

V SEMINARIO DE CITOGENÉTICA

Libro de Resúmenes



**Hotel Playa Victoria, Cádiz
17-20 de Abril de 2008**

V SEMINARIO DE CITOGENÉTICA

**Hotel Playa Victoria, Cádiz
17-20 de Abril de 2008**

Comité Organizador

Laureana Rebordinos González

Ismael Cross Pacheco

Irma Sánchez Ramos

Manuel Alejandro Merlo Torres

Hicham Chairi

Mercedes Rubio Martínez

Tiziana Pacchiarini

Isabel Hernández Paz

Con la Colaboración de

Sociedad Española de Genética

Universidad de Cádiz

**P
R
O
G
R
A
M
A**

Jueves 17 de Abril

Hotel Playa Victoria de Cádiz

- 17:00–18:45** Recogida de documentación
- 18:45–19:00** Salida en autobús hacia la Excma. Diputación Provincial de Cádiz

Excma. Diputación Provincial de Cádiz

- 19:00–19:30** Inauguración Oficial del V Seminario de Citogenética
- 19:30–20:30** Conferencia invitada: “El ADN satélite como marcador citogenético evolutivo”.
Manuel Ruiz Rejón
- 20:30** Recepción de bienvenida

Viernes 18 de Abril

Hotel Playa Victoria de Cádiz

PRIMERA SESIÓN

Moderador: **Juan Pedro Martínez Camacho**

- 09:30–10:00** “Presencia de elementos transponibles en saltamontes”.
Montiel M.E., Ruiz-Estévez M., Cabrero J., Camacho J.P.M. y López-León M.D.
- 10:00–10:30** “Análisis citológico y molecular de los cromosomas X y B microdisecionados en dos especies de saltamontes”.
Teruel M., Cabrero J., Acosta M.J., Sánchez A.
- 10:30–11:00** “Microdisección del cromosoma X de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera)”.
Sarasa J., Fernández-Calvín B., Fominaya A., Enciso M., Loarce Y., Ferrer E. y Bella J.L.
- 11:00–11:30** “El transposón *Galileo* como promotor de la generación de inversiones cromosómicas en *Drosophila*”.
Delprat A., Negre B., Puig M. y Ruiz A.
- 11:30–12:00** Café
- 12:00–12:30** “Evolución cromosómica del cluster *Drosophila martensis*: Contrastación de la filogenia de inversiones y de la coincidencia entre puntos de rotura”.
Carlos F. Prada, Alejandra Delprat y Alfredo Ruiz
- 12:30–13:00** “Caracterización molecular de la heterocromatina en *Sciara coprophila*”.
Escribá M.C., Villasante A. y Goday C.
- 13:00–13:30** “Caracterización y localización cromosómica de dos familias de ADN satélite en el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*)”.
García-García M.C., Palomeque T. y Lorite P.
- 14:00–16:00** Almuerzo

SEGUNDA SESIÓN

Moderador: **Alfredo Ruiz Panadero**

- 16:00–16:30** “Efecto de pesticidas en la activación neocentromérica del cromosoma *5RL* de centeno en trigo”.
Cuacos M., González-García M., González-Sánchez M., Puertas M.J. y Vega J.M.
- 16:30–17:00** “Aplicación de herramientas citogenéticas en el estudio de la meiosis de cereales”.
Prieto P., Colas I., Shaw P. y Moore G.
- 17:00–17:30** “Identificación mediante FISH del DNA de centeno en trigo utilizando una única sonda repetida”.
González-García M., Puertas M.J. y Vega J.M.
- 17:30–18:00** Café
- 18:00–19:00** Conferencia invitada: “B chromosomes- What makes them different?”
Andreas Houben
- 21:00** Cena

Sábado 19 de Abril

Hotel Playa Victoria de Cádiz

TERCERA SESIÓN

Moderador: **Nicolás Juvé**

- 09:00–09:30** “Mapeo físico del cromosoma 4Hch de *Hordeum chilense* mediante líneas aneuploides y de delección de tritórdeo”.
Said M. y Cabrera A.
- 09:30–10:00** “Optimización de un protocolo utilizando oligonucleótidos modificados como sondas para la localización cromosómica de SSRs (Secuencias Simples Repetidas)”.
Cuadrado A. y Juvé N.
- 10:00–10:30** “Localización cromosómica de genes de copia única mediante FISH en trigo. Utilización de un protocolo basado en el sistema TSA (Tyramide Signal Amplification)”.
Pérez R., de Bustos A., Juvé N. y Cuadrado A.
- 10:30–11:00** “Alteraciones cromosómicas inducidas por la transformación con T-DNA en *Arabidopsis*. Implicaciones en el análisis de mutantes”.
Pradillo M., López E., Linacero R., Romero C., Oliver C., Cuñado N. y Santos J.L.
- 11:00–11:30** Café
- 11:30–12:00** “DNA mitocondrial en núcleos de hepatocitos de rata observado con FISH”.
González-Sánchez M., Puertas M.J. y González-García M.
- 12:00–12:30** “Estudio de secuencias repetidas (ADN satélites y retrotransposones) en el genoma de la especie *Microtus thomasi*”.
Marchal J.A., Acosta M.J., Fernández-Espartero C.H., Romero I., Rovatsos M.T., Mitsainas G.P., Bullejos M., Giagia-Athanasopoulou E.B. y Sánchez A.
- 12:30–13:00** “Identificación de una translocación recíproca en animales de un centro de inseminación porcina, y consecuencias sobre la reproducción”.
Rodríguez A., Sanz E., De Mercado E., Doménech V., Martín M., Carrascosa C., Gómez E., San Román C., Claver M. y Sánchez R.
- 13:30–15:00** Almuerzo

Visitas y Actividades

- 15:30** Salida en autobús hacia las instalaciones del Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola “El Toruño” (Junta de Andalucía). Puerto de Santa María.
- 17:30** Visita al Centro del INIA: Rancho de la Merced (banco de germoplasma de la vid).
- 19:00** Visita a las Bodegas González-Byass (Jerez de la Frontera).
- 21:30** Cena en el Hotel.

Domingo 20 de Abril

Hotel Playa Victoria de Cádiz

CUARTA SESIÓN

Moderadora: **María Jesús Puertas**

- 09:30–10:00** “Caracterización cariotípica de *Xenostrobus securis*: un mejillón invasor”.
Pérez-García C., Morán P. y Pasantes J.J.
- 10:00–10:30** “Caracterización de los ADNs satélites centroméricos en peces planos (Orden Pleuronectiformes) y su uso en el estudio de sus genomas”.
De la Herrán R.
- 10:30–11:00** “Utilización de familias multigénicas para la diferenciación de especies de interés en Acuicultura”.
Merlo M.A., Pacchiarini T., Sánchez-Ramos I., Chairi H., Cross I. y Rebordinos L.
- 11:00–11:30** “Desarrollo de una técnica basada en la amplificación de señal, TSA-FISH, para la localización de genes de copia única en organismos marinos”.
Sánchez-Ramos I., Cross I., Rubio M., Guzmán J.M., Merlo M.A., Ortiz-Delgado J.B., Mañanos E., Sarasquete C. y Rebordinos L.
- 11:30–12:00** Café
- 12:00** Reunión de la Sección de Citogenética
Moderadores:
María Jesús Puertas Gallego
Nicolás Jouvé de la Barreda
- 13:30** Comida y despedida

R E S Ú M E N E S

EL ADN SATÉLITE COMO MARCADOR CITOGENÉTICO Y EVOLUTIVO

M. Ruiz Rejón

Departamento de Genética. Universidad de Granada
mrejon@ugr.es

Pese a estar omnipresente en los genomas de los organismos eucariotas y en muchos casos constituir una fracción importante de los mismos, el ADN satélite y las diferentes familias que lo forman constituyen algunas de las últimas fronteras inexploradas de los genomas, a veces incluso despreciadas o minusvaloradas. Lo primero puede ser debido a las dificultades que existen para secuenciar y caracterizar en su totalidad tales regiones de los cromosomas. Y lo segundo, al hecho de que hasta recientemente se consideraba que estas secuencias no son funcionales, sobre todo la idea que se tenía es que a partir del ADN satélite no se sintetiza ARN. Pero en los últimos años, los avances técnicos han permitido profundizar en la caracterización de dicha fracción de los genomas. Por otro lado, se ha comenzado a descubrir el papel que cumplen algunos ADN satélites en la síntesis de ARNs esenciales o en la construcción y el funcionamiento de partes tan importantes de los cromosomas como son los centrómeros.

