar para el carácter de calidad de endospermo, estimado como peso de los granos, ya que está afectado negativamente por los Bs en plantas de 4B procedentes de madres 0B.

Las plantas H siempre son menos fértiles que las L, lo que sugiere que los alelos que aumentan la pérdida de Bs de la línea L pueden seleccionarse como defensa del genoma contra los B invasores de la línea H.

Quinta sesión

Moderador: Eduard Petitpierre

Estudio de la expresión de los lugares frágiles en *Mandrillus sphinx* (F. Cercopithecidae, Primates)

Ruiz-Herrera A, García F, Ponsà M, Garcia M

El estudio de los cromosomas de especies filogenéticamente emparentadas, como es el caso de los primates del viejo mundo (Catarrhini), permite la comparación de los cariotipos, así como establecer homologías entre los cromosomas. Gracias a esto se pueden identificar los cambios cromosómicos que se han producido a lo largo de la evolución cromosómica de un determinado grupo taxonómico. Las reorganizaciones y los puntos de rotura evolutivos no se distribuyen al azar, sino que tienden a concentrarse en determinados puntos del genoma. Estas regiones susceptibles se han relacionado con los lugares frágiles, así como regiones afectadas por las radiaciones ionizantes.

En el presente estudio se analizó la expresión de lugares frágiles en cromosomas de linfocitos de sangre periférica de tres hembras y un macho de la especie *Mandrillus sphinx* (F. Cercopithecidae, Catarrhini) provenientes del Parque Zoológico de Barcelona. La inducción de los lugares frágiles se realizó mediante la adición de afidicolina (inhibidor específico de la DNA polimerasa) al medio de cultivo a dos concentraciones diferentes: 0,1 y 0,2 M. Se analizaron un total de 1179 metafases y se analizaron las alteraciones cromosómicas inducidas mediante el bandeo secuencial: tinción uniforme/bandas-G. La aplicación del modelo estadístico multinomial FSM permitió determinar la presencia de 50 lugares frágiles en el cariotipo de *Mandrillus sphinx*.

El estudio comparativo entre la localización de los lugares frágiles en *M. sphinx*, otra especie perteneciente a la Familia Cercopithecidae, *Macaca fascicularis*, y humano indica que un alto porcentaje de ellos se ha conservado durante de la evolución cromosómica de los Primates.

Cromosomas sexuales gigantes en *Microtus*: evolución de los bloques heterocromáticos

Marchal JA, Acosta MJ, Neitzel H, Sperling K, Bullejos M,
Díaz de la Guardia R, Sánchez A

Las especies del género *Microtus* presentan una serie de características que hacen de este grupo un buen modelo para estudiar la composición, estructura y evolución de los cromosomas sexuales. En concreto, varias especies de este género, entre ellas *M. cabreræ* y *M. agrestis*, poseen cromosomas sexuales gigantes debido a la presencia de grandes bloques heterocromáticos.

Nosotros hemos estudiado la composición de los cromosomas sexuales de siete especies de micrótidos mediante dos aproximaciones: “chromosome painting” del cromosoma X y FISH de un ADN repetitivo específico del cromosoma Y. Nuestros resultados indican que la región eucromática del cromosoma X está altamente conservada en las diferentes especies analizadas. Sin embargo, los bloques heterocromáticos de los cromosomas sexuales tienen una composición muy diversa. Esta composición es diferente entre especies, como se demuestra para *M. cabreræ* y *M. agrestis*, e incluso entre la heterocromatina del cromosoma X e Y de una misma especie, como ocurre en *M. cabreræ*. Estos resultados indican que posiblemente los cromosomas sexuales de estas especies tienen la capacidad común de amplificar secuencias, originándose así los bloques heterocromáticos; sin embargo, las secuencias amplificadas y posiblemente los mecanismos de amplificación han sido diferentes en cada especie. Esto implica que el origen y la evolución de los bloques heterocromáticos ha sido un proceso independiente en cada especie de *Microtus*.

