



Universitat Autònoma de Barcelona



Departament de Genètica i de Microbiologia
Facultat de Ciències

**EVOLUCIÓ CROMOSÒMICA A *DROSOPHILA*:
PAPER DELS ELEMENTS TRANSPOSABLES**

**Ferran Casals López
Bellaterra, abril de 2003**



Universitat Autònoma de Barcelona



**Departament de Genètica i de Microbiologia
Facultat de Ciències**

**EVOLUCIÓ CROMOSÒMICA A *DROSOPHILA*:
PAPER DELS ELEMENTS TRANSPOSABLES**

**Ferran Casals López
Bellaterra, abril de 2003**

Memòria presentada pel Llicenciat en
Biologia Ferran Casals López per a
l'obtenció del títol de Doctor en Ciències
Biològiques.

Bellaterra, 4 d'abril de 2003.

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

Certifica que: en Ferran Casals López ha
realitzat sota la seva direcció el treball de
recerca dut a terme al Departament de
Genètica i de Microbiologia de la Facultat
de Ciències de la Universitat Autònoma de
Barcelona que ha conduït a l'elaboració de
la Tesi Doctoral titulada *Evolució
cromosòmica a Drosophila: paper dels
elements transposables*.

Dr. Alfredo Ruiz Panadero.

als meus pares

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 L'organisme model <i>Drosophila</i>	4
1.2 El genoma de <i>Drosophila</i>	5
1.2.1 El cariotip de <i>Drosophila</i>	7
1.3 Les inversions cromosòmiques	9
1.3.1 Caràcter adaptatiu de les inversions cromosòmiques	11
1.3.2 Evolució cromosòmica	12
1.3.3 La cartografia comparativa	12
1.3.4 Taxes d'evolució cromosòmica a <i>Drosophila</i>	14
1.3.5 Segments cromosòmics conservats durant l'evolució	16
1.4 Origen de les inversions cromosòmiques	17
1.4.1 La recombinació ectòpica	17
1.4.2 Elements transposables i reordenacions cromosòmiques	19
1.4.3 Elements transposables i inversions naturals	20
1.5 Els elements transposables	21
1.5.1 Classificació dels elements transposables	22
1.5.1.1 Elements transposables de classe I	22
1.5.1.2 Elements transposables de classe II	23
1.5.1.3 Elements transposables de tipus <i>Foldback</i>	23
1.5.2 Els elements transposables de <i>D. melanogaster</i>	24
1.5.3 Els elements transposables de <i>D. buzzatii</i>	25
1.6 El grup <i>repleta</i> de <i>Drosophila</i>	26
1.7 Objectius	31
2. MATERIAL I MÈTODES	33
2.1 Soques	35
2.2 Protocols experimentals	36
2.2.1 Extraccions de DNA	36
2.2.1.1 Extracció de DNA d'adults de <i>Drosophila</i>	36
2.2.1.2 Extracció de DNA de clons	37
a) Plasmidis	37
b) Cosmidis	39

c) Bacteriòfags P1	39
d) Bacteriòfags λ	39
e) YACs	40
2.2.1.3 Extracció de DNA d'una banda de gel d'electroforesi	42
2.2.2 Clonació de fragments de DNA	43
2.2.2.1 Lligació	44
2.2.2.2 Transformació	44
Obtenció de cèl·lules competents	44
2.2.3 <i>Southern blotting</i>	45
2.2.3.1. Transferència del DNA a la membrana	45
2.2.3.2 Prehibridació i hibridació	47
2.2.3.3 Posthibridació i detecció	47
2.2.3.4 Marcatge de les sondes	48
2.2.4 Hibridació <i>in situ</i>	48
2.2.4.1 Preparacions cromosòmiques	48
a) Tractament dels portaobjectes	49
b) Siliconitzat dels cobreobjectes	50
2.2.4.2 Sondes	50
2.2.4.3. Marcatge de les sondes	52
a) <i>Nick translation</i>	52
b) <i>Random primer</i>	53
2.2.4.4 Prehibridació i detecció	53
2.2.4.5 Posthibridació i revelat	54
2.2.4.6 Localització dels senyals d'hibridació	55
2.2.4.7 Localització dels marcadors sobre la seqüència de <i>D. melanogaster</i>	55
2.2.5 Genoteques	56
2.2.5.1 Construcció	56
a) Digestió del DNA genòmic	56
b) Lligació i empaquetament	57
2.2.5.2 Amplificació	57
2.2.5.3 Rastreig	58
Recuperació dels fags positius i preparació de llisats	59
2.2.6 PCR	60

2.2.7 Seqüenciació de DNA	62
2.3 Anàlisi de les dades	62
2.3.1 Estima de les taxes d'evolució cromosòmica	62
2.3.2 Anàlisi de seqüències nucleotídiques	63
2.3.3 Distribució cromosòmica dels elements transposables	63
2.3.4 Associació entre elements transposables i punts de trencament d'inversions cromosòmiques	63
3. RESULTATS	65
3.1 Cartografia física de marcadors procedents de quatre regions cromosòmiques del braç 3R de <i>D. melanogaster</i> a <i>D. repleta</i> i <i>D. buzzatii</i>	67
3.1.1 Hibridacions control	68
3.1.2 Hibridacions heteròlogues	69
3.1.2.1 Hibridacions heteròlogues positives	69
3.1.2.2 Hibridacions heteròlogues negatives	69
3.1.3 Organització molecular de les regions cromosòmiques 83E1-84E1, 86A4-E2 i 97B1-E6 a <i>D. repleta</i> i <i>D. buzzatii</i>	73
3.1.3.1 Regió 83E1-84E1	74
3.1.3.2 Regió 86A4-E2	74
3.1.3.3 Regió 97B1-E6	74
3.1.4 Cartografia dels punts de trencament de les inversions $2q^7$ i $2z^3$	76
3.1.4.1 Localització de sondes de la regió 21A-C de <i>D. virilis</i> a <i>D. buzzatii</i>	79
3.2 Clonació i seqüenciació dels punts de trencament de la inversió $2q^7$ de <i>D. buzzatii</i>	83
3.3 Abundància i distribució cromosòmica dels elements transposables a <i>D. buzzatii</i>	97
3.3.1 Obtenció de les sondes dels elements transposables	98
3.3.2 <i>Southern blotting</i>	100
3.3.3 Hibridació <i>in situ</i>	100

4. DISCUSSIÓ	113
4.1 Homologies cromosòmiques entre <i>D. melanogaster</i> i les espècies del grup <i>repleta</i>	115
4.1.1 Homologies cromosòmiques entre <i>D. repleta</i> i <i>D. buzzatii</i>	115
4.1.2 Eficiència dels marcadors utilitzats	116
4.2 Evolució cromosòmica a <i>Drosophila</i>	118
4.2.1 Distribució dels punts de trencament en el cromosoma	120
4.2.2 Taxes d'evolució cromosòmica	120
4.2.3 Segments cromosòmics conservats durant la divergència entre <i>D. melanogaster</i> i el grup <i>repleta</i>	124
4.3 Origen de les inversions naturals a <i>Drosophila</i>	127
4.3.1 Mecanismes de generació d'inversions cromosòmiques per elements transposables	128
4.3.2 Origen de la inversió $2q^7$ de <i>D. buzzatii</i>	130
4.3.3 Inestabilitat genètica als punts de trencament de les inversions	134
4.3.4 Inestabilitat genètica i elements <i>Foldback</i>	135
4.4 Abundància i distribució dels elements transposables	138
4.4.1 Taxes de recombinació i elements transposables	140
4.4.2 Inversions cromosòmiques i elements transposables	142
4.4.3 Associació entre els elements transposables	150
5. CONCLUSIONS	155
6. REFERÈNCIES	161
7. ANNEXOS	195
Annex 1	197
Annex 2	209
Annex 3	212

1. INTRODUCCIÓ

La variabilitat és la matèria primera de l'evolució. La selecció natural actua sobre ella, escollint les varietats millor adaptades a cada ambient. El primer nivell de diversitat és la variabilitat genètica, i per tant és l'origen de la biodiversitat. La font primària de variació genètica és la mutació, canvis estables i heredables del material genètic, que contínuament introdueix noves varietats a les poblacions. La majoria de les noves varietats introduïdes per la mutació són eliminades, però algunes d'elles sobreviuen i poden arribar a incorporar-se a tots els individus de la població.

La variabilitat genètica pot ser deguda a canvis nucleotídics, que afecten a un sol o pocs nucleòtids, o a canvis cromosòmics. Els canvis cromosòmics són variacions en el número o en l'estructura dels cromosomes. Els canvis numèrics es subdivideixen en aneuploidies, quan afecten a un o pocs cromosomes (monosomies, trisomies), i euploidies, quan afecten a tota la dotació cromosòmica o cariotip (haploidies, poliploidies). Aquests canvis són habituals entre diferents espècies, mentre que dins d'una mateixa espècie el nombre de cromosomes se sol mantenir constant. Els canvis estructurals inclouen les delecions, duplicacions, inversions i translocacions de fragments cromosòmics. Aquests canvis es troben sovint entre els cariotips de diferents espècies i, en alguns casos, entre individus de la mateixa espècie.

Tot i l'alt nombre de reordenacions cromosòmiques que s'han descrit a diferents organismes, encara es desconeix amb exactitud quin és el seu ritme de fixació i el mecanisme que les origina. Un dels organismes més utilitzat en els estudis sobre reordenacions cromosòmiques és *Drosophila*. A diferents estudis s'ha proposat que els elements transposables poden generar reordenacions cromosòmiques. Concretament, s'ha demostrat varies vegades la capacitat dels elements transposables de generar inversions cromosòmiques a poblacions de laboratori (resumit a Lim i Simmons 1994), però encara existeixen molt poques evidències a favor d'aquest paper a les poblacions naturals.

En aquest treball es pretén estimar amb quina freqüència es fixen i com es produeixen les inversions paracèntriques (les que no inclouen el centròmer) al gènere *Drosophila*. En primer lloc s'ha calculat quina és la taxa de fixació d'inversions entre les espècies *D. melanogaster* i dues espècies del grup *repleta* (*D. repleta* i *D. buzzatii*), que van divergir de *D. melanogaster* fa 40-62 milions d'anys (Beverly i Wilson 1984; Russo *et al.* 1995). Per fer-ho s'ha analitzat l'organització molecular de tres regions cromosòmiques de *D. melanogaster* a les dues espècies del grup *repleta*. Posteriorment s'ha estudiat quin és el mecanisme que origina les inversions a les poblacions naturals.

Anteriorment, s'havia demostrat que una inversió polimòrfica de *D. buzzatii* es va originar per recombinació ectòpica entre dues còpies d'un element transposable. A més, els punts de trencament de la inversió són punts calents d'insercions d'elements transposables i mostren una gran inestabilitat genètica (Cáceres *et al.* 1999b; 2001). Per comprovar el caràcter general o excepcional d'aquests resultats s'han caracteritzat molecularment els punts de trencament d'una altra inversió polimòrfica de la mateixa espècie. S'ha establert l'edat de la inversió i el mecanisme que la va originar. Finalment s'ha estudiat la distribució cromosòmica dels elements transposables a *D. buzzatii*. L'anàlisi dels resultats ha permès establir quins són els principals factors que influeixen en la localització dels elements transposables, així com la seva relació amb les inversions cromosòmiques.

1.1 L'organisme model *Drosophila*

La mosca de la fruita o del vinagre, *Drosophila melanogaster*, és un dels organismes eucariotes multicel·lulars més estudiats per la Biologia. El seu temps de generació curt, l'alt nombre de descendents, l'existència d'un alt nombre de mutacions fenotípiques fàcilment identificables, la presència de cromosomes politènics en alguns teixits, o el baix cost econòmic que suposa el seu manteniment, fan que sigui un organisme ideal per als estudis de Genètica. Els primers treballs amb *D. melanogaster* els va realitzar Thomas H. Morgan, que a l'any 1910 va demostrar experimentalment l'associació entre els factors hereditaris i els cromosomes. L'any 1913 A. H. Sturtevant va obtenir el primer mapa genètic, format per sis marcadors del cromosoma X. Posteriorment es van cartografiar molts altres gens, tan als cromosomes sexuals com als autosomes. Al mateix temps es van descobrir altres fenòmens com les interaccions entre gens o l'existència d'anomalies cromosòmiques. Els gairebé 100 anys d'investigació han fet que el gènere *Drosophila* sigui un dels millors caracteritzats molecularment, i existeixi una gran quantitat d'informació sobre gens, al·lels, mutacions, cariotips i alteracions cromosòmiques (Merriam *et al.* 1991; Kafatos *et al.* 1991; Lindsley i Zimm 1992; Hartl i Lozovskaya 1995; Spradling *et al.* 1995; Louis *et al.* 1997; Flybase), així com la possibilitat de disposar de genoteques de gens, cosmidis, bacteriòfags P1 i cromosomes artificials de llevat (YAC) procedents de diversos projectes de cartografia

física que s'han dut a terme (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Ajioka *et al.* 1991; Smoller *et al.* 1991; Hartl *et al.* 1994; Cai *et al.* 1994; Madueño *et al.* 1995). Finalment, l'any 2000 es va publicar la seqüència del genoma de *D. melanogaster* (Adams *et al.* 2000).