En el ADN satélite centromérico es donde más se está avanzando en el análisis de su posible función/es. Hasta ahora se ha hablado de dos tipos de posibles funciones para el ADN satélite: de un cierto papel en la dinámica de los cromosomas (en el apareamiento, recombinación, reordenación de los cromosomas) y de una cierta capacidad “informacional” que puede portar su secuencia (bien por ser portadores de motivos o adquirir estructuras terciarias capaces de unirse a ciertas proteínas que forman parte del complejo centrómero-cinetocoro o del telómero y de la heterocromatina en general). Pero, y ésta es la novedad más reciente, se está encontrando en muchos casos que a partir de ADN satélite centromérico de hongos, plantas y animales se sintetiza ARN que en algunos casos interviene en procesos de interferencia que contribuyen a formar la estructura del centrómero-cinetocoro.

Por lo que se refiere a su utilidad como marcador evolutivo, aunque a veces los ADNs satélites centroméricos varían mucho entre grupos de organismos emparentados -por ejemplo, entre las especies de un mismo género- y no se pueden utilizar como buenos marcadores evolutivos, en otros casos están conservados y pueden constituir una buena herramienta para contribuir a resolver problemas taxonómicos-evolutivos. Esto es lo que ocurre con los satélites centroméricos existentes en dos tipos de peces en los que ha trabajado nuestro grupo: las especies de la familia Sparidae (doradas, besugos, pargos, etc) y las del orden Acipenseriformes (esturiones).

En los esturiones concretamente hemos caracterizado dos familias de ADN satélite (una centromérica, HindIII, y otra intercalar, PstI). La familia PstI está presente en todos los Acipenseriformes mientras que la familia HindIII está en todos menos en dos especies, *Acipenser sturio* y *A. oxyrinchus*. El análisis de estas dos familias de ADN satélite, junto con otros marcadores nucleares y mitocondriales, está contribuyendo a aclarar ,junto a algunos aspectos

citogenéticos, la identificación de los esturiones (materia muy conflictiva), a establecer sus relaciones filogenéticas (en aparente oposición con la morfología) y los procesos evolutivos (sobre todo la existencia de procesos de hibridación interespecífica y poliploidía) que han experimentado este grupo de peces tan interesante, por ser fósiles vivientes en peligro de extinción y sobre todo por producir caviar.

Hasta el momento no se ha encontrado ninguna función específica asociada a los ADN satélites con localización intercalar en los cromosomas, pero se pueden utilizar como buenos marcadores citogenéticos y evolutivos. Nosotros concretamente estamos utilizando tres familias de ADN satélite existentes en los genomas de las plantas del Género *Rumex* (acederas y romazas, de la familia Polygonaceae) para investigar el origen y evolución de la dioecia y de los cromosomas sexuales característicos de este grupo de plantas. En relación con el origen de ambos fenómenos, los análisis morfológicos y corológicos parecían indicar que se habían originado varias veces -en varios subgéneros o secciones en los que se divide el género- a partir de diferentes especies hermafroditas o ginodioicas sin cromosomas sexuales diferenciados. Sin embargo, un estudio utilizando marcadores cloroplastidiales y nucleares pone de manifiesto el origen común reciente de todas las especies dioicas del grupo a partir de las hermafroditas y ginodioicas, existiendo dentro de las dioicas un clado más antiguo con un sistema de cromosomas sexuales simple (XX-XY) y otro clado más moderno con un sistema cromosómico complejo (XX-XY₁Y₂). Remachando este resultado, los análisis de los ADN satélites mencionados indican que el origen de la dioecia se ha visto acompañado inicialmente en especies con cromosomas sexuales simples por la aparición de una familia de ADN satélite (RAE180), aunque en alguna de ellas no se encuentra localizada en los cromosomas sexuales. En las especies con sistemas de cromosomas sexuales múltiples ha ocurrido posteriormente una gran amplificación de esta familia de ADN satélite en los cromosomas Ys, acompañada de la amplificación de una segunda (RAYSI) que tiene un origen común con una tercera familia (RAE730) que es autosómica (concretamente se encuentra localizada esta última en un segmento cromosómico heterocromático existente en una pareja autosómica de las especies con cromosomas sexuales múltiples). Además, el análisis molecular comparativo de estas tres familias permite llegar a la conclusión de que los satélites ligados a los Ys presentan unas tasas evolutivas más lentas que el satélite autosómico. Y asimismo el análisis citogenético comparativo de la disposición de los mismos en los cromosomas Ys de algunas especies con cromosomas sexuales múltiples, permite llegar a la conclusión de que, aunque aparentemente estos cromosomas tienen similar morfología, han experimentado fenómenos de reordenación y amplificación de las dos familias de ADN satélite presentes en ellos.

Por lo tanto, con esta exposición se demuestra que alrededor del ADN satélite existe en la actualidad un intenso campo de investigación y que, adecuadamente analizado, constituye un buen marcador citogenético y evolutivo.

B CHROMOSOMES – WHAT MAKES THEM DIFFERENT?

A. Houben

Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Chromosome Structure and Function Laboratory, Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben, Germany
houben@ipk-gatersleben.de

B chromosomes (Bs) are one of the most cryptic components of the genome, and they have always attracted much attention. Here I discuss current insights into the molecular structure and evolution of Bs, and point out new research developments into these enigmatic chromosomes that have occurred during the last few years.

The sequence information of B-located rRNA genes has been used to study the likely origin of Bs by determining the relatedness of the internal transcribed spacers (ITS) between the different chromosome types. Analysis of A and B chromosome ITS sequences of *Crepis capillaris* and *Brachycome dichromosomatica*, and comparisons with sequences of related species, indicates that the B chromosome rRNA genes are most likely derived from those of the A chromosomes of the host species (Leach et al. 2005, Marschner et al., 2007b). In the same context it should be noted that Bs contain similar types of coding and non-coding repeats to those found in extrachromosomal DNA of various organisms (Cohen et al., 2008). Whether an evolutionary link exists between extrachromosomal DNA and the evolution of Bs remains to be analysed.

Does the chromatin structure differ between A and B chromosomes? No differences were found between A and B chromosomes for the heterochromatic dimethylation marks of histone H3 at lysine positions 9 and 27. However, distinctions between As and Bs were revealed for the euchromatic di-, and trimethylation marks of histone H3 at lysine 4. The results indicate that the less-transcriptionally active Bs are not marked by an enriched level of heterochromatic histone marks, but rather by a low level of euchromatin-associated histone modifications (Marschner et al., 2007a). To monitor the transcription behavior of rye B chromosomes molecular tools were employed. Surprisingly a high level of transcription was found for two B-specific non-coding repetitive families (Carchilan et al., 2007). Comparative cDNA-AFLP analysis uncovered the existence of coding B chromosome-derived transcripts (Carchilan et al., unpublished). The origin and putative function of B chromosome-derived transcripts will be discussed.

References

- Carchilan et al (2007). Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes.
Plant Cell 19, 1738-1749.
- Cohen et al. (2008). Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. Plant J (in press).

- Leach et al. (2005) Molecular evidence for transcription of B chromosome ribosomal RNA genes in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171: 269-278.
- Marschner et al. (2007a). B chromosomes of *B. dichromosomatica* show a reduced level of euchromatic histone H3 methylation marks. *Chromosome Res.* 15, 215-222.
- Marschner et al. (2007b). Evolution and function of B chromosome 45S rDNA sequences in *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* 50, 638-644.