Nuestros resultados indican también que durante la evolución cariotípica de las especies de micrótidos han ocurrido reordenaciones cromosómicas entre los cromosomas sexuales y los autosomas.

Evaluación de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos: estrés oxidativo

Enciso Lorences M, Gosálvez Berenguer J, Fernández Álvarez JL

Una fracción de los espermatozoides contenidos en un eyaculado humano presenta el ADN nuclear fragmentado, incluso en una muestra de esperma considerada normal. De hecho, la fragmentación del ADN se empieza a considerar de gran importancia en relación con la calidad seminal y la fertilidad. Los pacientes que sufren determinados procesos oncológicos y/o infecciosos de diferente etiología en las vías genitales suelen presentar parámetros seminales clásicos anormales. Algunos estudios han determinado un aumento de la celularidad no espermática y/o leucocitospermia que, en algunos de estos pacientes, se relaciona con niveles anormales de especies reactivas de oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species). Las ROS son altamente reactivas y pueden provocar daño directo en el ADN, así como en proteínas, membranas y orgánulos celulares. La oxidación afecta al genoma espermático y puede provocar roturas de cadena doble o simple en la hebra de ADN. En esta comunicación se presentan la metodología que permite evaluar los niveles de fragmentación que presenta el ADN en espermatozoides humanos y los estudios preliminares donde se demuestra sensibilidad del ADN espermático a procesos de oxidación. Paralelamente, se plantea un modelo mediante el cual se podría determinar el estrés oxidativo que ha sufrido una muestra de esperma cuando aparecen, por ejemplo, leucocitos infiltrados en el semen (leucocitospermia) en la estimulación de la producción de ROS.

III Seminario de Citogenética (2004) Participantes

Mohamed Abdelaziz Mohamed

Departamento de Genética
Universidad de Granada
mabdelaziz2000@yahoo.es

Adoración Cabrera Caballero

Departamento de Genética
Universidad de Córdoba
ge1cabca@uco.es

Manuel Jesús Acosta López

Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
mjacosta@ujaen.es

Josefa Cabrero

Departamento de Genética
Universidad de Granada
jcabrero@ugr.es

María Susana Almeida Catarino

Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
catarino@correo.uniovi.es

Adela Calvente Arroyo

Departamento de Biología
Universidad Autónoma de Madrid
adela.calvente@uam.es

Inmaculada Álvarez Rodríguez

Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
In.alvarez@terra.es

Juan Pedro M. Camacho

Departamento de Genética
Universidad de Granada
jpmcamac@ugr.es

Francisca Arroyo Yebras

Departamento de Biología, Genética
Universidad Autónoma de Madrid
paqui.arroyo@uam.es

Eduardo Corredor Molguero

Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
runaway@bio.ucm.es

Jose L. Bella Sombría

Dpto. Biología (Genética)
Universidad Autónoma de Madrid
bella@uam.es

Ismael Cross Pacheco

Laboratorio de Genética
Universidad de Cádiz
ismael.cross@uca.es

Mónica Bullejos Martín

Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
bullejos@ujaen.es

Angeles Cuadrado Bermejo

Dpto. Biología Celular y Genética
Universidad de Alcalá
angeles.cuadrado@uah.es

Nieves Cuñado Rodríguez

Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 nicuna@bio.ucm.es

Manuel Díez Sancho

Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 madisa@bio.ucm.es

María Enciso Lorences

Facultad de Biología
 Universidad Autónoma de Madrid
 maria.enciso@uam.es

Elisa Fernández Núñez

Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 elyfdez@hotmail.com

Ruth Freire Álvarez

Dpto. Biología Celular y Molecular
 Universidad de A Coruña
 insuax@udc.es

Araceli Fominaya Yagüe

Dpto. Biología Celular y Genética
 Universidad de Alcalá
 araceli.fominaya@uah.es