Drosophila també és un organisme ideal per desenvolupar estudis sobre reordenacions cromosòmiques. En aquest gènere s'ha descrit un nombre molt alt d'inversions cromosòmiques polimòrfiques (dins de les espècies) i fixades entre les diferents espècies (Powell 1997). A més, la presència de cromosomes politènics a les glàndules salivals en el tercer estadi larval (Sorsa 1988) facilita aquests estudis. Aquests cromosomes són el resultat d'un procés d'endorreduplicació, on cada cromosoma es replica 10 o més vegades, depenent del teixit i de l'espècie (Lewin 1994). El nivell de resolució és molt superior al dels cromosomes metafàsics, utilitzats en els estudis d'altres organismes eucariotes.

1.2 El genoma de *Drosophila*

El genoma de *D. melanogaster* té una mida de 176 Mb (Adams *et al.* 2000; Hoskins *et al.* 2003). És un genoma relativament petit quan es compara amb el d'altres eucariotes, i representa aproximadament un 6% del genoma humà (3000 Mb). Dins del gènere *Drosophila* s'han descrit diferents mides del genoma: 313 Mb a *D. virilis* (John i Miklos 1988), 212 Mb a *D. hydei* (Laird 1973), 220 Mb a *D. arizonensis* (Schulze i Lee 1986), i 119 Mb a *D. simulans* (Powell 1997). La mida del genoma varia entre 240-290 Mb dins del gènere *Anopheles*, i a la majoria de famílies de dípters la mida és igual o més gran (Holt *et al.* 2002). Aquestes diferències es deuen a diferències en el contingut de DNA repetitiu (Dowsett i Young 1982) o a una pèrdua de DNA no codificant (Moriyama *et al.* 1998; Holt *et al.* 2002).

El genoma de *Drosophila* té una estructura heterogènia. La primera evidència d'aquest fet van ser els diferents graus de tinció que presentaven diferents zones dels cromosomes. Unes regions es tenyeixen intensament (l'heterocromatina) i altres més dèbilment (l'eucromatina). La majoria dels gens es troben a l'eucromatina, que es caracteritza per estar relaxada en interfase i es replica durant la politenització dels cromosomes. L'heterocromatina està més condensada durant el cicle cel·lular, s'hi

produeix una repressió de la transcripció (Hennig 1999), i es replica més tard que l'eucromatina. En els autosomes la major part de l'heterocromatina es troba a les regions centromèriques, mentre que aproximadament la meitat del cromosoma X i tot el cromosoma Y es consideren heterocromàtics (Figura 1). L'heterocromatina es divideix en α - i β -heterocromatina. L' α -heterocromatina es localitza a les regions pericentromèriques i el seu component principal és el DNA satèl·lit. També conté elements transposables i gens que codifiquen RNA ribosòmic. La β -heterocromatina es troba a les zones de transició entre l' α - heterocromatina i l'eucromatina, i principalment està formada per elements transposables (Koryakov *et al.* 1999).

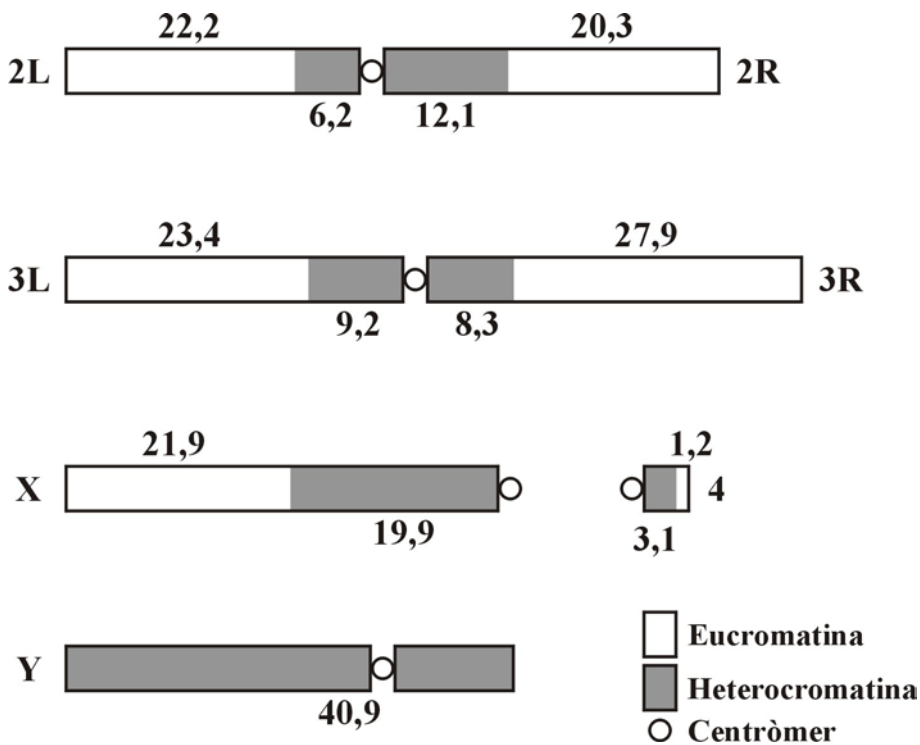


Figura 1. Estructura dels cromosomes de *D. melanogaster* (Hoskins *et al.* 2002). La mida de la regió eucromàtica i heterocromàtica de cada cromosoma s'expressa en Megabases. La mida de la fracció eucromàtica prové de la seqüència eucromàtica publicada (Release 3) (Celniker *et al.* 2002). La mida de la fracció heterocromàtica prové de mesures de cromosomes mitòtics (Yamamoto *et al.* 1990). La mida de la fracció eucromàtica del cromosoma X varia entre un terç i la meitat del cromosoma, segons la soca analitzada.

Des del punt de vista molecular el genoma de *Drosophila* també és molt heterogeni, i es pot dividir en tres components principals segons el grau de repetició de les seqüències: DNA altament repetitiu, DNA moderadament repetitiu, i DNA de seqüència única (Powell 1997). La major part del DNA altament repetitiu consisteix en seqüències senzilles repetides de milers a milions de vegades, sovint anomenades DNA satèl·lit, que ocupen el 25 % del genoma i es localitzen majoritàriament a l'heterocromatina. El DNA moderadament repetitiu representa el 15 % del genoma, i està format per seqüències repetides des de deu fins a centenars de vegades. La major part d'aquest DNA són elements transposables, i es troba tant a l'heterocromatina com a l'eucromatina. També formen part del DNA moderadament repetitiu les repeticions en tàndem dels gens de les histones i els RNA ribosòmics (Ashburner 1989). El DNA de seqüència única es troba quasi exclusivament a l'eucromatina, i conté la part funcionalment més important del genoma: els gens i les seqüències necessàries per a la seva regulació (Ashburner 1989). En la primera anàlisi de la seqüència de *D. melanogaster* es van identificar 13.601 gens, amb una mida mitja dels trànscrips de 3.058 pb, obtenint-se una densitat d'un gen cada 9 kb. El número mig d'exons i introns per a cada gen és de 4 i 3 respectivament. Aquestes estimes són valors mínims, ja que sistemàticament es produeix una predicció errònia de les regions 5' i 3' dels gens. També s'ha descrit la presència d'alguns gens a l'heterocromatina (Adams *et al.* 2000; Hoskins *et al.* 2003). El número de gens identificats a altres genomes d'organismes eucariotes seqüenciats és 6.144 a *S. cerevisiae*, 13.683 a *A. gambiae*, 18.266 a *C. elegans*, 25.498 a *A. thaliana*, i ~32.000 als humans (Adams *et al.* 2000; The Arabidopsis Genome Initiative 2000; Lander *et al.* 2001; Holt *et al.* 2002).

1.2.1 El cariotip de *Drosophila*

El cariotip de *D. melanogaster* està format per dos autosomes metacèntrics (els cromosomes 2 i 3, de 60,8 i 68,8 Mb respectivament), un autosoma acrocèntric petit (el cromosoma 4, de 4,3 Mb), un cromosoma X acrocèntric (41,8 Mb) i un cromosoma Y submetacèntric (40,9 Mb) (Figura 1) (Hoskins *et al.* 2003). El número haploide de cromosomes varia dins del gènere *Drosophila* entre tres i sis, però s'ha conservat el nombre de braços cromosòmics, de manera que el cariotip de la majoria d'espècies del gènere es pot obtenir a partir de fusions i fissions centrals entre aquests braços o elements cromosòmics (Clayton i Guest 1986). Al subgènere *Drosophila* predominen

les espècies amb sis cromosomes, mentre que al subgènere *Sophophora* la majoria d'espècies en tenen 4 (Powell 1997). La comparació del patró de bandes, mapes genètics i mapes físics ha permès determinar les homologies cromosòmiques entre moltes espècies dels gènere. S'ha establert una nomenclatura que permet relacionar els cariotips de les diferents espècies. Així, l'element cromosòmic A es correspon amb el cromosoma X de *D. melanogaster*, els elements B i C amb els braços 2L i 2R del cromosoma 2, els elements D i E amb els braços 3L i 3R del cromosoma 3, i l'element F amb el cromosoma 4 (Muller 1940). A la Taula 1 es mostra la correspondència entre els braços cromosòmics d'algunes espècies de *Drosophila* (Powell 1997).

Taula 1. Homologies cromosòmiques entre algunes espècies del gènere *Drosophila*.

	Element de Muller					
	A	B	C	D	E	F
<i>D. melanogaster</i> ^a	X	2L	2R	3L	3R	4
<i>D. subobscura</i> ^a	A	U	E	J	O	D
<i>D. pseudoobscura</i> ^a	XL	4	3	XR	2	5
<i>D. virilis</i> ^b	X	4	5	3	2	6
<i>D. repleta</i> ^b	X	3	5	4	2	6
<i>D. hydei</i> ^b	X	4	3	5	2	6

^a Subgènere *Sophophora*. ^b Subgènere *Drosophila*. Les homologies de *D. buzzatii* són les mateixes que les descrites a *D. repleta* (Schaffer *et al.* 1993).

El cariotip ancestral de *Drosophila* estava format per cinc cromosomes acrocèntrics i un cromosoma puntiforme (l'element F). L'organització del cariotip a les espècies actuals es pot explicar amb la fusió d'alguns dels braços cromosòmics (Figura 2) (Powell i DeSalle 1997). S'ha calculat que durant l'evolució del gènere s'han fixat 58 fusions o fissions cèntriques, 3 translocacions i 32 inversions pericèntriques. Però el canvi cromosòmic més freqüent són les inversions paracèntriques (apartat 1.3).