Presencia de elementos transponibles en saltamontes

**Montiel M.E., Ruiz-Estévez M., Cabrero J., Camacho J.P.M.
y López-León M.D.**

Departamento de Genética, Universidad de Granada, 18071, Granada
eemontiel@ugr.es

En los saltamontes son frecuentes los cromosomas B, pero se conoce poco sobre la presencia de otros tipos de elementos egoístas como, por ejemplo, los elementos transponibles (TEs). En este trabajo analizamos la presencia y distribución de varios tipos de TEs en varias especies de saltamontes, combinando técnicas moleculares y citogenéticas. Partiendo de una búsqueda de información molecular sobre elementos transponibles pertenecientes a las clases I y II, diseñamos cebadores degenerados basados en secuencias conservadas de los diferentes candidatos. Clonamos y secuenciamos los productos obtenidos mediante PCR para corroborar la presencia de los elementos buscados, y los usamos como sonda para estudiar su localización cromosómica mediante FISH. Empleamos 26 especies de saltamontes para la amplificación de Gypsy y R2, obteniendo productos en 24 de ellas, con lo que concluimos que los TEs son muy frecuentes en los saltamontes, pues estaban presentes en la mayoría de las especies analizadas. En *Eyprepocnemis plorans*, además, amplificamos otros TEs como LINE y Mariner. Hemos analizado, mediante FISH, individuos de *E. plorans* de varias poblaciones con distintos tipos B, e individuos de *L. migratoria* con B. En ambas especies, los elementos Gypsy, LINE y Mariner tienen una localización dispersa en la eucromatina pero están ausentes en la heterocromatina centromérica y el ADN ribosómico (ADNr), estando poco representados en el cromosoma B debido a que éste está compuesto mayoritariamente de los mismos ADNs repetitivos que la heterocromatina de los As. Por el contrario, el elemento R2 se encuentra circunscrito al ADNr y está más representado en el cromosoma B de *E. plorans* que posee el cluster más grande de ADNr 28S, que es donde se inserta exclusivamente R2.

Análisis citológico y molecular de los cromosomas X y B microdisecionados en dos especies de saltamontes

Teruel M. ⁽¹⁾, Cabrero J. ⁽¹⁾, Acosta M.J. ⁽²⁾ y Sánchez A. ⁽²⁾

⁽¹⁾ Departamento de Genética, Universidad de Granada, 18071 Granada

⁽²⁾ Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén
mteruel@ugr.es

Con objeto de profundizar en la naturaleza molecular y el origen de los cromosomas B de las especies *Eyprepocnemis plorans* y *Locusta migratoria*, hemos microdisecionado los cromosomas B y X en ambas especies, y amplificado este ADN por medio del GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma). Las sondas generadas, tanto a partir de los cromosomas B como de los cromosomas X microdisecionados, hibridaron, mediante "chromosome painting", con las regiones heterocromáticas de los cromosomas A y B. En los ADNs microdisecionados de los cromosomas X y B de *E. plorans* amplificamos, mediante PCR, los ITS del ADNr 18/28S, los genes ADNr 5S, y los genes de las histonas H3 y H4. Sin embargo, sólo el ADNr 18/28S fue revelado mediante FISH, indicando la presencia de pocas copias (o no lo suficientemente agrupadas) de los genes de las histonas y el 5S en el B y el X. En *L. migratoria* amplificaron los genes para las histonas H3 y H4 en el ADN microdisecionado de ambos cromosomas, mientras que las regiones ITS únicamente amplificaron en el microdisecionado del B. Los resultados de FISH permitieron visualizar la presencia de histonas en el cromosoma B de esta especie pero no en el X. La comparación de la secuencia de los genes amplificados en los cromosoma B y X de las dos especies nos permite analizar la evolución de estas secuencias en estos cromosomas parásitos.

Microdissección del cromosoma X de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera)

**Sarasa J.⁽¹⁾, Fernández-Calvín B.⁽¹⁾, Fominaya A.⁽²⁾, Enciso M.⁽¹⁾,
Loarce Y.⁽²⁾, Ferrer E.⁽²⁾ y Bella J.L.⁽¹⁾**

⁽¹⁾ Departamento de Biología - Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

⁽²⁾ Departamento de Biología Celular, Universidad de Alcalá, Madrid

jonas.sarasa@uam.es

La zona híbrida formada en los Pirineos por el saltamontes *Chorthippus parallelus* se ha originado por el contacto secundario post-glaciación de las subespecies *Chorthippus parallelus erythropus* y *Chorthippus parallelus parallelus*. La primera es endémica de la Península Ibérica, mientras que la segunda se distribuye por el resto de Europa.

El estudio de las poblaciones puras e híbridas de *Chorthippus parallelus* ha puesto de manifiesto que la diferenciación citogenética que muestran estos organismos afecta principalmente a sus cromosomas sexuales, como indican las diferencias observadas en el número y localización de las NOR, o en la distribución y composición de la heterocromatina constitutiva.

Por otra parte, distintos modelos proponen que las secuencias presentes en los cromosomas sexuales pueden acumular cambios con una tasa más rápida que el conjunto del genoma, de este modo constituyen sitios preferentes donde es posible detectar divergencia genética, especialmente en supuestos como éste con determinismo del sexo XX/X0.

El objetivo de este trabajo es aislar, amplificar, analizar y comparar las secuencias que componen el cromosoma X de una y otra subespecie, con objeto de determinar hasta qué punto puedan estar implicadas en la diferenciación genética que muestran estos organismos. En último término, se pretende caracterizar genes y secuencias potencialmente implicados en su proceso de especiación incipiente.

Para ello, se está aislando mediante microdissección los cromosomas sexuales de cada subespecie, y se está iniciando su amplificación con el objetivo final de obtener genotecas para el cromosoma X de cada una de ellas, lo cual nos permitirá realizar la caracterización de las secuencias obtenidas. Se presentan los resultados preliminares obtenidos en las fases iniciales del estudio.

El transposón *Galileo* como promotor de la generación de inversiones cromosómicas en *Drosophila*.

Delprat A., Negre B., Puig M. y Ruiz A.

Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra (Barcelona)
Alejandra.Delprat@uab.cat

Existen diversos mecanismos capaces de generar inversiones cromosómicas en *Drosophila*. Sin embargo, se sabe poco aún del origen de las inversiones en poblaciones naturales. Los trabajos de nuestro grupo han revelado que dos inversiones polimórficas de *Drosophila buzzatii* ($2j$ y $2q^7$) se generaron por recombinación ectópica entre copias del transposón *Galileo* insertado en diferentes sitios del cromosoma 2. Para valorar el alcance de este mecanismo es necesario estudiar más inversiones polimórficas.

En este trabajo presentamos los puntos de rotura de la inversión $2z^3$ de *D. buzzatii*. Es una inversión moderadamente frecuente que se encuentra en muchas poblaciones de Argentina y España. Los puntos de rotura se cartografiaron primero de forma precisa en la ordenación sin la inversión y después se rastrearon con sondas de los genes adyacentes dos genotecas de la ordenación invertida. La secuenciación y el análisis bioinformático de los clones aislados ha permitido conocer la compleja estructura de los puntos de rotura. En el cromosoma invertido se observaron grandes inserciones, de 2.870 nucleótidos en el punto distal y de 4.792 nucleótidos en el proximal, formadas por distintos transposones incluyendo dos copias completas de *Galileo* (subfamilia *Newton*), uno en cada punto de rotura. Ambas copias presentan las duplicaciones directas del sitio diana (TSD) intercambiadas e invertidas. Además, el análisis nucleotídico de las repeticiones terminales invertidas (TIRs) reveló una mayor divergencia nucleotídica entre las TIR de una misma copia que entre las de distintas copias, indicando que se trata de copias quiméricas. En conclusión, *Galileo* generó la inversión $2z^3$ por recombinación ectópica. El hecho de que tres inversiones de *D. buzzatii* estuvieran generadas por el mismo transposón sugiere firmemente que este elemento no es simplemente un substrato pasivo de la recombinación ectópica sino que su actividad transposicional está involucrada en la generación de reordenaciones en poblaciones naturales.

Evolución cromosómica del cluster *Drosophila martensis*: Contrastación de la filogenia de inversiones y de la coincidencia entre puntos de rotura

Prada C.F., Delprat A. y Ruiz A.