Carlos García de la Vega

Departamento de Biología
 Universidad Autónoma de Madrid
 carlos.delavega@uam.es

Ramón Giráldez

Dpto. Biología Funcional
 Universidad de Oviedo
 giraldez@uniovi.es

Rocío Gómez Lencero

Departamento de Biología
 Universidad Autónoma de Madrid
 rocio.gomez@uam.es

Miriam González García

Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 myr_glez@universia.es

Mónica González Sánchez

Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 mgs@bio.ucm.es

Jaime Gosálvez

Departamento de Biología (Genética)
 Universidad Autónoma de Madrid
 jaime.gosalvez@uam.es

Ana María Insua Pombo

Dpto. Biología Celular y Molecular
 Universidad de A Coruña
 insuax@udc.es

Neil Jones

Institute of Biological Sciences,
 University of Wales Aberystwyth
 rnj@aber.ac.uk

Carmen López Fernández

Departamento de Biología (Genética)
 Universidad Autónoma de Madrid
 mariadelcarmen.lopez@uam.es

María Dolores López León

Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 mdlopez@ugr.es

Eva López Monzoncillo
 Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 evalmonzoncillo@hotmail.com

Pedro Lorite Martínez
 Dpto. Biología experimental (Genética)
 Universidad de Jaén
 plorite@ujaen.es

M. Inmaculada Manrique Poyato
 Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 mpoyato@ugr.es

Juan Alberto Marchal Ortega
 Departamento de Biología Experimental
 Universidad de Jaén
 jamaor@ujaen.es

M^a Araceli Marián Santos
 Departamento de Biotecnología
 Universidad Politécnica de Madrid
 agroceli@yahoo.es

Ángel Martín Alganza
 Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 ama@ugr.es

Josefina Méndez Felpeto
 Dpto. Biología Celular y Molecular
 Universidad de A Coruña
 fina@udc.es

Laure Montero Méndez
 Departamento de Biotecnología
 Universidad Politécnica de Madrid
 laura_monterom@yahoo.es

Eugenia E. Montiel Jiménez
 Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 eugenia_montiel@hotmail.com

Martín Muñoz López
 Dpto. Biología experimental (Genética)
 Universidad de Jaén
 tpalome@ujaen.es

Tomás Naranjo Pompa
 Departamento de Genética
 Universidad Complutense de Madrid
 toranjo@bio.ucm.es

Rafael Navajas Pérez
 Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 rnavajas@ugr.es

Antonio Jesús Muñoz Pajares
 Departamento de Genética
 Universidad de Granada
 jesusmp@fedro.ugr.es

Juan Orellana Saavedra
 Departamento de Biotecnología
 Universidad Politécnica de Madrid
 jorellana@bit.etsia.upm.es

Teresa Palomeque Messía
 Dpto. Biología experimental (Genética)
 Universidad de Jaén
 tpalome@ujaen.es

Concepción Pérez García
 Área de Xenética
 Universidad de Vigo
 cpegar@uvigo.es

Francisco Perfectti

Departamento de Genética
Universidad de Granada
fperfect@ugr.es

Eduard Petitpierre Vall

Laboratorio de Genética
Universidad de las Islas Baleares
dbaepv@uib.es

Miguel Pita Domínguez

Departamento de Biología (Genética)
Universidad Autónoma de Madrid
miguel.pita@uam.es

María Jesús Puertas Gallego

Departamento de Genética
Universidad Complutense de Madrid
majetas@bio.ucm.es

Mónica Pradillo Orellana

Departamento de Genética
Universidad Complutense de Madrid
monipradillo@hotmail.com

Laureana Rebordinos González

Laboratorio de Genética
Universidad de Cádiz
laureana.rebordinos@uca.es

Concepción Romero Martínez

Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
romeroc@bio.ucm.es

Antonio Sánchez Baca

Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
abaca@ujaen.es

Juan Luis Santos Coloma

Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
jlsc53@bio.ucm.es

María Teruel Artacho

Departamento de Genética
Universidad de Granada
mta28@fedro.ugr.es

Joaquina de la Torre

Departamento de Biología, Genética
Universidad Autónoma de Madrid
joaquina@uam.es

Mario Zabal Aguirre

Departamento de Biología (Genética)
Universidad Autónoma de Madrid
mario.zabal@uam.es