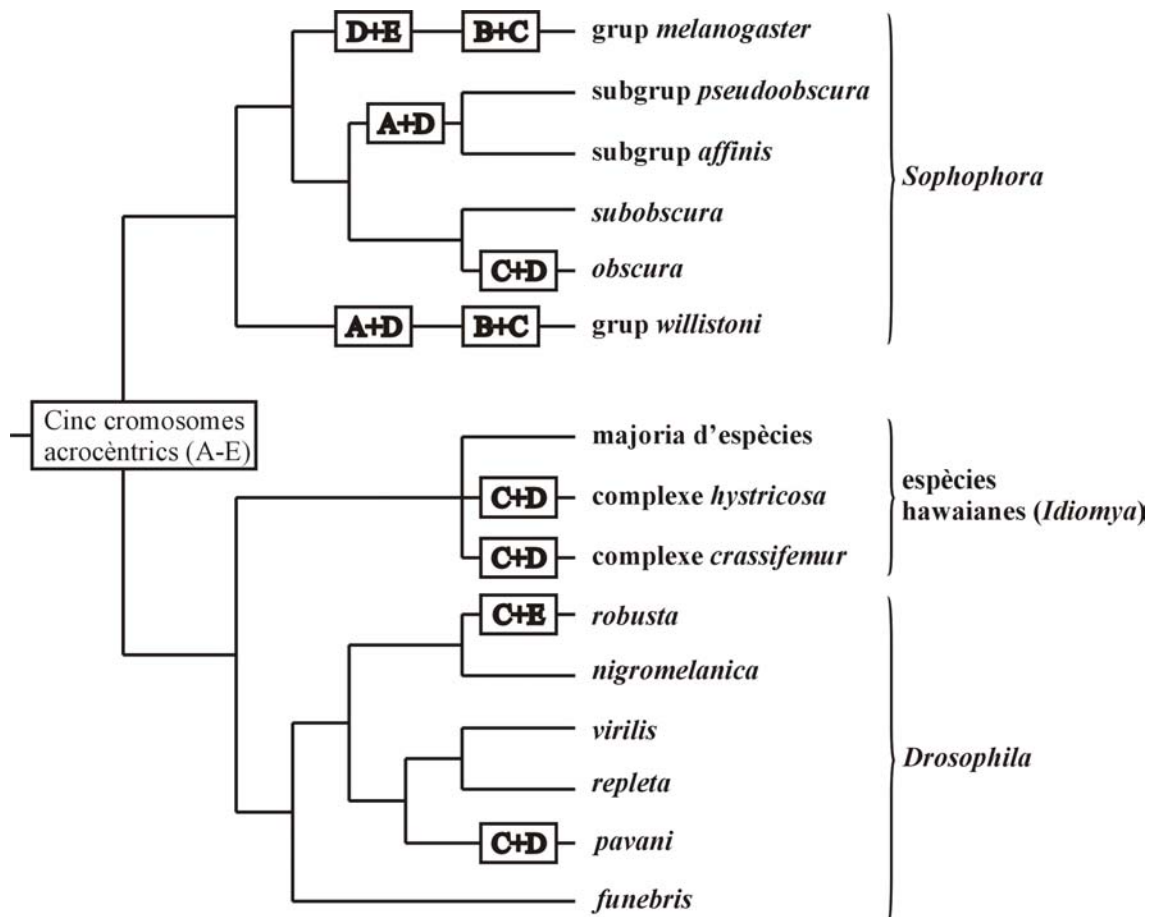


Figura 2. Organització dels elements cromosòmics a la filogènia del gènere *Drosophila* (s'exclou l'element F) (Powell i DeSalle 1995). Considerant un cariotip ancestral organitzat en cinc cromosomes acrocèntrics, en la reconstrucció més parsimoniosa només són necessàries les fusions cèntriques per explicar els diferents cariotips observats en el gènere.

1.3 Les inversions cromosòmiques

Els estudis cromosòmics realitzats a poblacions naturals de diferents espècies van revelar que les inversions paracèntriques són el canvi citològic més freqüent dins del gènere *Drosophila* (Sperlich i Pfriem 1986; Krimbas i Powell 1992; Powell 1997). Aproximadament dos terços de les espècies estudiades presenten inversions en els seus cromosomes, i s'ha calculat que dins del gènere hi ha entre 18.000 i 28.000 inversions polimòrfiques i entre 22.000 i 56.000 inversions fixades entre diferents espècies (Stone *et al.* 1960).

Les inversions polimòrfiques no es distribueixen uniformement entre les diferents espècies de *Drosophila*. Algunes espècies mostren un nombre molt alt

d'inversions, mentre que altres espècies són monomòrfiques. La Taula 2 mostra el grau de polimorfisme a tres subgèneres de *Drosophila*. Al subgènere *Sophophora* predominen les espècies polimòrfiques (95 %), mentre que als subgèneres *Drosophila* i *Idiomya* les espècies polimòrfiques i monomòrfiques es troben en proporcions similars. El nombre d'inversions polimòrfiques de cada espècie també és més alt al subgènere *Sophophora* (Sperlich i Pfriem 1986).

Taula 2. Número d'espècies polimòrfiques per inversions naturals.

Subgènere	Espècies polimòrfiques	Espècies monomòrfiques
<i>Drosophila</i>	41	44
<i>Sophophora</i>	38	2
<i>Idiomya</i>	27	31
Total	106	77

Només s'han inclòs les espècies amb 10 o més soques independents analitzades (Powell 1997).

La presència d'una inversió cromosòmica en heterozigosi provoca que si es produeixen entrecreuaments en la regió inclosa en la inversió la meitat dels productes de la meiosi siguin aberrants (cromosomes acèntrics, dicèntrics, portadors de duplicacions i deficiències) (Navarro *et al.* 1997). Les inversions provocarien una reducció de la fertilitat en els individus heterozigots, i per tant existiria una selecció contra el polimorfisme d'inversions (Sperlich i Pfriem 1986). Però a *Drosophila* això no succeix, degut a dos motius. En primer lloc, a la majoria d'espècies no es produeix recombinació durant l'espermatogènesi, i per tant els mascles no veuen reduïda la seva fertilitat (White 1973). En segon lloc, a les femelles només un dels quatre productes meiòtics s'incorpora al pronucli que constituirà l'òvul funcional, mentre que la resta s'incorporen als corpuscles polars. Degut a la menor mobilitat dels fragments acèntrics i dicèntrics, les cromàtides no recombinants són les que s'incorporen al pronucli (Sturtevant i Beadle 1936; Carson 1946). Això fa que a *Drosophila* les inversions cromosòmiques es trobin amb una freqüència més elevada que altres canvis cromosòmics.

1.3.1 Caràcter adaptatiu de les inversions cromosòmiques

Hi ha varies evidències que demostren el caràcter adaptatiu de les inversions cromosòmiques, el que afavoriria el seu manteniment a les poblacions naturals. En primer lloc, s'han dut a terme estudis amb caixes de poblacions a diferents espècies de *Drosophila*. En aquests experiments s'assoleixen polimorfismes d'inversions similars a partir de diferents freqüències inicials (Sperlich i Pfriem 1986). Aquests resultats suggereixen que les inversions es mantenen a les poblacions naturals per una selecció equilibradora degut a la superioritat dels heterocariotips (Sperlich i Pfriem 1986; Powell 1997). En segon lloc, s'han descrit variacions temporals i espacials regulars en les freqüències de les inversions a poblacions naturals. Algunes espècies de *Drosophila* mostren fluctuacions estacionals recurrents de les freqüències relatives de diferents ordenacions cromosòmiques (Sperlich i Pfriem 1986; Rodríguez-Trelles *et al.* 1996), i en alguns casos s'ha relacionat la distribució de les freqüències d'ordenacions cromosòmiques amb factors ambientals. Per exemple, les poblacions dels dos hemisferis de *D. melanogaster* presenten una distribució similar de les freqüències de quatre inversions seguint clines latitudinals (Lemeunier i Aulard 1992), i a *D. robusta* s'ha format clines altitudinals similars a diferents àrees muntanyoses (Levitan 1992).

Hi ha diferents teories que prediuen a què es deu aquest caràcter adaptatiu de les inversions cromosòmiques. En primer lloc, les inversions poden produir un efecte de posició sobre algunes seqüències. Les inversions provoquen un canvi en la localització física d'alguns gens, que podria ser beneficiós per als individus portadors de la inversió (Sperlich 1963). Aquest canvi de posició pot alterar l'expressió d'alguns gens, ja que pot canviar la seva posició respecte de les seves seqüències reguladores, i s'espera que sigui més important a les seqüències properes als punts de trencament. En segon lloc, les inversions redueixen la recombinació dins de la regió inclosa a la inversió als heterocariotips, degut a la no incorporació als gàmetes dels productes resultants o als problemes mecànics que apareixen en l'aparellament de les regions homòlogues (Coyne *et al.* 1993). D'aquesta manera dins de les inversions es poden mantenir certes combinacions d'al·lels favorables, ja que estan protegides de la recombinació (Krimbas i Powell 1992). Segons la teoria de la coadaptació aquestes ordenacions contenen conjunts d'al·lels que interaccionen espistàticament, que reben el nom de complexos gènics coadaptats (Charlesworth i Charlesworth 1973).

S'ha descrit una relació entre la mida de les inversions i la seva freqüència a poblacions naturals. Les inversions poc freqüents i endèmiques són habitualment

petites, mentre que les polimòrfiques i les fixades entre espècies mostren mides intermitges (Cáceres *et al.* 1997). La distribució geogràfica i la freqüència de les inversions són un reflex del seu èxit evolutiu, i per tant sembla que la selecció natural actua sobre la mida de les inversions afavorint les de mides intermitges (Powell 1997). A més, la mida mitja de les inversions més exitoses està relacionada amb la freqüència de recombinació a diferents espècies de dípters, existint una mida genètica òptima per les inversions (Cáceres *et al.* 1999a). Aquests fets suggereixen que el valor adaptatiu de les inversions es deu principalment al seu efecte de reducció de la recombinació.

1.3.2 Evolució cromosòmica

La comparació de la morfologia i el patró de bandes dels cromosomes politènics entre espècies properes ha permès determinar el nombre i el tipus de reordenacions cromosòmiques ocorregudes des del seu avantpassat comú, i elaborar filogènies cromosòmiques (Sturtevant i Dobzansky 1936; Wasserman 1963). Aquest tipus de comparació només ha estat possible entre espècies relativament properes, incloses en el mateix grup (Ashburner *et al.* 1982; Krimbas i Powell 1992), però no és possible entre espècies més allunyades filogenèticament que pertanyin a diferents grups. En aquest cas l'elevat nombre de canvis cromosòmics i en la morfologia dels cromosomes politènics dificulta l'establiment d'homologies entre els cromosomes o segments cromosòmics de diferents espècies (Stalker 1972). Per a aquests estudis és necessària la informació cartogràfica, procedent dels mapes genètics o de lligament i dels mapes físics.

1.3.3 La cartografia comparativa

La comparació dels mapes genètics o físics de dues espècies permet estimar el nombre de reordenacions fixades entre elles, així com la transferència d'informació des de les espècies millor caracteritzades a les menys estudiades. L'any 1913 Sturtevant va proposar que existia un ordre lineal entre els diferents marcadors situats al mateix cromosoma, que es podia establir utilitzant les freqüències de recombinació que es donaven entre ells (Sturtevant 1913, 1917). Els mapes genètics es varen realitzar en un principi determinant les relacions de lligament entre mutacions amb un efecte morfològic detectable, i posteriorment utilitzant diferents *loci* al·lozimics (Sturtevant i Novitsky 1941; Patterson i Stone 1952; Schaffer *et al.* 1993). La utilitat dels mapes

genètics per comparar l'organització molecular dels cromosomes entre diferents espècies es veu limitada per la dificultat d'aconseguir mutants i la possibilitat de que fenotips similars no estiguin controlats pel mateix gen en espècies diferents.

La tècnica de la hibridació *in situ* d'àcids nucleics sobre cromosomes politènics (Pardue *et al.* 1970) permet localitzar les seqüències homòlogues a les contingudes en clons recombinants, procedents de la mateixa o de diferents espècies, proporcionant dades sobre la localització, l'ordre i les distàncies entre gens. Segons Hartl *et al.* (1994) la resolució d'aquesta tècnica a *Drosophila* pot arribar fins als 50 kb. Aquesta elevada resolució i el nombre creixent de sondes de que es disposa han fet que la hibridació *in situ* hagi esdevingut una eina de gran utilitat en els estudis de cartografia comparada. La hibridació *in situ* ha permès confirmar les homologies cromosòmiques proposades per a diferents grups d'espècies i establir-ne algunes per primera vegada (Steinemann 1982; Steinemann *et al.* 1984; Loukas i Kafatos 1986; Whiting *et al.* 1989; Lozovskaya *et al.* 1993; Papaceit i Juan 1993). Aquesta tècnica també ha permès comparar l'organització molecular dels cromosomes entre diferents espècies de *Drosophila*, dins del mateix subgènere (Segarra i Aguadé 1992; Segarra *et al.* 1995, 1996; Vieira *et al.* 1997b, 1997c) o incloses a diferents subgèneres (Whiting *et al.* 1989; Lozovskaya *et al.* 1993; Ranz *et al.* 1997, 1998 ; Vieira *et al.* 1997b; González *et al.* 2000, 2002). La conclusió principal de tots aquests estudis és que els elements cromosòmics principals s'han conservat durant l'evolució del gènere, tot i que hi ha hagut un procés molt important de reorganització interna degut principalment a la fixació d'inversions paracèntriques. Per tant podem entendre els cromosomes de les espècies de *Drosophila* com un mosaic format amb fragments dels cromosomes de *D. melanogaster*, l'espècie de referència. Aquests fragments, conservats durant l'evolució, seran més petits en augmentar la distància filogenètica respecte de *D. melanogaster*.

1.3.4 Taxes d'evolució cromosòmica a *Drosophila*

Els estudis de cartografia comparada han permès estimar la taxa de fixació de canvis cromosòmics a *Drosophila*. La majoria de marcadors canvien la seva posició relativa en el cromosoma entre espècies allunyades filogenèticament, degut a la fixació d'inversions paracèntriques durant la seva divergència. Les estimes del nombre d'inversions fixades entre dues espècies s'han dut a terme bàsicament de dues maneres. En alguns estudis es compara l'organització de marcadors repartits per tot un cromosoma de l'espècie de referència amb la de les espècies estudiades, mentre que en els altres s'analitza el comportament de marcadors procedents d'una regió concreta de l'espècie de referència, i s'extrapola el comportament d'aquesta regió a la resta del cromosoma o del genoma.