Departament de Genètica i de Microbiologia, Universidad Autònoma de Barcelona, 08193
Bellaterra (Barcelona)
biofer@lycos.com

En el género *Drosophila*, la comparación de los patrones de bandas visibles en los cromosomas politénicos ha permitido (1) determinar que las inversiones paracéntricas son el cambio cromosómico más frecuente; (2) establecer las relaciones filogenéticas entre especies relativamente próximas; (3) descubrir que las inversiones no se distribuyen al azar ni entre cromosomas ni dentro de cromosomas, con frecuentes coincidencias de puntos de rotura. Los análisis citológicos, sin embargo, tienen una resolución limitada y pueden dar lugar a errores en la localización de los puntos de rotura de las inversiones. Mediante una combinación de procedimientos citogenéticos y bioinformáticos es posible contrastar las filogenias cromosómicas y el reuso de los puntos de rotura de las inversiones. Hemos reanalizado la filogenia de inversiones del cluster *martensis*, que incluye cuatro especies del grupo repleta (subgrupo *mulleri*): *D. martensis*, *D. uniseta*, *D. starmeri* y *D. venezolana*. Para ello, se hibridaron en el cromosoma 2 de *D. uniseta* 82 clones provenientes de la genoteca de clones BAC de *D. buzzatii* (especie que presenta la ordenación ancestral del cromosoma 2). La comparación del orden de los clones entre el cromosoma 2 de *D. buzzatii* y el de *D. uniseta* ha revelado 9 segmentos conservados y 8 puntos de rotura. El número mínimo de inversiones necesarias para transformar el cromosoma 2 de *D. buzzatii* en el de *D. uniseta* es 5, lo que quiere decir que hay al menos dos puntos de rotura compartidos entre las cinco inversiones. En consecuencia, el cromosoma 2 de *D. uniseta* posee probablemente cinco inversiones fijadas, dos de las cuales no fueron descubiertas en los análisis citológicos previos. Estas dos inversiones no fueron detectadas previamente debido a la proximidad de sus puntos de rotura que hace que la segunda inversión reinvierta prácticamente el segmento invertido por la primera y restaure el patrón de bandas original. Se han identificado 8 clones BAC que contienen uno o más puntos de rotura. La hibridación de estos clones BAC en los cromosomas de *D. martensis*, *D. starmeri* y *D. venezolana* ha permitido determinar la distribución de las cinco inversiones entre las cuatro especies y contrastar la filogenia cromosómica. Los resultados muestran un patrón inusual de inversiones compartidas entre las cuatro especies que es compatible con varios posibles árboles filogenéticos.

Caracterización molecular de la heterocromatina en *Sciara coprophila*

Escribá M.C. ^(1,2), Villasante A. ⁽²⁾ y Goday C. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

⁽²⁾ Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC. UAM. Madrid
rcgba002@cib.csic.es

Sciara coprophila (Diptera, Sciaridae) constituye un modelo clásico de eliminación programada de cromosomas durante el desarrollo. Los procesos de eliminación cromosómica implican alteraciones en la segregación de los mismos durante la división celular en diferentes tejidos.

La organización molecular de la heterocromatina en el genoma de *S. coprophila* es todavía poco conocida, a pesar de su importancia en la segregación cromosómica y en los procesos de eliminación. En *S. coprophila* ($2n=6$), la heterocromatina se localiza en las regiones pericentroméricas y subterminales de los cromosomas del complemento cromosómico regular. Asimismo, existen cromosomas accesorios denominados "L" que son exclusivos de la línea germinal y cuya naturaleza es predominantemente heterocromática. Se sabe que las regiones heterocromáticas próximas al centrómero del cromosoma X controlan su eliminación del soma embrionario durante la embriogénesis temprana. Así mismo, se supone que la heterocromatina de los cromosomas L, que también son excluidos del soma de forma similar, también contiene secuencias heterocromáticas que la eliminación de dichos cromosomas.

Para iniciar la caracterización molecular de la heterocromatina en *S. coprophila* se ha procedido a la microdissección de diferentes regiones heterocromáticas (región pericentromérica del cromosoma X y regiones teloméricas de autosomas) de cromosomas politénicos de glándulas salivales. Así mismo se ha llevado a cabo la microdissección de cromosomas L enteros en células de la línea germinal. Se ha llevado a cabo la extracción y amplificación del DNA mediante DOP-PCR y el clonaje de los fragmentos de DNA obtenidos en el vector pCR2.1-TOPO para su posterior aislamiento y secuenciación. Los clones obtenidos se están secuenciando y su localización en la heterocromatina se está determinando mediante experimentos de hibridación *in situ*. Se presentan y discuten los primeros datos obtenidos.

Caracterización y localización cromosómica de dos familias de ADN satélite en el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*)

García-García M.C., Palomeque T. y Lorite P.

Departamento de Biología Experimental. Área de Genética, Universidad de Jaén
plorite@ujaen.es

El escarabajo de la patata pertenece a la familia Chrysomelidae. Aunque es de origen norteamericano, actualmente presenta una amplia distribución mundial, especialmente asociado a los lugares de cultivo de la patata, sobre los que constituye una plaga importante.

En este trabajo hemos analizado dos familias diferentes de ADN repetitivos. La digestión con EcoRI genera la aparición de una única banda de aproximadamente 240 pb, que contiene dos tipos diferentes de ADN repetitivos. El primero de ellos (LEDE-I) presenta un tamaño de 240 pb. Cuando se realiza hibridación Southern con este repetitivo sobre ADN genómico digerido con EcoRI no se obtiene la escalera típica de los DNAs repetidos en tándem. Mediante PCR se pudo determinar que el fragmento de 240 pb forma parte de una secuencia repetida en tándem, con un monómero de 300 pb.

El segundo DNA repetitivo (LEDE-II) también se obtuvo a partir de la banda obtenida tras la digestión con EcoRI. El análisis de la secuencia de los clones obtenidos permitió determinar que en realidad este fragmento representa un dímero de una secuencia repetitiva de 109 pb. La hibridación Southern genera una escalera típica con fragmentos que difieren en 109 pb. Esta especie tiene un determinismo del sexo del tipo XX/X0. Se ha realizado FISH usando células de macho (17 bivalentes + X). Se ha detectado la presencia del satélite LEDE-I en 12 bivalentes y del satélite LEDE-II en 8 bivalentes, lo que indica la presencia de cromosomas portadores de ambos tipos de ADN satélite. Ambos ADN satélites presentan localización pericentrométrica. La hibridación secuencial con ambos satélites en cromosomas mitóticos ha permitido determinar la existencia de cromosomas que no presentan ninguna de las dos familias de ADN satélite clonadas y que en aquellos cromosomas que portan ambos tipos de satélite cada uno de ellos está localizado en un brazo cromosómico diferente.

Efecto de pesticidas en la activación neocentromérica del cromosoma 5RL de centeno en trigo

Cuacos M., González-García M., González-Sánchez M., Puertas M.J. y Vega J.M.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid
mCuacos@bio.ucm.es; vegajuanma@bio.ucm.es

Los neocentrómeros son regiones cromosómicas diferentes de los centrómeros en estructura, secuencia y localización, que en determinados genotipos se activan y comportan como centrómeros en cuanto que son capaces de dirigirse a los polos, co-orientar con los centrómeros verdaderos y unirse a microtúbulos. Previamente hemos demostrado que una constricción presente en el brazo largo del cromosoma 5R (5RL) de centeno se estira enormemente y es capaz de co-orientar con el centrómero, o centrómeros en meiosis. Esta actividad neocentromérica aparece en líneas de adición 5RL de centeno añadido al trigo y la constricción es capaz de unirse a microtúbulos. Debido a que la actividad neocéntrica en 5RL se perdía en las siguientes generaciones, hemos ensayado una serie de factores ambientales para valorar su efecto en la inducción de neocentromeros.

Se observó que la actividad neocéntrica ocurre si las plantas han sido tratadas con pesticidas cuyos compuestos activos son derivados de carbamatos. Los efectos del pesticida son perceptibles al día siguiente del tratamiento. En plantas ditelosómicas para el 5RL, el bivalente 5RL puede mostrar los centromeros orientados al mismo polo celular y las constricciones orientadas hacia el polo opuesto. Para analizar la actividad neocentromérica a lo largo de la constricción se utilizó como marcador la secuencia repetida pSc119.2 que se localiza dentro de la constricción. Se observó que la región con actividad neocéntrica se marca con pSc119.2 en algunas células y con las regiones flanqueantes de pSc119.2 en otras células. Por lo tanto la actividad neocéntrica no está limitada a una zona concreta en la constricción sino que se puede extender a lo largo de ella. Se discute que el efecto de los derivados de carbamatos en la activación del neocentrómero 5RL es a través de alteraciones en el huso

Aplicación de herramientas citogenéticas en el estudio de la meiosis de cereales

Prieto P.⁽¹⁾, Colas I.⁽²⁾, Shaw P.⁽²⁾, Moore G.⁽²⁾

⁽¹⁾Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 4084, 14080 Córdoba, Spain

⁽²⁾ John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich, NR4 7UH, UK
152prarm@uco.es

La mayoría de los aspectos más interesantes de la biología celular y del desarrollo de las plantas ocurre en células de las capas más internas de los tejidos vegetales. Ejemplos de ello son la meiosis en los meiocitos de las anteras, la embriogénesis o el desarrollo del endospermo que ocurren en semillas en desarrollo. Estas células son difíciles o imposibles de analizar incluso con el uso de la microscopía confocal, que raras veces permite analizar tejido más allá de los 100 μm . Para que estas células sean accesibles es necesario diseccionar el tejido. El uso de un vibrotomo permite realizar secciones gruesas (20-50 μm) de una manera rápida y sencilla. Estas secciones conservan la estructura tridimensional del tejido y pueden ser analizadas mediante microscopía confocal. Esta técnica permite la identificación fiable de los distintos tipos celulares gracias a que se conserva el contexto del tejido, que se pierde cuando se realizan aplastados celulares. Por ejemplo los meiocitos pueden identificarse y analizarse claramente en el contexto de tejido materno circundante.