La taxa de fixació d'inversions varia entre els diferents elements cromosòmics. Concretament, els elements cromosòmics A i E presenten una taxa d'evolució significativament més gran que la resta de cromosomes entre *D. melanogaster* i *D. repleta* (González *et al.* 2002). Les diferències en la presència d'inversions entre els diferents elements cromosòmics també s'havien descrit en estudis citològics. Per exemple, *D. pseudoobscura* presenta 34 inversions polimòrfiques al cromosoma 3, tres al cromosoma X i cap a la resta (Powell 1992). Als grups *repleta* (Taula 4, apartat 1.6) i *melanica*, el 70 % de les inversions s'acumulen a l'element E, i al subgènere *Idiomya* un 41 % de les inversions es troben també en aquest element cromosòmic (Tonzetich *et al.* 1988; Wasserman 1992). Per tant, el comportament d'un cromosoma pot ser no representatiu de la resta del genoma.

A la Taula 3 es mostren les taxes d'evolució de diferents elements cromosòmics obtingudes en alguns estudis. En algunes comparacions el número de marcadors utilitzats és bastant baix, i per tant l'estima pot estar allunyada del valor real. Per exemple, en els estudis de Vieira *et al.* (1997b) i Nurminsky *et al.* (1996) s'utilitzen 10 i 3 marcadors per analitzar el comportament de regions de 2 i 1,6 Mb respectivament. En les comparacions de l'organització de cromosomes sencers el nombre més alt de marcadors s'ha aconseguit a les comparacions entre *D. melanogaster* i *D. repleta* (Ranz *et al.* 2001; González *et al.* 2002). La taxa de fixació d'inversions que s'ha calculat per als diferents elements cromosòmics de *Drosophila* és molt superior a la calculada per altres organismes (Ranz *et al.* 2001).

Taula 3. Estimes de la taxa de fixació d'inversions a *Drosophila*.

Comparació	Temps div. (Ma)	Element cr.	Núm. marcadors	Inv./ Ma	Ref.
Tot el cromosoma					
<i>D. melanogaster-D. pseudoobscura</i>	30	A	32	0,97	(1)
<i>D. virilis-D. montana</i>	9	A	46	0,61	(2)
<i>D. virilis-D. novamexicana</i>	3,8	A	48	0,39	(2)
<i>D. montana-D. novamexicana</i>	9	A	46	0,61	(2)
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	A	81	0,95	(3)
<i>D. virilis-D. montana</i>	9	D	43	0,11	(2)
<i>D. virilis-D. novamexicana</i>	3,8	D	43	0,13	(2)
<i>D. montana-D. novamexicana</i>	9	D	43	0,17	(2)
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	D	79	0,45	(3)
<i>D. virilis- D. montana</i>	9	E	34	0,44	(4)
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	E	158	0,92	(5)
<i>D. virilis-D. repleta</i>	30	E	41	0,5	(6)
<i>D. virilis-D. buzzatii</i>	30	E	41	0,37	(6)
Regió cromosòmica					
<i>D. melanogaster-D. virilis</i>	40	A (2 Mb)	10	0,41	(4)
<i>D. melanogaster- D. virilis</i>	40	B (1,6 Mb)	3	0,17	(7)
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	B (1,9 Mb)	26	0,23	(8)
<i>D. melanogaster-D. repleta</i>	62	E (1,2 Mb)	41	1,08	(6)

(1) Segarra *et al.* 1995; (2) Vieira *et al.* 1997c; (3) González *et al.* 2002; (4) Vieira *et al.* 1997b; (5) Ranz *et al.* 2001; (6) Ranz *et al.* 1999; (7) Nurminsky *et al.* 1996; (8) González *et al.* 2000. Els temps de divergència són els utilitzats en cada estudi.

1.3.5 Segments cromosòmics conservats durant l'evolució

Tot i la gran reorganització cromosòmica que hi ha hagut durant l'evolució del gènere *Drosophila*, alguns segments cromosòmics s'han conservat entre les diferents espècies. Aquests fragments seran més grans entre les espècies properes i més petits a mesura que les espècies s'allunyen filogenèticament. La conservació de la seqüència de DNA entre diferents espècies sol indicar l'existència de restriccions funcionals. Això ha permès utilitzar aproximacions evolutives per identificar regions reguladores de gens (Maier *et al.* 1990; Hooper *et al.* 1992; Nurminsky *et al.* 1996). En alguns casos s'ha proposat que la conservació d'associacions gèniques entre espècies allunyades també pot estar deguda a l'existència de restriccions adaptatives o funcionals (Colombo *et al.* 1992; Maier *et al.* 1993; Randazzo *et al.* 1993; Ruddle *et al.* 1994; Stathakis *et al.* 1995; Wright 1996; Martínez-Cruzado *et al.* 1998). Però tot i que en algunes ocasions les associacions entre gens relacionats s'han conservat filogenèticament també s'han descrit casos on aquestes no es mantenen (Drosopoulou i Scouras 1995; von Allmen *et al.* 1996), o on s'ha conservat l'associació però no l'organització física (Hooper *et al.* 1992; Randazzo *et al.* 1993; Terol *et al.* 1995). En un altre cas s'ha proposat l'origen independent a *D. melanogaster* i *D. virilis* d'un *cluster* de gens (Vieira *et al.* 1997a).

La cartografia comparativa permet identificar segments evolutivament conservats entre les espècies que es comparen (Vieira *et al.* 1997b). Tot i això, quan es detecta un segment conservat no se sap si la conservació es deu a restriccions funcionals, que impedeixen que es fixin reordenacions que trenquin el segment, o si és el resultat del repartiment a l'atzar de les reordenacions cromosòmiques en el genoma (Nadeau i Taylor 1984; Vieira *et al.* 1997a). El nombre i la mida dels segments conservats identificats entre dues espècies també es pot utilitzar per estimar el nombre mínim de reordenacions fixades entre les dues espècies.

1.4 Origen de les inversions cromosòmiques

Tradicionalment s'ha considerat que les inversions sorgeixen per dos trencaments aleatoris i simultanis al mateix cromosoma seguits per la reunió dels extrems en orientació inversa. D'aquesta manera els punts de trencament de les inversions es repartirien a l'atzar per tot el cromosoma. La generació d'una inversió i el seu manteniment a la població són dos successos rars, i per tant és difícil que la mateixa inversió es fixi més d'una vegada. Per això s'ha considerat que les inversions són monofilètiques, és a dir, que tenen un origen únic (Krimbas i Powell 1992). El suposat caràcter monofilètic de les inversions fa que siguin un marcador molt útil per establir relacions filogenètiques entre espècies. El trencament del cromosoma s'atribuïa a tensions físiques o a l'acció d'agents mutagènics que produeixen lesions al DNA. Alguns experiments de laboratori demostren la capacitat de les radiacions ionitzants de produir trencaments i reordenacions cromosòmiques (Tonzetich *et al.* 1988).

A diferents estudis s'ha proposat la capacitat dels elements transposables de generar reordenacions cromosòmiques (Shapiro i Cordell 1982; Finnegan 1989; McDonald 1993). S'ha demostrat que les dues classes d'elements transposables poden produir deleccions, duplicacions, inversions i translocacions (Berg i Howe 1989) mitjançant diferents mecanismes moleculars.

1.4.1 La recombinació ectòpica

Un dels mecanismes proposats amb el que els elements transposables poden participar en la generació d'inversions cromosòmiques és la recombinació ectòpica (Petes i Hill 1988; Lim i Simmons 1994). La recombinació ectòpica o no al·lèlica es produeix entre seqüències homòlogues localitzades a diferents posicions del cromosoma, probablement per un mecanisme similar al de la recombinació al·lèlica que es dona entre els cromosomes homòlegs durant la meiosi (Virgin i Bailey 1998). La recombinació ectòpica pot donar lloc a diferents tipus de reordenacions, depenent de la localització i l'orientació de les seqüències en els cromosomes. A la Figura 3 es mostra el resultat de la recombinació ectòpica entre dues seqüències localitzades a diferents posicions del mateix cromosoma. Si les dues seqüències es troben en la mateixa orientació el resultat és un fragment acèntric i un cromosoma portador d'una delecció

(Figura 3A). En canvi, si les dues seqüències es troben en orientació inversa, el resultat és una inversió cromosòmica (Figura 3B).

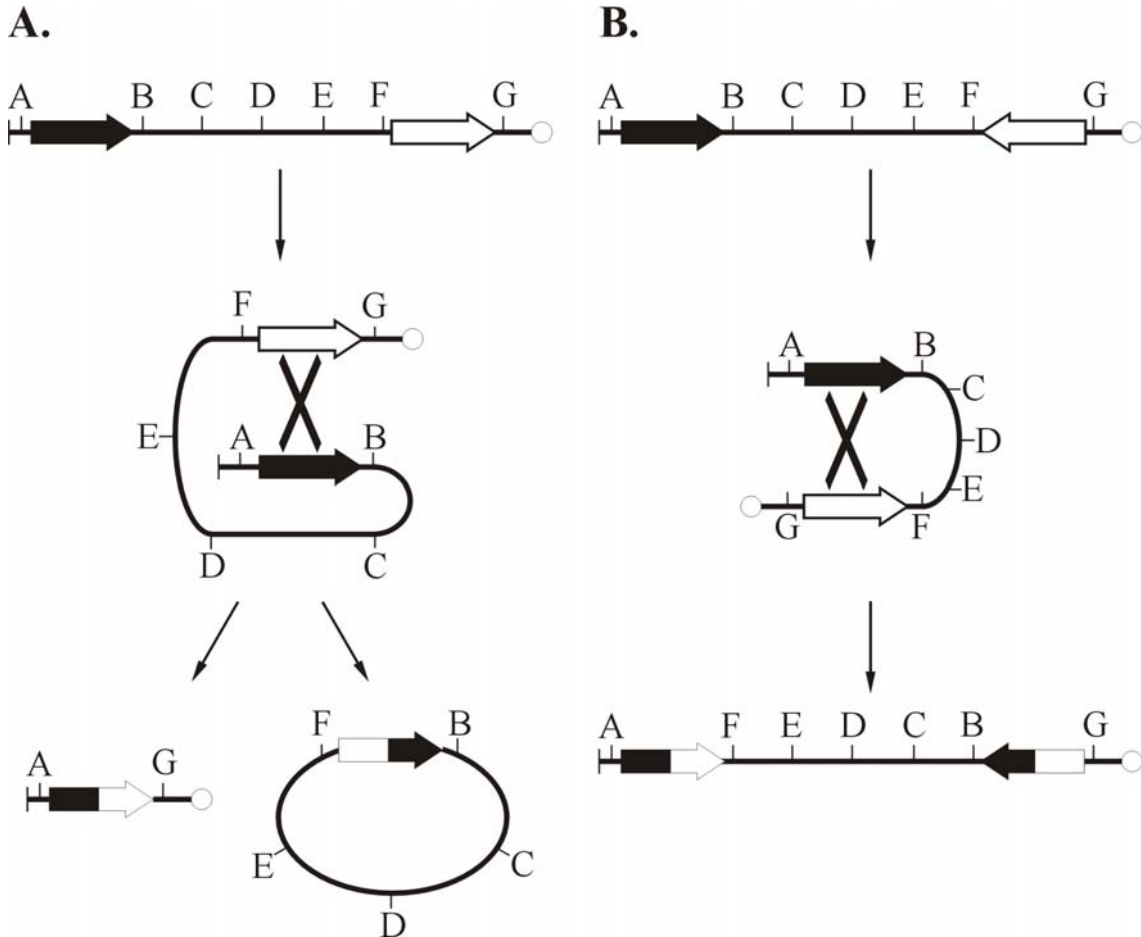


Figura 3. Resultat de la recombinació ectòpica entre dues seqüències homòlogues localitzades a diferents posicions del mateix cromosoma en la mateixa orientació (A), o en orientació inversa (B). Basat en Lim i Simmons (1994).

La recombinació ectòpica es pot produir entre qualsevol tipus de seqüència repetitiva, com gens de rRNA o tRNA, duplicacions, gens de famílies multigèniques, repeticions de DNA centromèric o telomèric, o elements transposables (Yoon i Richardson 1978). L'eficiència de la recombinació ectòpica depèn de la mida, la localització i la homologia de les seqüències (Goldman i Lichten 1996; Golic i Golic 1996). Hi ha alguns exemples de reordenacions cromosòmiques produïdes per recombinació ectòpica entre seqüències repetides o duplicons a humans (Schaffer i Lupski 2000; Ji *et al.* 2000). Algunes malalties humanes també s'han relacionat amb

reordenacions cromosòmiques produïdes per successos de recombinació ectòpica entre seqüències homòlogues (Naylor *et al.* 1995; Yen *et al.* 1991), i en alguns casos es tracta d'inversions recurrents (Naylor *et al.* 1995; Lagerstedt *et al.* 1997; Bagnall *et al.* 2002). Mitjançant aquest mecanisme també s'explica l'origen d'una inversió polimòrfica descrita al cromosoma X d'humans (Small *et al.* 1997), i d'una inversió del cromosoma Y fixada després de la divergència entre els humans i el ximpanzé (Schwartz *et al.* 1998). En aquest cas la recombinació es va produir entre dos elements *LINE* (Schwartz *et al.* 1998).

1.4.2 Elements transposables i reordenacions cromosòmiques

La natura repetitiva dels elements transposables i l'alt nombre de còpies que mostren en alguns casos fa que reuneixin les condicions necessàries per participar en processos de recombinació ectòpica. A més, l'activitat dels elements transposables produeix talls de cadena senzilla i de doble cadena al DNA (Craig 1997), que poden afavorir la recombinació entre ells. S'han proposat altres mecanismes a partir dels quals els elements transposables poden generar reordenacions cromosòmiques. La majoria d'aquest models es basen en un tipus de transposició inusual dels elements (Gray *et al.* 1996; Gray 2000).

La participació dels elements transposables en la generació de reordenacions cromosòmiques a poblacions de laboratori de *Drosophila* s'ha demostrat en diverses ocasions. Alguns dels elements implicats en l'aparició de reorganitzacions cromosòmiques són els elements de classe I *BEL* (Goldberg *et al.* 1983), *Doc* (Schneuwly *et al.* 1987), *I* (Busseau *et al.* 1989), i *roo* (Montgomery *et al.* 1991), i els elements de classe II *P* (Engels i Preston 1984), *hobo* (Lim 1988; Ladeveze *et al.* 1998) i *Foldback* (Collins i Rubin 1984). En el cas de l'element *Doc*, sembla que està implicat en la generació d'una inversió cromosòmica per recombinació ectòpica entre dues còpies de l'element (Schneuwly *et al.* 1987).

1.4.3 Elements transposables i inversions naturals

Tot i que existeixen moltes evidències a favor de la participació dels elements transposables en la generació d'inversions cromosòmiques al laboratori, encara no hi ha moltes dades sobre el seu paper a poblacions naturals de *Drosophila*. Els primers resultats a favor de la implicació dels elements transposables en l'aparició d'inversions naturals provenen d'estudis d'hibridació *in situ*. En aquests treballs s'ha descrit una associació significativa entre la localització cromosòmica dels elements transposables i els punts de trencament de les inversions. Lyttle i Haymer (1992) van localitzar l'element *hobo* prop dels punts de trencament de quatre inversions endèmiques de *D. melanogaster*. A *D. willistoni* s'ha demostrat l'associació entre l'element *P* i els punts de trencament de diverses inversions naturals (Regner *et al.* 1996), i a *D. virilis* s'ha descrit l'associació dels elements *Ulysses* i *Penelope* amb els punts de trencament de diverses inversions del grup *virilis* (Zelentsova *et al.* 1999; Evgen'ev *et al.* 2000). Però aquests resultats no demostren una relació de causalitat, i són només evidències indirectes de la participació dels elements transposables en la generació d'inversions (veure discussió). A més alguns d'ells (per exemple els elements *P* i *hobo* de *D. melanogaster*) han envaït recentment els genomes d'aquestes espècies (Streck *et al.* 1986; Engels 1992), i per tant no poden ser la causa de la majoria d'inversions.

En els estudis on s'han caracteritzat molecularment els punts de trencament de les inversions els resultats obtinguts fins al moment són contradictoris. Els primers punts de trencament que es van clonar van ser els de la inversió *In(3L)Payne* de *D. melanogaster* (Wesley i Eanes 1994), mitjançant la tècnica de microdissecció dels cromosomes (Wesley *et al.* 1990). Es va poder establir amb precisió la localització dels punts de trencament, però no es van trobar seqüències similars a un element transposable ni cap evidència a favor de la participació dels elements en la generació de la inversió. En el segon estudi d'aquest tipus es van clonar els punts de trencament d'una inversió fixada entre *D. melanogaster* i *D. subobscura*, i es van obtenir un resultat similar (Cirera *et al.* 1995). Recentment, s'han seqüenciat unes 500 kb de vuit regions genòmiques diferents a quatre espècies de *Drosophila*: *D. erecta*, *D. pseudoobscura*, *D. willistoni* i *D. littoralis*. Amb la comparació d'aquestes seqüències, més la seqüència de *D. melanogaster*, s'han descrit sis canvis cromosòmics fixats entre les diferents espècies. Tots els punts de trencament s'han localitzat a regions intergèniques, i en cap cas s'han trobat elements transposables (Bergman *et al.* 2002). En canvi, en dos estudis més sí que es van trobar indicis de la participació dels elements transposables en la

generació de dues inversions polimòrfiques. Al punt de trencament distal de la inversió *2Rd'* d'*Anopheles arabiensis* es van trobar seqüències repetitives amb una estructura similar a la dels elements transposables (*Odysseus*) (Mathiopoulos *et al.* 1998), i prop del punt de trencament proximal de la inversió *In(2L)* de *D. melanogaster* es va trobar un retrotransposó de tipus *LINE* (Andolfatto *et al.* 1999). No obstant, en cap d'aquests casos s'ha pogut relacionar directament la presència dels elements transposables amb la generació de les inversions ni quin ha estat el mecanisme utilitzat.

La principal evidència a favor de la intervenció dels elements transposables en la generació d'inversions naturals es va trobar amb la caracterització dels punts de trencament de la inversió polimòrfica *2j* de *D. buzzatii* (Cáceres *et al.* 1999b). La localització dels punts de trencament es va establir amb precisió, i es va veure que contenien insercions formades per diferents elements transposables. L'organització de les seqüències que flanquegen l'element de tipus *Foldback Galileo* suggereix que la inversió es va produir per recombinació ectòpica entre dues còpies d'aquest element. L'anàlisi de la variabilitat nucleotídica de les seqüències dels punts de trencament de diferents soques portadores i no portadores de la inversió és coherent amb un origen monofilètic de la inversió (Cáceres *et al.* 1999b; 2001).

1.5 Els elements transposables

Els elements mòbils o transposables són seqüències de DNA que es mobilitzen, canviant la seva localització cromosòmica dins d'un genoma hoste. B. McClintock va demostrar la seva existència al blat de moro, i des d'aleshores s'han trobat a tots els organismes estudiats, tant procariotes com eucariotes. Aquesta ubiqüitat dels elements transposables suggereix que són components antics dels genomes (Berg i Howe 1989; Capy *et al.* 1998). La seva capacitat de replicar-se i mobilitzar-se fa que normalment els elements transposables es trobin amb un nombre de còpies elevat dins del genoma, i que existeixi variabilitat entre els individus d'una mateixa espècie. La comparació de les filogènies d'elements transposables amb les dels seus genomes hostes va revelar que els elements transposables es poden transmetre tan verticalment com horitzontalment. La transmissió horitzontal es pot produir per transmissió sexual i per polispermia entre espècies properes. En el cas d'espècies més allunyades filogenèticament és necessària la

participació d'algun vector de transmissió, com organismes simbiotes o paràsits (Capy *et al.* 1998).

1.5.1 Classificació dels elements transposables

Els elements transposables s'han classificat segons el seu mecanisme de transposició en dos grans grups: elements de Classe I o retrotransposons, i elements de Classe II o transposons (Finnegan 1989).

1.5.1.1 Elements transposables de classe I

Els elements de classe I es transposen per replicació, mitjançant un intermediari de RNA que es retrotranscriu abans de la nova inserció (mecanisme DNA-RNA-DNA). Aquest mecanisme de transposició és un mecanisme replicatiu, on la inserció original de l'element no s'escindeix. Per tant el nombre d'elements d'aquesta classe augmenta després de la transposició (Finnegan 1989). Aquests elements s'han trobat només a organismes eucariotes, on solen ser el tipus majoritari d'elements transposables (apartat 1.5.2). Els elements de classe I se subdivideixen en dues classes més, segons la presència o no de repeticions llargues invertides (LTR).

L'estructura dels retrotransposons amb LTR és similar a la dels retrovirus. La seva mida és relativament gran, i habitualment es troba entre 5-9 kb. Els LTR tenen una mida entre 250-600 pb, i rodegen una regió que conté dos marcs de lectura oberts (ORFs) homòlegs als gens *gag* i *pol* dels retrovirus (Finnegan 1989; Arkhipova *et al.* 1995; Capy *et al.* 1998). Aquests gens codifiquen les proteïnes necessàries pel procediment de mobilització d'aquests elements. Alguns exemples d'aquest tipus d'elements són *copia* y *gypsy* de *D. melanogaster*, i *Ty1* i *Ty3* de *S. cerevisiae*.

Els retrotransposons sense LTR es divideixen en dues classes més, LINEs i SINEs, i són components molt abundants d'alguns genomes. Els LINEs solen contenir els ORFs que els permeten mobilitzar-se, i presenten unes seqüències riques en adenosines a l'extrem 3'. La seva mida està entre 5-8 kb, però sovint les còpies estan deleccionades en l'extrem 5'. Aquests elements deleccionats sovint no es poden mobilitzar ni en presència d'altres elements complets, ja que han perdut seqüències necessàries per a la retrotranscripció (Finnegan 1989). Alguns exemples d'aquests elements són els elements *I* i *jockey* de *D. melanogaster*, i els elements de la família *LI*

dels mamífers. Els SINEs generalment tenen una mida inferior a 500 pb. La majoria d'aquests elements provenen de gens de tRNA, excepte els de la família *Alu/BI* de mamífers que provenen del 7SL RNA. Els SINEs no contenen cap ORF que codifiqui proteïnes que permetin la seva transposició, i sembla que utilitzen els enzims produïts pels elements LINE.

1.5.1.2 Elements transposables de classe II

Els elements de classe II es transposen per escissió directa, sense utilitzar cap intermediari (mecanisme DNA-DNA). Principalment es mobilitzen seguint un procediment de “tallar-i-enganxar”, on l'element s'escindeix del lloc original i s'insereix a qualsevol altre lloc del genoma (Plasterk 1995). Tot i ser un mecanisme no replicatiu alguns elements de classe II també augmenten en número durant la transposició. Aquests elements es transposen durant la síntesi de DNA, movent-se de DNA replicat a DNA no replicat (Finnegan 1989). La classe II és força heterogènia, i la mida dels elements generalment és inferior a la dels elements de classe I. Estructuralment la seva característica principal és la presència de repeticions terminals invertides (ITRs). Els ITRs solen tenir una mida inferior als 50 pb, amb algunes excepcions com els elements *Foldback* (apartat 1.5.1.3). La regió central de l'element habitualment conté un ORF que codifica una transposasa. Aquest enzim i els ITRs són suficients per a la transposició. Molts elements de classe II presenten nombroses deleccions, i sovint mantenen els seus extrems però no la seqüència completa de la transposasa (O'Hare i Rubin 1983; Streck *et al.* 1986; Cáceres *et al.* 2001). Però aquests elements no autònoms poden ser mobilitzats per la transposasa codificada per altres elements. Els elements de classe II s'han trobat tant a organismes eucariotes com procariotes. Alguns exemples són els elements *P* i *hobo* de *D. melanogaster*.

1.5.1.3 Elements transposables de tipus *Foldback*

Els elements de tipus *Foldback* són un tipus especial d'elements de classe II. La variabilitat estructural dins d'aquests elements és molt gran, ja que hi ha moltes diferències en la mida dels ITRs i de la regió central dels diferents elements. Els dos ITRs d'un mateix element sovint també tenen longituds diferents i algunes diferències en la seqüència. La característica principal d'aquests elements és la presència d'uns

ITRs molt llargs, que poden arribar a constituir tot l'element. Quan la doble cadena de DNA es desnaturalitza els dos ITRs s'aparellen formant una estructura de tija i llaç, que és visible amb microscopia electrònica (Truett *et al.* 1981). Aquesta propietat dona nom a aquests elements.