Hemos desarrollado hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en secciones de inflorescencias intactas de trigo y cebada para estudiar la meiosis, la organización cromosómica y el comportamiento de introgresiones de especies relacionadas en trigo. El método combina la obtención de secciones vegetales con la hibridación *in situ* y la microscopía confocal. Mediante FISH hemos localizado centrómeros, telómeros y regiones subteloméricas y también se puede utilizar ADN genómico total para visualizar cromosomas o segmentos cromosómicos introgresados desde una especie afín en el fondo genético de otra especie. Con estas herramientas se pretende abordar cuestiones como la naturaleza de los mecanismos de reconocimiento y apareamiento cromosómico en cereales, o comparar eventos meióticos en especies relacionadas. Los resultados de estos estudios pueden aplicarse directamente a programas de mejora de trigo para mejorar la eficiencia en la introgresión de caracteres de interés desde especies afines.

Identificación mediante FISH del DNA de centeno en trigo utilizando una única sonda repetida

González-García M., Puertas M.J. y Vega J.M.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid
miriamgo@bio.ucm.es; vegajuanma@bio.ucm.es

La familia de secuencias repetidas R173 es específica de centeno, y se distribuye de forma dispersa en sus cromosomas. A pesar de tener una organización genómica típica de transposones, la secuenciación de varios elementos de la familia no ha mostrado características asociadas con trasposones o retrotransposones. Con el fin de determinar la distribución de la familia R173 en cada cromosoma de centeno hemos realizado hibridación in situ fluorescente (FISH) en líneas de adición trigo-centeno.

Como sonda para FISH se clonó un fragmento de 600pb, común a varios elementos de la familia, que hemos denominado UCM600. El patrón de hibridación de UCM600 fue similar en los siete cromosomas de centeno: la secuencia aparece dispersa a lo largo de los brazos cromosómicos pero no hibrida en regiones centroméricas y subtelméricas. Se confirmaron estos resultados haciendo una hibridación simultánea de UCM600, el retrotransposon de centrómero Bilby, y la secuencia subtelmérica repetida pSc200. Se observó que las regiones donde pSc200 y Bilby están presentes coinciden con las regiones donde UCM600 está ausente.

Ya que la UCM600 se encuentra dispersa, estudiamos la posibilidad de usarla para identificar el DNA de centeno en el fondo de trigo. En las líneas de adición trigo-centeno, los cromosomas de centeno se distinguieron claramente de los de trigo en FISH de distintos estadios mitóticos y meióticos. En triticales, los 14 cromosomas del genoma de centeno aparecen marcados por la sonda UCM600 y no aparecen señales en los cromosomas de trigo. En líneas con translocaciones se identifican notoriamente las regiones de centeno translocadas a trigo. Los resultados muestran que la hibridación de FISH de la sonda UCM600 es equivalente a la hibridación de GISH cuando se utiliza DNA genómico de centeno como sonda, pero las señales de UCM600 son más claras y específicas. La posibilidad de utilizar una única sonda para identificar el DNA de centeno será de gran beneficio en este tipo de aplicaciones

Mapeo físico del cromosoma 4H^{ch} de *Hordeum chilense* mediante líneas aneuploides y de delección de tritórdeo.

Said M. y Cabrera A.

Departamento de Genética, ETSIAM, Universidad de Córdoba
gelcabca@uco.es

Hordeum chilense es una especie de cebada silvestre que tiene características de interés agronómico para la mejora del trigo. Entre las características que se pueden introgresar se encuentra la resistencia al hongo *Septoria tritici* que está determinada por genes localizados en el cromosoma 4H^{ch}. Aunque la identificación de este cromosoma en el fondo genético del trigo se puede realizar mediante FISH sería muy útil disponer de marcadores moleculares distribuidos físicamente a lo largo del cromosoma que permitan la detección de introgresiones de este cromosoma en el fondo genético de trigo duro y harinero. Con ese fin se han caracterizado citológicamente líneas aneuploides de tritórdeo (anfiploide entre *H.chilense* y *T.turgidum*, $2n=6x=42$, AABBH^{ch}H^{ch}) en las que está implicado el cromosoma 4H^{ch}. Las líneas caracterizadas son fértiles y estables y se han utilizado para el mapeo físico de marcadores moleculares en ese cromosoma. Se han generado marcadores polimórficos (SSRs, STSs y ESTs) entre *H.chilense* y trigo (duro y harinero) y se han localizado en el cromosoma 4H^{ch} mediante comprobación de su ausencia en la línea nulisómica 4H^{ch} de tritórdeo y su presencia en la línea de adición 4H^{ch} en trigo harinero “Chinese Spring”. La posición física de los marcadores en el cromosoma se ha llevado a cabo utilizando la línea ditelosómica 4H^{ch}S y una línea de delección terminal del 70% del 4H^{ch}L. Los marcadores presentes en las dos líneas se localizan en el 4H^{ch}S, los que están ausentes de ambas se localizan en la región distal del 4H^{ch}L y aquellos presentes en la línea de delección y ausentes de la ditelo 4H^{ch}S se encuentran en el 30% proximal del 4H^{ch}L. En total se han localizado 25 marcadores a lo largo del cromosoma y aproximadamente un tercio de los marcadores se sitúan en cada una de esas tres regiones cromosómicas. Una combinación de tres marcadores permitiría detectar introgresiones de tres regiones diferentes del cromosoma 4H^{ch} en el fondo genético de trigo duro y harinero.

Optimización de un protocolo utilizando oligonucleotidos modificados como sondas para la localización cromosómica de SSRs (Secuencias Simples Repetidas)

Cuadrado A. y Jouvé N.

Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá . 28871 Alcalá de Henares (Madrid)

angeles.cuadrado@uah.es, nicolás.jouve@uah.es

Una fracción importante del genoma de todos los eucariotas esta integrado por SSRs o microsatélites. La función biológica de la mayoría de los SSRs continua siendo poco conocida, en parte debido al limitado conocimiento de su localización a nivel cromosómico, incluso en especies modelo. En nuestro laboratorio llevamos varios años analizando la distribución cromosómica de distintos SSRs, especialmente di- y trinucleotidos, en distintas especies tanto animales como vegetales. Los resultados obtenidos en relación con la distribución conservada de algunos SSRs entre distintas especies y la asociación de determinados motivos con regiones cromosómicas específicas nos esta permitiendo avanzar en el conocimiento de su posible papel en la estructura, función y evolución de los genomas, nuestro principal y actual objetivo.

La utilización de oligonucleotidos sintéticos como sondas requiere de un ajuste de las condiciones de hibridación en función de su T_m , que hace tedioso y dificulta la localización simultánea de los distintos motivos SSRs en experimentos de FISH. Para solventar este problema, en nuestro laboratorio hemos venido utilizando sondas duplexas de varios cientos de pares de bases, generadas a partir de oligonucleotidos (15-24 b.), lo que hace posible su detección en condiciones estándar de FISH, si bien renunciando a las ventajas que conlleva la utilización de sondas de cadena simple. Actualmente la oferta de oligonucleotidos modificados por parte de las casas comerciales es enorme. Nosotros estamos comparado diferentes modificaciones (extremo 5', 3', internas) diferente marcajes (digoxigenina, biotina, Cy3, etc) y condiciones de hibridación (desnaturalización, % de formamida, etc) para conseguir las condiciones optimas en un protocolo FISH que permita localizar distintos motivos SSRs utilizando oligonucleotidos comercialmente modificados y que por tanto puedan ser utilizados en cualquier laboratorio, incluso donde no haya experiencia y/o infraestructura en el marcaje y preparación de sondas.