Les característiques estructurals dels elements *Foldback* i el desconeixement de quin és el seu mecanisme de transposició van fer que a vegades se'ls inclogués dins d'una nova classe d'elements transposables (Capy *et al.* 1998). Sembla que els elements *Foldback* de *D. melanogaster* no tenen capacitat codificadora, però alguns d'ells inclouen una altra seqüència d'aproximadament 4 kb anomenada *NOF* (Goldberg *et al.* 1982; Harden i Ashburner 1990). Aquesta seqüència té uns ITRs de ~300 pb i una regió central amb capacitat codificant. El fet que les seqüències *NOF* no s'hagin trobat mai fora d'un element *Foldback*, indica que podria tractar-se de la transposasa d'aquests elements (Harden i Ashburner 1990).

1.5.2 Els elements transposables de *D. melanogaster*

A *D. melanogaster* s'han detectat 1.572 elements transposables, que representen un 3,86% de la seva seqüència. Els elements s'han classificat en 96 famílies diferents: 49 d'elements amb LTR, 27 de tipus *LINE*, 19 de classe II i la família *Foldback*. (Adams *et al.* 2000; Kaminker *et al.* 2002). La part del genoma seqüenciada es correspon majoritàriament amb l'eucromatina, i per tant aquest percentatge no és representatiu del genoma sencer. La proporció d'elements transposables a *D. melanogaster* és més elevada a l'heterocromatina que a la resta del genoma (Bartolomé *et al.* 2002), i s'ha estimat que els elements transposables ocupen un 9 % del genoma de l'espècie (Spradling i Rubin 1981).

Els elements amb LTR són els més nombrosos (682), seguits pels de tipus *LINE* (486), els de classe II (372), i els *Foldback* (32). Els elements amb LTR representen el 2,65 % de l'eucromatina, els de tipus *LINE* un 0,87%, els de classe II un 0,31%, i els *Foldback* un 0,04% (Kaminker *et al.* 2002). Aquestes proporcions són diferents de les trobades a altres genomes. Per exemple, el genoma de *S. cerevisiae* només conté elements amb LTR, i representen un 3,1 % del genoma (Kim *et al.* 1998). A *C. elegans* els elements més abundants són els de classe II (5,3 %), i al genoma humà ho són els elements *LINE* i *SINE* (33,4 % de la seqüència) (Lander *et al.* 2001). Al genoma d'*A. thaliana* els elements transposables són més abundants, i constitueixen més d'un 10%

de la seva seqüència, amb una proporció similar d'elements de classe I i II (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000).

Els elements transposables es distribueixen equitativament per tots els cromosomes de *D. melanogaster*, excepte el cromosoma 4 que conté un proporció més elevada. La densitat d'elements transposables també varia a les diferents zones dels cromosomes, i és molt més elevada a l'eucromatina proximal dels cromosomes. Aquesta regió representa un 10 % de l'eucromatina i conté un 36,7% dels elements (Kaminker *et al.* 2002). Aquestes seqüències són una zona de transició entre l'eucromatina i l'heterocromatina. Aquesta distribució dels elements no és estranya, ja que els elements transposables són un component important de l'heterocromatina (Vaury *et al.* 1989; Pimpinelli *et al.* 1995; Dimitri *et al.* 1997; Coelho *et al.* 1998). En l'anàlisi d'una seqüència heterocromàtica de 20,7 Mb s'ha determinat que el 52 % està constituït per elements transposables (Hoskins *et al.* 2002).

1.5.3 Els elements transposables de *D. buzzatii*

Tot i no ser una espècie molt estudiada molecularment, a *D. buzzatii* s'han trobat elements transposables de les diferents classes. *Oswaldo* (Labrador i Fontdevila 1994) i *copia* (Francino *et al.* 1993) són elements de classe I amb LTR. També s'ha descrit la presència de dos elements del tipus *LINE*: *blanco* (Plata-Rengijo 1995), i *RI* (Lathe III *et al.* 1995). Els elements *copia* i *RI* també es troben a moltes altres espècies de *Drosophila* (Francino *et al.* 1993; Lathe III *et al.* 1995). A *D. koepferae*, una espècie molt propera a *D. buzzatii* (Rodríguez-Trelles *et al.* 2000), s'han trobat seqüències amb molta homologia amb el retrotransposó *gypsy* de *D. melanogaster* i els elements del tipus *LINE T1Ag* i *Q* d' *A. gambiae* (Marín i Fontdevila 1996).

El transposó *Gandalf* es va caracteritzar a *D. koepferae* i també es troba a *D. buzzatii* (Marín i Fontdevila 1995). Fins fa poc era l'únic element de classe II conegut a *D. buzzatii*. La seqüenciació dels punts de trencament de la inversió *2j* de *D. buzzatii* va revelar l'existència de set transposons (*BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4*, *BuT5*, *ISBu1* i *ISBu2*) i tres elements del tipus *Foldback* (*Galileo*, *Kepler* i *Newton*) (Cáceres *et al.* 1999b; 2001). L'element *ISBu2* també s'ha trobat durant la caracterització de la regió que inclou el gen *labial* de *D. buzzatii*. En aquest darrer estudi s'ha descrit un nou transposó (*ISBu3*) (Negre *et al.* 2003).

1.6. El grup *repleta* de *Drosophila*

El gènere *Drosophila* està format per unes 2.000 espècies, classificades en 15 subgèneres diferents. *D. melanogaster* està inclosa dins del subgènere *Sophophora*, mentre que *D. repleta*, *D. buzzatii* i *D. virilis* es troben al subgènere *Drosophila*. La majoria de les espècies de *Drosophila* estudiades estan incloses en aquests dos subgèneres (Wheeler 1981; Ashburner 1989). El temps de divergència entre els dos subgèneres està entre 40-62 milions d'anys (Beverly i Wilson 1984; Russo *et al.* 1995).

Les espècies de *Drosophila* estan classificades en 21 grups diferents. El grup *repleta*, del subgènere *Drosophila*, conté aproximadament 100 espècies i és un dels més nombrosos (Wasserman, 1982; 1992). Està subdividit en 5 subgrups: *fasciola*, *hydei*, *mercatorum*, *mulleri*, i *repleta*. El temps de divergència entre aquests subgrups és de 15-22 milions d'anys (Spicer 1988; Russo *et al.* 1995). La majoria de les espècies del grup *repleta* ocupa hàbitats àrids o semiàrids de diferents regions del Nou Món, i cinc d'elles, entre les que es troben *D. repleta* (del subgrup *repleta*) i *D. buzzatii* (del subgrup *mulleri*), han colonitzat altres regions. *D. repleta* presenta una distribució cosmopolita, i *D. buzzatii* es pot trobar a Austràlia i a la Mediterrània (Wasserman 1992). *D. buzzatii* és una espècie cactòfila, que s'alimenta i posa els ous a les tiges i fruits en descomposició. Principalment es troba associada a diferents hostes del gènere *Opuntia*, tot i que també s'ha trobat associada al gènere *Trichocereus* i altres cactus (Hasson *et al.* 1992).

Moltes espècies del grup *repleta* s'han estudiat citològicament. La comparació dels cromosomes politènics d'aquestes espècies ha permès establir les seves relacions filogenètiques, basades en les inversions paracèntriques i assumint que la fixació d'una inversió és un succés únic (Krimbas i Powell 1992; Wasserman 1992). En total, dins del grup *repleta* s'han descrit 296 inversions paracèntriques i quatre fusions cèntriques (Wasserman 1982; 1992). S'ha proposat un cariotip ancestral per al grup *repleta*, anomenat Primitiu I, separat del cariotip de *D. repleta* per vuit inversions: *Xa*, *Xb*, *Xc*, *2a*, *2b*, *2t⁸*, *2u⁸* i *3^b*. Per altra banda, entre el cariotip Primitiu I i *D. buzzatii* s'han fixat quatre inversions més: *2m*, *2n*, *2z⁷* i *5g* (Ruiz i Wasserman 1993). Posteriorment s'ha proposat, basant-se en la comparació de mapes físics de *D. repleta* i *D. buzzatii*, que al terç distal del cromosoma 2 hi ha un mínim de tres inversions, en lloc de la inversió *2a* com es pensava (Ranz 1998; Ranz *et al.* 2003). Les dues noves inversions s'han

anomenat $2c^{10}$ i $2b^{10}$ (Ranz *et al.* 2003). De les 296 inversions paracèntriques que s'han descrit en el grup *repleta*, 210 (70%) es localitzen en el cromosoma 2, que representa un 24% de l'eucromatina. Aquest cromosoma és el més dinàmic dins d'aquest grup, i per tant el més informatiu filogenèticament (Taula 4) (Wasserman 1992).

Taula 4. Distribució de les inversions als cromosomes de les espècies del grup *repleta*.

Inversions	Cromosomes (% eucromatina)					Total
	X (18,7%)	2 (23,9%)	3 (19,0 %)	4 (20,0 %)	5 (17,9 %)	
Polimòrfiques	9	132	21	7	8	117
Fixades	12	76	18	2	11	119
Total	21	208	39	9	19	296

El % d'eucromatina que representa cada cromosoma s'ha calculat en funció de la seva mida a *D. melanogaster* (Hoskins *et al.* 2002). Dades de Wasserman (1992).

El complexe *buzzatii* és un grup de 11 espècies incloses en el subgrup *mulleri*. Mitjançant la comparació del patró de bandes dels cromosomes politènics i algunes característiques morfològiques (Wasserman 1982; Ruiz i Wasserman 1993), aquestes espècies s'han classificat en tres *clusters* diferents: *stalker* (*D. richardsoni* i *D. stalker*), *martensis* (*D. martensis*, *D. uniseta*, *D. venezolana*, i *D. starmeri*) i *buzzatii* (*D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. borborema*, *D. serido* i *D. seriema*). Les poblacions de *D. serido* del centre i l'oest de Brasil es diferencien morfològica i cromosòmicament de la resta de poblacions de l'espècie. Probablement aquestes poblacions formen una espècie diferent (*D. serido IV*), i per tant el complexe *buzzatii* contindria 12 espècies (Ruiz *et al.* 1997). A la Figura 4 es mostra la filogènia cromosòmica més parsimoniosa del complexe *buzzatii* (Ruiz *et al.* 1997).

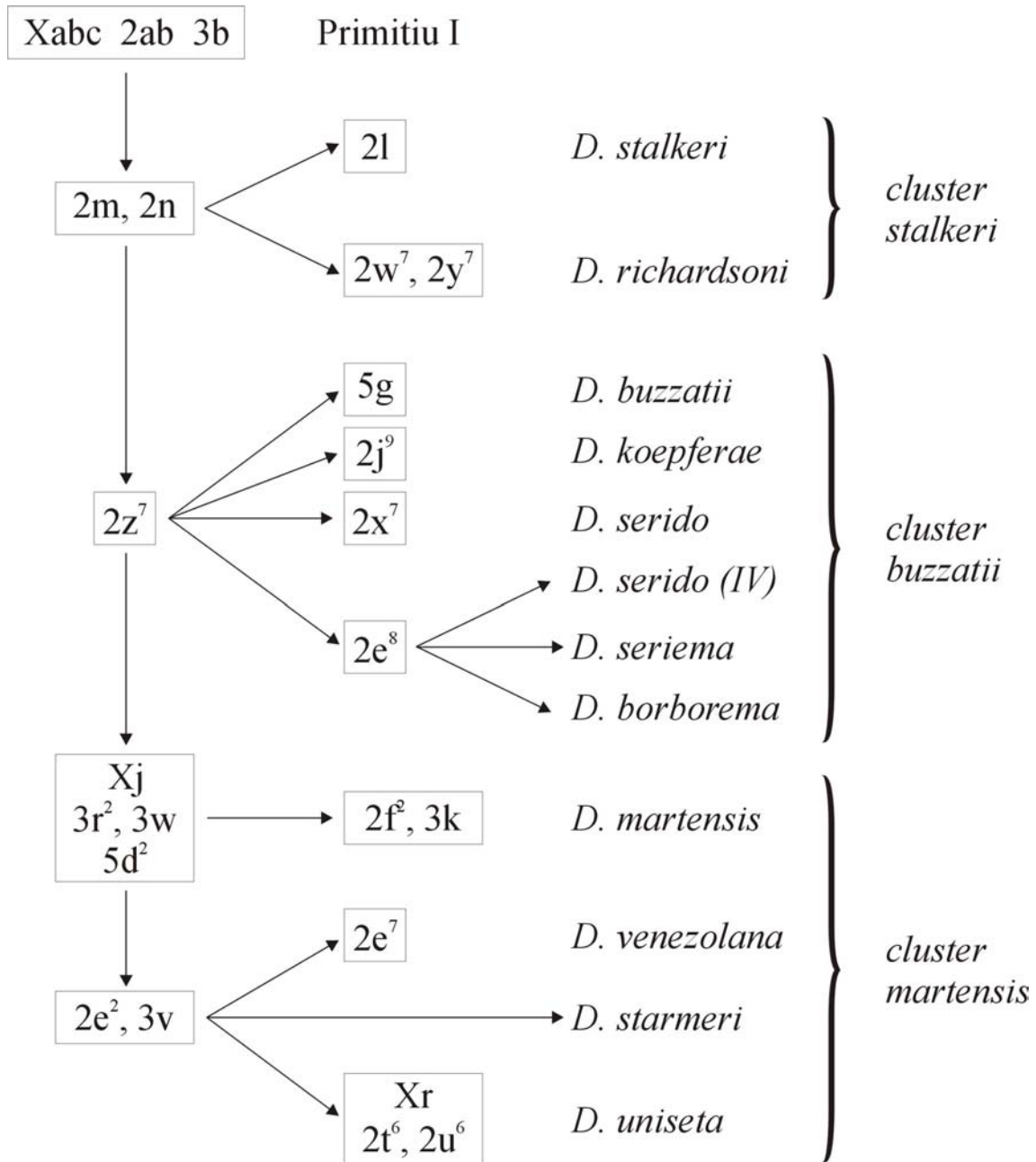


Figura 4. Filogènia cromosòmica de les 12 espècies del complexe *buzzatii* (Ruiz *et al.* 1997).

Des de l'ordenació ancestral Primitiu I s'han fixat 19 inversions diferents. Dues inversions (2m i 2n) són comunes per a totes les espècies del gènere. La inversió 2z⁷ es troba a les espècies dels clusters *buzzatii* i *martensis*, mentre que les inversions X_j, 3r², 3w i 5d² s'han fixat només a les espècies del cluster *martensis*. Totes les espècies, excepte *D. starmeri*, presenten inversions fixades específicament, i en tres casos (2f², 2e⁷ i 2t⁶) aquestes inversions es troben segregant a altres espècies. Després de l'anàlisi

de diferents poblacions de *D. serido*, on s'han descrit tres noves inversions (Ruiz *et al.* 2000), el nombre total d'inversions polimòrfiques del complexe és de 70. A l'annex 2 es mostra una llista de totes les inversions del complexe *buzzatii*, amb les espècies on es troben i la localització dels seus punts de trencament.

El cariotip de *D. buzzatii* està format per 5 cromosomes acrocèntrics (X, 2, 3, 4 i 5) i un cromosoma puntiforme (cromosoma 6). En aquesta espècie s'hi han descrit 16 inversions polimòrfiques (Taula 5): 13 d'elles es troben al cromosoma 2, i una en els cromosomes 3, 4 i 5 (Wasserman 1992). Les inversions polimòrfiques de *D. buzzatii* s'han classificat segons la seva distribució geogràfica en quatre categories: cosmopolites, moderadament freqüents, endèmiques i úniques (Ruiz *et al.* 1984).

Taula 5. Inversions polimòrfiques de *D. buzzatii*.

Inversió	Ordenació original	Punts de trencament	Distribució geogràfica	Referència
$2j$	$2st$	C6b-E5a	cosmopolita	(1) (2)
$2z^3$	$2j$	E4b-c-F1f	cosmopolita	(1) (3) (4)
$2q^7$	$2j$	D3a-G2f	mod. freqüent	(1) (4)
$2y^3$	$2st$	D1a-E3a	endèmica	(1)
$2c^9$	$2j$	C1a-D1a	endèmica	(1)
$2r^9$	$2st$	C5f-D2a	endèmica	(1)
$2s^9$	$2j$	E1a-G2a	endèmica	(1)
$2i^9$	$2j$	F3c-G2f	única	(1)
$2d^9$	$2jc$	D5b-G3d	única	(1)
$2e^9$	$2st$	C3c-C6h	única	(1)
$2f^9$	$2st$	C6h-G2f	única	(1)
$2g^9$	$2st$	B3e-C3a	única	(1)
$2h^9$	$2j$	E1a-E2e	única	(1)
$3j^2$	$3st$	A2c-F2b	única	(1)
$4s$	$4st$	D1d-F1c	mod. freqüent	(1)
$5c^2$	$5st$	D4d-E3g	única	(5)

(1) Ruiz *et al.* (1984); (2) Cáceres *et al.* 1999b; (3) Laayouni *et al.* 2000; (4) Aquest treball; (5) Barker *et al.* (1985).

Els punts de trencament de la inversió $2j$ s'han caracteritzat molecularment (Cáceres *et al.* 1999b; 2001). En aquest treball s'han clonat i seqüenciat els punts de trencament de la inversió $2q^7$. Aquestes dues inversions presenten algunes diferències. En primer lloc, la inversió $2q^7$ es va originar sobre un cromosoma portador de la inversió $2j$, i per tant és una inversió més recent. Segon, la inversió $2j$ es troba en una posició intermitja del cromosoma, mentre que la inversió $2q^7$ és més petita i està parcialment inclosa dins de la $2j$. El seu punt de trencament distal es troba dins de la inversió $2j$, mentre que el proximal es troba prop del centròmer (Figura 5) (Ruiz *et al.* 1984; Ruiz i Wasserman 1993). Finalment, la inversió $2j$ presenta una distribució cosmopolita i es troba a altes freqüències a moltes poblacions naturals. En canvi, la inversió $2q^7$ té una àrea de distribució molt més reduïda, i sovint es troba a baixes freqüències (Fontdevila *et al.* 1981, 1982; Hasson *et al.* 1995).

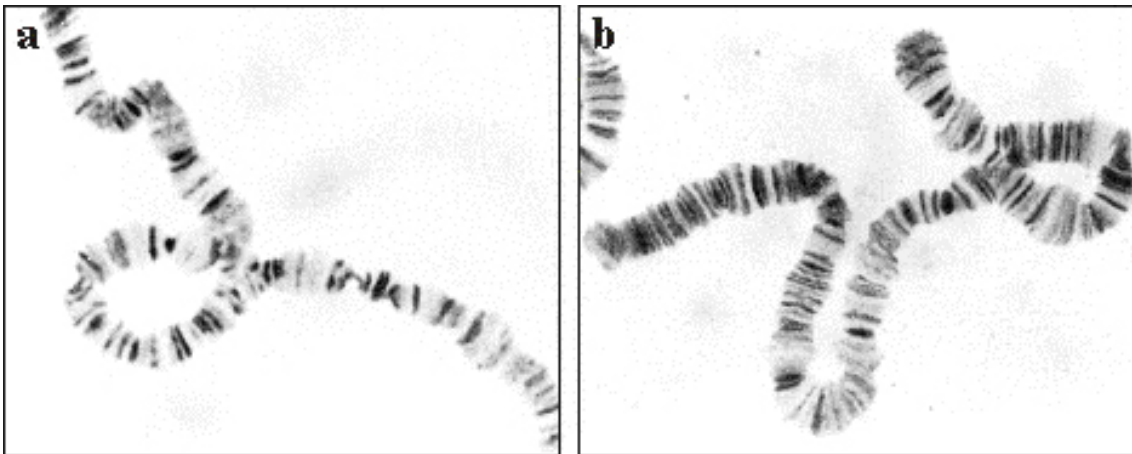


Figura 5. Fotografies d'heterocariotips $2st/2j$ (a) i $2j/2jq^7$ (b).

1.7. Objectius

L'objectiu d'aquest treball és determinar amb quina freqüència es fixen les inversions cromosòmiques a *Drosophila* i quin és el mecanisme que les origina.

El treball està estructurat en tres parts ben diferenciades. A la primera part s'ha analitzat l'organització molecular de tres regions del braç cromosòmic 3R de *D. melanogaster* a les espècies del grup *repleta* *D. repleta* i *D. buzzatii*. Amb l'anàlisi dels resultats es podran assolir els següents objectius:

1. Estimar el número d'inversions fixades a l'element cromosòmic 3R entre les espècies *D. melanogaster* i *D. repleta*. Comparar aquest valor amb els obtinguts en altres estudis. Comparar aquestes estimes amb les obtingudes per altres organismes.

2. Comprovar si els punts de trencament de les inversions es distribueixen homogèniament per tot el cromosoma o si tendeixen a acumular-se a algunes regions.

3. Trobar segments cromosòmics conservats durant la divergència entre *D. melanogaster* i *D. repleta*. L'anàlisi del número de segments conservats, la seva mida, i el seu contingut, pot proporcionar informació sobre els motius de la seva conservació.

4. Completar el mapa físic del cromosoma 2 de *D. repleta* i *D. buzzatii*. Els marcadors cartografiats en aquest treball s'afegiran als cartografiats per altres autors. La comparació d'aquest mapa amb el de *D. melanogaster* també permetrà estimar la taxa de fixació d'inversions.

5. Cartografiar nous marcadors prop dels punts de trencament de les inversions $2q^7$ i $2z^3$ de *D. buzzatii*. Això permetrà establir amb més precisió a quines bandes cromosòmiques es troben els punts de trencament d'aquestes inversions. La localització de marcadors a prop o contenint algun punt de trencament facilitaria la seva clonació.

A la segona part del treball es pretén determinar quin és el mecanisme molecular que origina les inversions cromosòmiques. Els objectius concrets són:

6. Clonar i seqüenciar els punts de trencament d'una inversió polimòrfica de *D. buzzatii*. Els punts de trencament s'han de clonar a cromosomes portadors i no portadors de la inversió.

7. Determinar amb precisió, mitjançant l'anàlisi de la seqüències dels punts de trencament de la inversió, quins són els límits de la inversió i la presència o no d'insercions d'elements transposables.

8. Comprovar si els resultats obtinguts són compatibles amb algun dels diferents models proposats per a l'origen de les inversions cromosòmiques.

9. Analitzar la variabilitat nucleotídica i estructural de les regions dels punts de trencament de la inversió. Aquesta anàlisi permetrà estimar l'edat de la inversió.

Finalment, s'estudiarà la distribució cromosòmica a *D. buzzatii* dels elements transposables trobats als punts de trencament de la inversió $2j$ i dels nous elements trobats en aquest treball. Els objectius d'aquest estudi són:

10. Comprovar si la distribució és similar a la descrita a altres organismes i esbrinar quins són els factors principals que la determinen.

11. Comprovar si aquests elements transposables també es troben a altres punts de trencament d'inversions cromosòmiques de *D. buzzatii* i del complex *buzzatii*.

12. Comprovar si els elements transposables tendeixen a agrupar-se als mateixos cromosomes, regions o bandes cromosòmiques. Aquesta tendència podria explicar la distribució no aleatòria de les inversions entre els diferents cromosomes i la formació de punts calents d'insercions d'elements transposables.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1 Soques

S'han utilitzat trenta-set soques diferents de cinc espècies de *Drosophila*.

Taula 6. Espècies i soques utilitzades.

Soca	Espècie	Origen	Ordenació cromosòmica
st-1	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	estàndard
st-3	<i>D. buzzatii</i>	Vipos (Argentina)	estàndard
st-4	<i>D. buzzatii</i>	Guaritas (Brasil)	estàndard
st-5	<i>D. buzzatii</i>	Catamarca (Argentina)	estàndard
st-6	<i>D. buzzatii</i>	Salta (Argentina)	estàndard
st-7	<i>D. buzzatii</i>	Termas de Río Hondo (Argentina)	estàndard
st-8	<i>D. buzzatii</i>	Ticucho (Argentina)	estàndard
st-9	<i>D. buzzatii</i>	Trinkey (Austràlia)	estàndard
st-10	<i>D. buzzatii</i>	Termas de Río Hondo (Argentina)	estàndard
st-11	<i>D. buzzatii</i>	Trinkey (Austràlia)	estàndard
j-1	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	2j
j-2	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	2j
j-9	<i>D. buzzatii</i>	Quilmes (Argentina)	2j
j-11	<i>D. buzzatii</i>	Los Negros (Bolívia)	2j
j-12	<i>D. buzzatii</i>	Guaritas (Brasil)	2j
j-16	<i>D. buzzatii</i>	Salta (Argentina)	2j
j-19	<i>D. buzzatii</i>	Ticucho (Argentina)	2j
j-22	<i>D. buzzatii</i>	Trinkey (Austràlia)	2j
j-23	<i>D. buzzatii</i>	San Luis (Argentina)	2j, 5I
j-24	<i>D. buzzatii</i>	San Luis (Argentina)	2j, t (5,1)
jq ⁷ -1	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	2jq ⁷
jq ⁷ -2	<i>D. buzzatii</i>	Mogán, Las Palmas (Espanya)	2jq ⁷
jq ⁷ -3	<i>D. buzzatii</i>	Caldetes, Barcelona (Espanya)	2jq ⁷
jq ⁷ -4	<i>D. buzzatii</i>	Otamendi (Argentina)	2jq ⁷
jq ⁷ -5	<i>D. buzzatii</i>	Otamendi (Argentina)	2jq ⁷

jq ⁷ -6	<i>D. buzzatii</i>	Otamendi (Argentina)	2jq ⁷
jz ³ -1	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	2jz ³
jz ³ -5	<i>D. buzzatii</i>	Trinkei (Austràlia)	2jz ³
jz ³ -6	<i>D. buzzatii</i>	Carboneras, Almería (Espanya)	2jz ³
jz ³ -7	<i>D. buzzatii</i>	Pingado, Tenerife (Espanya)	2jz ³
y ³ -1	<i>D. buzzatii</i>	Pingado, Tenerife (Espanya)	2y ³
s-1	<i>D. buzzatii</i>	¿?	2y ³ , 4s
Canton-S	<i>D. melanogaster</i>	Bowling Green Center, Ohio (EUA)	estàndard
Oregon R	<i>D. melanogaster</i>	Bowling Green Center, Ohio (EUA)	estàndard
KO-2	<i>D. koepferae</i>	Sierra San Luis (Argentina)	estàndard
1611.2	<i>D. repleta</i>	Bowling Green Center, Ohio (EUA)	estàndard
VIR-Tokyo	<i>D. virilis</i>	Tokyo (Japó)	estàndard

2.2 Protocols experimentals

2.2.1 Extraccions de DNA

2.2.1.1 Extracció de DNA d'adults de *Drosophila*

El protocol utilitzat s'ha basat en el descrit per Piñol *et al.* (1988) amb algunes modificacions.