Este trabajo está financiado con la ayuda AGL 2006-09018-C02-01 del MEC.

Localización cromosómica de genes de copia única mediante FISH en trigo. Utilización de un protocolo basado en el sistema TSA (Tyramide Signal Amplification)

Pérez R., de Bustos A., Jouvé N. y Cuadrado A.

Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá 28871 Alcalá de Henares (Madrid)
nicolás.jouve@uah.es

Un aspecto importante en la comprensión de cualquier mecanismo biológico es el análisis del sistema genético implicado. El mecanismo de la recombinación homóloga es muy complejo y en él se encuentran involucrados múltiples genes. Nuestro estudio se restringe a la caracterización en trigo de un sistema génico que participa en las primeras fases de la recombinación homóloga, el complejo MRN formado por los productos de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*. Un aspecto de la caracterización molecular de estos genes de gran interés es el de su localización en los cromosomas. La forma más directa de asignar genes a cromosomas es mediante la visualización de sus secuencias mediada por hibridación *in situ*. Las técnicas de FISH se llevan utilizando con éxito en plantas con sondas de ADN repetido desde hace dos décadas, si bien todavía la localización de genes resulta difícil y son muy pocos los trabajos que han descrito con éxito la localización de secuencias de copia única, incluso conociendo de antemano su localización cromosómica por cartografía génica. Una de las principales causas de la dificultad a la hora de localizar secuencias de bajo número de copias por hibridación “*in situ*”, se debe a la aparición de señales inespecíficas, que hacen que las señales de hibridación no sean claras e inambiguas. En nuestro laboratorio estamos poniendo a punto un protocolo de FISH basado en el sistema TSA para la amplificación de las señales de hibridación de secuencias de copia única. Esta técnica nos ha permitido hasta el momento la localización cromosómica del gen *Rad50* en el brazo corto de los cromosomas de trigo 5A, 5B y 5D. Estos resultados indican que esta técnica puede ser de gran utilidad para integrar mapas físicos y genéticos y estudiar homologías entre diferentes genomas de cereales.

Este trabajo está financiado con la ayuda AGL 2006-09018-C02-01 del MEC.

Alteraciones cromosómicas inducidas por la transformación con T-DNA en *Arabidopsis*. Implicaciones en el análisis de mutantes.

Pradillo M., López E., Linacero R., Romero C., Oliver C., Cuñado N. y Santos J.L.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid
pradillo@bio.ucm.es

La mutagénesis insercional con T-DNA procedente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es una de las estrategias más frecuentemente utilizadas para el aislamiento de genes meióticos en *Arabidopsis*. Un primer paso en la identificación de mutantes meióticos es la detección de plantas con fertilidad reducida. Un análisis citogenético posterior permite comprobar si las mutaciones afectan verdaderamente al proceso meiótico, ya que pueden existir mutantes, que aunque manifiesten un fenotipo similar, presenten alteraciones en otros aspectos del desarrollo reproductivo. Finalmente el aislamiento y la secuenciación del DNA genómico flanqueante al T-DNA se consigue por medio de la aplicación de técnicas moleculares como la I-PCR o la TAIL-PCR.

No obstante, la identificación de genes alterados por la inserción del T-DNA se puede ver dificultada por los fenómenos que pueden acontecer durante la integración del mismo en el genoma del huésped. Entre éstos están la aparición de varios insertos, bien en tándem, directo o inverso, o separados por secuencias de relleno, y las reorganizaciones del genoma como deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones. Estas alteraciones parecen ser la causa de ciertos problemas que nos hemos encontrado a la hora de caracterizar diversos mutantes meióticos. Un ejemplo, lo constituye el mutante *ssd1* (*structural spindle disruption 1*), denominado así porque en meiosis presenta segregaciones cromosómicas aberrantes como resultado de una estructura anómala del huso. En este mutante hemos detectado la existencia de, al menos, dos reordenamientos cromosómicos probablemente asociados a la integración del T-DNA.

Por otro lado, debido a las frecuentes modificaciones del borde derecho del T-DNA en algunas ocasiones puede resultar complicado el clonaje de la secuencia del DNA genómico que flanquea este borde, como nos ha ocurrido, por ejemplo, en el mutante *rad51-2*. Analizaremos las diferentes alternativas que hemos planteado para intentar resolver este problema.

DNA mitocondrial en núcleos de hepatocitos de rata observado con FISH

González-Sánchez M., Puertas M.J. y González-García M.

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

Está demostrado que a lo largo de la evolución fragmentos del genoma de los orgánulos han pasado al núcleo de las células que los albergan. En este trabajo se ha visualizado mediante FISH el DNA mitocondrial (mtDNA) en el interior de los núcleos de hepatocitos de rata.

Para evitar contaminación con DNA nuclear, se utilizó como sonda mtDNA total de rata obtenido a partir de mitocondrias aisladas. Este DNA se marcó mediante nick translation y se utilizó como sonda siguiendo los pasos de una FISH convencional.

Se utilizaron tres individuos machos de una semana de edad y tres machos de 12 semanas de edad para comparar la cantidad de mtDNA presente en los núcleos en ambas edades.

Para elaborar un estudio cuantitativo se utilizó como control la secuencia TTAGGG del telómero de vertebrados, simultáneamente con la secuencia de mtDNA en los mismos experimentos de FISH. El recuento de las señales se ha llevado a cabo mediante software adecuado.

Los resultados muestran el mismo número de señales discretas y conspicuas de mtDNA en las ratas de ambas edades, pero existen diferencias entre el área y la intensidad de las mismas, siendo significativamente mayor el de las ratas viejas.

Los resultados son compatibles con amplificación del mtDNA a lo largo de la vida de los individuos. No son compatibles con poliploidización de los núcleos ya que el número, el área y la intensidad de los telómeros es constante entre ratas viejas y jóvenes.

Este trabajo forma parte de un estudio sobre el papel del mtDNA en el envejecimiento llevado a cabo en colaboración con el grupo de los Prof. G. Barja (Univ. Complutense) y J. Sastre (Univ. Valencia).

Estudio de secuencias repetidas (ADN satélites y retrotransposones) en el genoma de la especie *Microtus thomasi*.

Marchal J.A.⁽¹⁾, Acosta M.J.⁽¹⁾, Fernández-Espartero C.H.⁽¹⁾, Romero I.⁽¹⁾, Rovatsos M.T.⁽²⁾, Mitsainas G.P.⁽²⁾, Bullejos M.⁽¹⁾, Giagia-Athanasopoulou E.B.⁽²⁾ y Sánchez A.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

⁽²⁾ Section of Animal Biology, Department of Biology, University of Patras, Grecia
abaca@ujaen.es

Los análisis de diferentes poblaciones de la especie *Microtus thomasi* en Grecia han demostrado la existencia de varias formas cariotípicas. Los cariomorfos “thomasi” y “atticus” tienen un número diploide de $2n = 44$ y varían en la morfología del cromosoma X, siendo acrocéntrico en “thomasi” y submetacéntrico en “atticus”. Además, al igual que en otras especies del género *Microtus*, se han observado variaciones en los cromosomas sexuales que afectan a la longitud de los brazos, localización y cantidad de heterocromatina constitutiva. Según estas diferencias se han descrito cinco cromosomas X (X_0 , X_1 , X_2 , X_3 y X_4) y cuatro cromosomas Y (Y_0 , Y_1 , Y_2 , Y_3) en *M. thomasi* “thomasi”, y dos cromosomas X (X_{st1} y X_{st2}) y dos cromosomas Y (Y_0 y Y_m) en *M. thomasi* “atticus”.

En este trabajo hemos clonado varias secuencias de *M. thomasi* “atticus” que corresponden a retrotransposones del tipo LINE1 y SINE. Mediante FISH hemos demostrado que se distribuyen homogéneamente en las regiones eucromáticas de todos los cromosomas, estando ausentes en la heterocromatina pericentromérica. En relación con el cromosoma X se acumulan en la región eucromática y no están presentes en las bandas heterocromáticas.

Además, hemos caracterizado una nueva secuencia repetida, específica del genoma de *M. thomasi*, que se localiza en la heterocromatina pericentromérica de la mayoría de los autosomas y de los cromosomas X. En el cariomorfo “atticus” esta secuencia se distribuye en el bloque heterocromático del cromosoma X_{st1} mientras que no está presente en las bandas de heterocromatina intersticial de los diferentes cromosomas X de “thomasi”. En relación con el cromosoma Y esta secuencia solo está presente en la región pericentromérica del cromosoma tipo Y_2 .

Finalmente, los estudios de “chromosome painting” sugieren que el cromosoma X_{st1} de “atticus” pudo haberse originado como consecuencia de una fusión entre el cromosoma X y el cromosoma Y.

Identificación de una translocación recíproca en animales de un centro de inseminación porcina, y consecuencias sobre la reproducción.

Rodríguez A.⁽¹⁾, Sanz E.⁽¹⁾, De Mercado E.⁽¹⁾, Doménech V.⁽²⁾, Martín M.⁽²⁾, Carrascosa C.⁽²⁾, Gómez E.⁽²⁾, San Román C.⁽³⁾, Claver M.⁽⁴⁾ y Sánchez R.⁽²⁾

⁽¹⁾ Centro de Pruebas de Porcino. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Hontalbilla, (Segovia)

⁽²⁾ Dpto. Reproducción Animal, INIA, Madrid

⁽³⁾ Hospital Ramón y Cajal, Madrid

⁽⁴⁾ SAT 322 Hnos. Chico Galindo, Aranda de Duero (Burgos)
rodvelan@itacyl.es

En la especie porcina, la identificación de las primeras alteraciones cromosómicas se produjo en los años 60, y estaban relacionadas principalmente con problemas reproductivos. Hasta el momento, hay 102 alteraciones descritas, con una incidencia en la población de un 0,47%, la mayoría de las cuales son translocaciones recíprocas identificadas en verracos de centros de inseminación. La principal consecuencia de las translocaciones, es una reducción media del tamaño de camada de un 50%, debido a una elevada mortalidad embrionaria, además de transmitirse al 50% de la descendencia. El presente estudio, se llevó a cabo en una población porcina formada por 67 machos reproductores de un centro de inseminación artificial. Se realizó un análisis citogenético de los animales, a partir de un cultivo de sangre periférica y bandejo GTL, que determinó la presencia de una misma translocación cromosómica recíproca rcp(1;11)(q24;p13), en dos verracos de raza Duroc emparentados. Para valorar el efecto sobre los resultados reproductivos de estos dos verracos, se estudiaron 782 inseminaciones realizadas a reproductoras (Large White x Landrace x Meishan) en una explotación comercial. El porcentaje de reducción del tamaño de camada fue de un 27,9% lechones nacidos vivos, respecto a las camadas de verracos contemporáneos con cariotipo normal. Ni el porcentaje de fertilidad, ni la calidad seminal de los machos se vieron afectados. En las camadas de los machos con la translocación, nacieron lechones afectados con distintos grados de malformaciones y poco viables, que causaron una elevada mortalidad predestete. Con este estudio, se ponen de manifiesto las consecuencias nefastas a nivel reproductivo, de la introducción de un verraco con una alteración cromosómica en un centro de inseminación. En el esquema de producción porcina actual, este hecho supone importantes pérdidas económicas, que justifican la necesidad del análisis citogenético de todos los animales antes de su utilización como reproductores.

Caracterización cariotípica de *Xenostrobus securis*: un mejillón invasor

Pérez-García C., Morán P. y Pasantes J.J.

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Universidad de Vigo
cpegar@uvigo.es

Xenostrobus securis es un mitílido originario de Nueva Zelanda que ha sido catalogada por la Unión Europea como una especie invasora. Esta especie ha sido recientemente detectada en la costa gallega y forma bancos en la Ría de Vigo que se extienden desde la desembocadura del río Verdugo hasta la isla de San Simón, situada a varios kilómetros de la desembocadura del río.

Con el fin de caracterizar citogenéticamente esta especie, se recolectaron mejillones y se alimentaron en el laboratorio antes de ser tratados con BrdU y colchicina. Las preparaciones cromosómicas, obtenidas a partir de tejidos gonadal y branquial de juveniles, fueron teñidas con naranja de acridina y se analizaron los patrones de bandas de replicación obtenidos.

Para localizar la posición cromosómica de las familias génicas ribosómicas y de las histonas mediante FISH se emplearon como sondas un fragmento del rDNA 28S, la unidad completa rDNA 5S y los genes de las histonas H3, H2B y H2A. Todas las sondas fueron amplificadas mediante PCR y marcadas mediante *nick traslation* salvo la sonda H3, marcada durante la amplificación.

En todos los individuos analizados, la mayoría de las metafases estudiadas presentaron números cromosómicos diploides $2n = 30$. Existen dos agrupaciones de genes de la familia génica ribosómica principal y ambas se localizan en regiones próximas al centrómero de los dos pares cromosómicos de mayor tamaño. Las 4 agrupaciones de genes 5S se encuentran en otros tres pares cromosómicos diferentes. Por lo que se refiere a los genes de histonas, se encuentran situadas en otros 4 pares cromosómicos. Por tanto el empleo de las tres familias permite la identificación inequívoca de 9 de los 15 pares cromosómicos que constituyen el cariotipo de este mitílido.

Caracterización de los ADNs satélites centroméricos en peces planos (Orden Pleuronectiformes) y su uso en el estudio de sus genomas.

De la Herrán R.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada
rherran@ugr.es

El orden Pleuronectiformes está formado por un gran número de especies de peces planos. Estos peces tienen un gran interés desde el punto de vista evolutivo, ya que presentan genomas muy pequeños, siendo controvertidas, además, sus relaciones filogenéticas. También son interesantes desde el punto de vista económico, pues algunas especies, como el lenguado, el fletán o el rodaballo, son utilizadas en acuicultura y existen programas para su mejora basados en la caracterización de sus genomas. En este sentido, sería interesante conocer cuáles son las secuencias repetidas existentes en sus genomas y, concretamente, los ADNs satélites que presentan. Dicha información puede ser útil no sólo para establecer las relaciones filogénéticas de este grupo, sino en estudios moleculares de sus genomas tales como el análisis de BACs o de genotecas de ESTs.

Con este objetivo nuestro grupo ha caracterizado a nivel citogenético y molecular los ADN satélites centroméricos de 4 especies de peces planos (lenguado, acedía, fletán y rodaballo), para las cuales comienza a haber planes de mejora genética. Para su aislamiento se han utilizado tanto técnicas convencionales de corte con enzimas de restricción como técnicas más complejas (self-priming PCR) cuando fue necesario. Tras la clonación, la secuenciación y la localización *in situ* de dichas familias de ADN satélite, hemos puesto de manifiesto que en cada especie existe una familia diferente de ADN satélite centromérico. Y hemos realizado un estudio a la búsqueda tanto de repeticiones internas como de motivos funcionales conservados, para lo cual hemos comparado estas secuencias entre sí y con otros ADN satélites centroméricos de peces y otros organismos. Así, hemos llegado a la conclusión de que en los peces planos, a diferencia de otros grupos de peces como los Espáridos o los Tetraóntidos, sus ADN satélites centroméricos están muy diferenciados entre especies, lo que hay tener en cuenta en los correspondientes análisis genómicos. Pero por otro lado, también se concluye que no se puede utilizar el ADN satélite centromérico de los Pleuronectiformes como marcador filogenético. Para este último objetivo estamos caracterizando otros ADN satélites no centroméricos también existentes en sus genomas.

Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias al Proyecto Pleurogene, con fondos de Genoma España, y al proyecto INIA RTA2005-00215-c03.

Utilización de familias multigénicas para la diferenciación de especies de interés en Acuicultura

Merlo M.A., Pacchiarini T., Sánchez-Ramos I., Chairi H., Cross I. y Rebordinos L.

Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, 11510-Puerto Real,
Cádiz
laureana.rebordinos@uca.es

Las familias multigénicas han sido frecuentemente utilizadas para la caracterización citogenética de organismos marinos. El uso de estas familias como sondas FISH, podría ser especialmente importante al tratar con especies de interés en acuicultura, ya que podría tener una aplicabilidad en la diferenciación de especies.

En nuestro laboratorio hemos localizado diferentes familias multigénicas y secuencias altamente repetidas en distintas especies de peces y moluscos marinos de diverso interés. Recientemente, se ha localizado familias multigénicas, como el 5S rDNA, 45S rDNA y U2 snRNA, en pez sapo (*Halobatrachus didactylus*), sargo (*Diplodus sargus*), pargo (*Pagrus pagrus*), urta (*Pagrus auriga*) y pagurta (híbrido interespecífico entre estas dos últimas especies).

El sargo, pargo y urta son especies de la familia Sparidae muy apreciadas comercialmente en Andalucía, y que han sido calificadas como prioritarias para la diversificación de la producción en acuicultura. El pez sapo pertenece a la familia Batrachoididae, contrarresta su escaso interés comercial con su elevado interés científico, ya que peces de esta familia han sido calificados como animales modelos en estudios de muy diversos tipos, como la endocrinología, cardiología e inmunoquímica entre otros. Por otro lado, comercialmente tiene interés para evitar la venta fraudulenta como rape.

El 5S se localizó en una sola pareja submetacéntrica en *H. didactylus*, mientras que en *D. sargus* se encontraba en dos parejas acrocéntricas. Adicionalmente, el 45S hibridó en la pareja submetacéntrica de *P. pagrus*, *P. auriga* y pagurta; mientras que en *D. sargus* lo hizo hasta en tres parejas acrocéntricas. Por último, el U2 se encontró en posición subcentromérica de una pareja acrocéntrica en las especies *P. pagrus*, *P. auriga* y pagurta, mientras que en *H. didactylus* ocupaba una posición subtélomérica de una pareja subtélomérica. Los resultados obtenidos con cada sonda presentan variabilidad entre las especies estudiadas, tanto en el número de señales de hibridación como en la posición de las mismas, características las cuales nos podrían permitir diferenciar citogenéticamente entre especies, y ser la base para la creación de un mapa físico y su posible relación con mapas de ligamiento.

Agradecimientos: Algunas de las muestras utilizadas en el trabajo han sido amablemente cedidas por el centro **IFAPA “El Toruño”**.

Desarrollo de una técnica basada en la amplificación de señal, TSA-FISH, para la localización de genes de copia única en organismos marinos

Sánchez-Ramos I.⁽¹⁾, Cross I. ⁽¹⁾, Rubio M. ⁽¹⁾, Guzmán J.M. ⁽²⁾, Merlo M.A. ⁽¹⁾, Ortiz-Delgado J.B. ⁽³⁾, Mañanos E. ⁽²⁾, Sarasquete C. ⁽³⁾ y Rebordinos L.⁽¹⁾.

(1) Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, 11510-Puerto Real, Cádiz

(2) Instituto de Acuicultura Torre la Sal, CSIC. 12595-Cabanes, Castellón

(3) Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC. 11510-Puerto Real, Cádiz
laureana.rebordinos@uca.es

La aplicación de la técnica FISH a la localización de familias multigénicas y ADN repetido ha permitido desarrollar marcadores cromosómicos con utilidad en caracterización e identificación de poblaciones y especies de peces. Para completar la descripción cromosómica de una especie hay que incluir la localización de genes de copia única, mucho más complicado por otra parte, desde el punto de vista técnico. Sin embargo, la posibilidad de localizar estos genes, tiene mucho interés para la consecución de diferentes objetivos: 1) elaborar mapas físicos detallados de genoma de organismos marinos de interés científico-económico y relacionarlos con datos de mapas de ligamiento; 2) localizar genes de interés para la investigación básica o aplicada y 3) detectar reorganizaciones cromosómicas en los que estén implicados estos genes.

La técnica conocida como amplificación de la señal con tiramida para la Hibridación *in situ* de Fluorescencia (TSA-FISH) permite mediante una aproximación novedosa, amplificar cientos de veces la débil señal de hibridación de sondas de pequeño tamaño. En este trabajo se presentan los primeros resultados llevados a cabo por nuestro laboratorio aplicando esta técnica para la localización de genes de copia única en dos especies de peces de alto valor económico como la dorada (*Sparus aurata*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). En la dorada, los genes localizados fueron la hormona de crecimiento y la miostatina, de alto interés en producción por su relación con el crecimiento. En el caso del lenguado, se utilizaron sondas de genes con interés en la fisiología reproductiva, en concreto genes codificantes de gonadotrofinas, implicados en la producción y liberación de gametos durante la reproducción y otros implicados en el metabolismo central durante el desarrollo y en la metamorfosis.

Se han utilizado dos aproximaciones basadas en el origen de la sonda, en una de ellas las sondas fueron de cDNA y en la otra sondas de DNA genómico. Los resultados previos muestran una gran diferencia en cuanto al uso de ambas sondas, y aunque los primeros resultados obtenidos han puesto de manifiesto la alta capacidad de detección de esta técnica, se discutirán los inconvenientes detectados hasta el momento durante la puesta a punto de la misma.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos AGL2006-13777-C03-01-02.

**P
A
R
T
I
C
I
P
A
N
T
E
S**

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

- Clara Goday Baylina rcgba002@cib.csic.es
- M^a del Carmen Escribá Pérez maespe24@hotmail.com

Chromosomenstruktur/-funktion. IPK- Alemania

- Andreas Houben houben@ipk-gatersleben.de

Instituto Agricultura Sostenible (CSICV) Córdoba

- Antonio Martín Muñoz ge1mamua@uco.es
- Azahara Carmen Martín Ramírez A62maraa@uco.es
- Pilar Prieto Aranda L52prarm@uco.es

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria –INIA- Madrid

Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos

- Raúl Sánchez Sánchez raulss@inia.es

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)

- Ana Rodríguez Velasco rodvelan@itacyl.es

Universidad de Alcalá de Henares

Departamento de Biología Celular y Genética

- Ángeles Cuadrado Bermejo angeles.cuadrado@uah.es
- Nicolás Jouvé de la Barreda nicolas.jouve@uah.es
- Ruth Pérez Vargas ruth.perez@uah.es

Universidad Autónoma de Barcelona

Departament de Genètica i de Microbiologia

- Carlos Fernando Prada Quiroga biofer@lycos.com
- Alejandra del Prat Obeaga alejandra.Delprat@uab.cat
- Alfredo Ruiz Panadero Alfredo.ruiz@uab.es

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología, Unidad de Genética

- Jonás Sarasa Marcuello jonas.sarasa@uam.es
- José Luis Bella Sombría bella@uam.es

Universidad de Barcelona
Departamento de Genética

- Pedro Araúz Leones pedroargon@hotmail.com

Universidad de Cádiz
Área de Genética

- Laureana Rebordinos González laureana.rebordinos@uca.es
- Ismael Cross Pacheco ismael.cross@uca.es
- Irma Sánchez Ramos irma.sanchezramos@uca.es
- Manuel Alejandro Merlo Torres alejandro.merlo@uca.es
- Hicham Chairi hicham.chairi@uca.es
- Mercedes Rubio Martínez mercedes.rubioma@alum.uca.es
- Tiziana Pacchiarini tiziana.pacchiarini@alum.uca.es
- Isabel Hernández Paz isabel.hernandezpaz@alum.uca.es

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Genética

- María Cuacos Marcos m_cuacos@hotmail.com
- M^a Jesús Puertas Gallego majetas@bio.ucm.es
- Miriam González García miriamgo@bio.ucm.es
- Mónica Pradillo Orellana pradillo@bio.ucm.es
- Mónica Sánchez González majetas@bio.ucm.es

Universidad de Córdoba
Departamento de Genética

- Adoración Cabrera Caballero ge1cabca@uco.es
- Mahmoud Ali-Said Ibrahim mahmoudeldeeb@yahoo.co

Universidad de Granada
Departamento de Genética

- Dolores López León mdlopez@ugr.es
- Eugenia Montiel Jiménez eemontiel@ugr.es

- Josefa Cabrero Hurtado jcabrero@ugr.es
- Juan Pedro Martínez Camacho jpmcamac@ugr.es
- Manuel Ruiz Rejón mrejon@ugr.es
- María Teruel Artacho mteruel@ugr.es
- Roberto de la Herrán Moreno rherran@ugr.es

Universidad de Jaén

Departamento de Biología Experimental, Área de Genética

- Antonio Sánchez Baca abaca@ujaen.es
- Juan Alberto Marchal Ortega jamaor@ujaen.es
- Pedro Lorite Martínez plorite@ujaen.es
- Teresa Palomeque Messía tpalome@ujaen.es
- M^a Carmen García García mggarcia@ujaen.es
- Mónica Bullejos Martín bullejos@ujaen.es

Universidad de Vigo

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología

- Concepción Pérez García cpegar@uvigo.es