1. Omplir l'homogeneïtzador amb 0,15-0,2 grams d'individus adults anestesiats.
2. Afegir 5 ml de tampó 1 (100mM NaCl; 10mM EDTA; 20mM TrisHCl pH 7,5; 0,5% Tritó X-100) i homogeneïtzar amb el pistó de màxima velocitat unes 10 vegades.
3. Passar l'homogeneïtzat per una malla de niló a un tub estèril de 10 ml.
4. Afegir 5 ml de tampó 1 per netejar el pistó i la malla.
5. Centrifugar a 4.000 rpm a 4°C durant 10 minuts. Decantar el sobrenedant.
6. Ressuspendre el *pellet* de nuclis en 10 ml de tampó 2 (tampó 1 sense Tritó X-100).
7. Repetir els passos 4 i 5 tres vegades més.
8. Ressuspendre el *pellet* de nuclis en 1,5 ml de tampó 2. En aquest punt tenim nuclis purificats.

9. Afegir 0,75 ml de SDS 4% i 0,75 ml de perclorat sòdic 4M. El líquid es torna viscos.
10. Agitar suaument a temperatura ambient durant 3 minuts.
11. Desproteïnitzar amb un volum de fenol/cloroform (1:1). Agitar suaument fins que el líquid estigui homogeni.
12. Centrifugar a 4.000 rpm a 4°C durant 5 minuts.
13. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
14. Desproteïnitzar amb un volum de cloroform/alcohol isoamílic (24:1). Agitar suaument.
15. Centrifugar a 4.000 rpm a 4°C durant 5 minuts.
16. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
17. Repetir la desproteïnització amb cloroform/alcohol isoamílic (24:1).
18. Afegir 2,5 volums d'etanol absolut i agitar suaument. S'ha de formar un precipitat amb forma de cotó.
19. Passar el DNA a un tub *ependorf*.
20. Centrifugar durant 10 minuts i eliminar el sobrenedant.
21. Afegir 500 µl d'etanol 70%.
22. Centrifugar durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant. Assecar al buit.
23. Ressuspendre el DNA en 50-100 µl de TE (10 mM Tris HCl; 1mM EDTA) o aigua Milli-Q.

2.2.1.2 Extracció de DNA de clons

a) Plasmidis

S'ha utilitzat el mètode de lisi alcalina descrit per Sambrook *et al.* (1989) amb algunes modificacions.

1. Seleccionar una colònia aïllada en un cultiu en placa amb una nansa de Kohl i posar-la en 3 ml de medi líquid LB (Luria-Bertani) o TB (*Terrific Broth*) complementats amb ampicilina (50 µg/ml).
2. Mantenir a 37°C i en agitació (250-300 rpm) durant un mínim de 14 hores.
3. Centrifugar 1,5 ml del cultiu en un tub *ependorf* durant un minut i decantar. Si es vol obtenir més quantitat de DNA es pot afegir més cultiu i tornar a centrifugar.

4. Tornar a centrifugar breument i eliminar completament el sobrenedant.
5. Ressuspendre en 100 µl de tampó de lisi cel·lular (50mM glucosa; 10 mM EDTA pH8; 25 mM Tris HCl pH8) a 4°C i mantenir-ho en gel.
6. Afegir 200 µl de tampó de desnaturalització (0,2M NaOH; 1% SDS) i agitar per inversió fins que el líquid estigui transparent. Mantenir el tub dins del gel durant 5 minuts.
7. Afegir 150 µl de tampó de neutralització a 4°C (5M KOAc; 11,5 % àcid acètic glacial) i agitar suaument per inversió fins que es formi un precipitat. Mantenir el tub en gel durant 10 minuts.
8. Desproteïnitzar amb un volum de fenol/cloroform (1:1). Agitar fins que estigui homogeni i centrifugar durant 5 minuts.
9. Transferir la fase aquosa a un tub nou.
10. Desproteïnitzar amb un volum de cloroform/alcohol isoamílic (24:1). Agitar fins que estigui homogeni i centrifugar durant 5 minuts.
11. Transferir la fase aquosa a un tub nou. La desproteïnitzzació amb cloroform/alcohol isoamílic (24:1) es pot repetir si es necessita una major puresa del DNA. Per exemple, és recomanable fer-ho quan es vol seqüenciar el plasmidi.
12. Afegir 2 volums d'etanol absolut a -20°C. Agitar per inversió i mantenir a -20°C durant un temps mínim de 20 minuts.
13. Centrifugar durant 10 minuts i decantar.
14. Afegir 500 µl d'etanol al 70% a -20°C.
15. Centrifugar durant 5 minuts i decantar.
16. Assecar al buit.
17. Ressuspendre en 15-20 µl de tampó TE (10 mM Tris HCl; 1mM EDTA) o aigua Milli-Q.
18. Afegir 1 µl de RNAasa A (10 mg/ml) i mantenir a 37°C durant 15-30 minuts.

b) Cosmidis

S'ha utilitzat el mateix mètode que per a l'extracció de DNA plasmídic (2.2.1.2.a) amb dues modificacions:

1. el medi líquid es complementa amb kanamicina (50 µg/ml)
2. abans de ressuspèndre les cèl·lules en tampó de lisi, es poden ressuspèndre en 500 µl de STE (100mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 8; 1mM EDTA pH 8) per evitar la degradació del DNA.

c) Bacteriòfags P1

S'ha utilitzat el mateix mètode que per a l'extracció de DNA cosmídic (2.2.1.2.b) amb algunes modificacions descrites per Hartl i Lozovskaya (1994):

1. s'utilitza un volum de medi líquid de 5 ml, complementat amb kanamicina (50 µg/ml) i IPTG (0,1 M). Degut al menor creixement que presenten les cèl·lules és recomanable utilitzar TB.
2. els volums dels diferents tampons utilitzats són de 200 µl de tampó de llisi, 300 µl de tampó de desnaturalització i 250 µl de tampó de neutralització. Això fa augmentar fins a 750 µl els volums de fenol/cloroform i cloroform/alcohol isoamílic (24:1) utilitzats per a la desproteïnitació.
3. es repeteix un cop la desproteïnitació amb cloroform/alcohol isoamílic (24:1).

d) Bacteriòfags λ

1. Sembrar una placa de LBosa (1,5 % d'agarosa en LB líquid) amb cada bacteriòfag, com està descrit a l'apartat 2.2.5.2. La dilució del bacteriòfag ha de ser la que produeix una lisi total.
2. Mantenir a 37°C durant tota la nit.
3. Afegir a cada placa 2,5 ml de *λ* *diluent* (10mM Tris HCl pH 7,5; 10 mM MgSO₄) i mantenir a 4°C tota la nit o 1-2 hores en agitació a temperatura ambient.
4. Recuperar el *λ* *diluent* de cada placa i afegir 0,5 ml més per placa.
5. Mantenir les plaques lleugerament inclinades durant 15 minuts a temperatura ambient i recuperar la resta de líquid.

6. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
7. Passar el sobrenedant a un tub nou i afegir-hi 1 µl de RNAasa A (1mg/ml) i 1 µl de DNAasa I (1mg/ml).
8. Mantenir a 37°C durant 15-30 minuts.
9. Afegir a cada tub un volum (2,5-3 ml) d'una solució 20% polietilè glicol i 2M NaCl en λ *diluent*. Agitar suaument amb el *vòrtex* i mantenir durant 1 hora a 4°C.
10. Repartir el contingut en 3 tubs *ependorf* i centrifugar a 12000 rpm durant 10 minuts.
11. Eliminar completament el sobrenedant i afegir 170 µl de TE pH8. Ressuspendre el *pellet* amb el *vòrtex*. Ajuntar el contingut dels tubs del mateix fag en un sol tub.
12. Afegir 5 µl de 10% SDS i mantenir a 68°C durant 5 minuts.
13. Afegir 10 µl de 5M NaCl. Desproteïnitza una vegada amb un volum de fenol/cloroform (1:1) i dues vegades amb un volum de cloroform/alcohol isoamílic (24:1).
14. Afegir un volum d'isopropanol a -20°C a la fase aquosa i barrejar per inversió. Guardar a -20°C durant 1 hora o a -70°C durant 15 minuts.
15. Centrifugar durant 15 minuts i eliminar el sobrenedant.
16. Rentar el *pellet* amb 500 µl d'etanol 70% a -20°C i centrifugar durant 5 minuts.
17. Eliminar el sobrenedant i assecat el *pellet* de DNA al buit.
18. Dissoldre el *pellet* en 30 µl de TE i afegir-hi 1 µl de RNAasa A (1mg/ml).
19. Mantenir a 37°C durant 15 minuts.

e) YACs

El DNA dels cromosomes artificials de llevat (YACs) s'obté purificant-lo a partir d'una banda d'un gel d'agarosa (2.2.1.3). Degut a la seva mida s'han d'utilitzar gels de camp polsant (PFGE). Aquests gels permeten separar els YACs de la resta de cromosomes. En aquest tipus de gel les mostres no es col·loquen directament als pous. S'han de preparar blocs d'agarosa que continguin la mostra, que posteriorment s'insertaran als pous del gel. Els protocols utilitzats s'han basat ens els descrits per Johnston *et al.* (1994).

1. Se sembren plaques en medi Ura⁻Trp⁻ i es mantenen a 30°C. Les colònies apareixen tres o quatre dies després.
2. A partir d'una colònia es fan cultius d'entre 50-100 ml de medi ACD (Ura⁻ Trp⁻) a 30°C durant 3 dies (amb 50 ml s'obtenen 12 inserts aproximadament).
3. Repartir en tubs de 10 ml i centrifugar els cultius a 4.000 rpm durant 5 minuts.
4. Eliminar el sobrenedant i ressuspendre el *pellet* en 1ml d' EDTA 50mM pH 8.
5. Passar-ho a un tub *ependorf* i centrifugar durant uns 30 segons.
6. Eliminar el sobrenedant. Repetir aquest procediment dues vegades més. Mantenir els tubs en gel.
7. Ressuspendre el *pellet* de cèl·lules en 150 µl de solució A (1M sorbitol; 20 mM EDTA pH 8; 14 mM 2-mercaptoetanol; 1mg/ml zimoliasa. Els dos darrers components s'afegeixen just abans d'utilitzar la solució). Mantenir en gel.
8. Preparar un volum de 150 µl per cada *ependorf* de solució B (solució A sense zimoliasa. El 2-mercaptoetanol s'afegeix just abans d'utilitzar la solució).
9. Preparar una solució d'agarosa LGTA (per fer els inserts) al 2 % en solució B.
10. Afegir a cada *ependorf* un volum de la solució d'agarosa al 2 %. És convenient treure els tubs del gel un minut abans per evitar que l'agarosa se solidifiqui al seu interior.
11. Repartir el contingut dels tubs en motlles de plàstic per formar els inserts i deixar-ho a 4°C durant 30 minuts.
12. Treure els inserts i posar-los en un tub amb solució C (1,2 M sorbitol; 20 mM EDTA; 10 mM TrisHCl pH 8; 14 mM 2-mercaptoetanol; 1 mg/ml zimoliasa. Els dos darrers components s'afegeixen just abans d'utilitzar la solució). Per no manipular els inserts es poden treure dels motlles amb aire a pressió, per exemple utilitzant una pera de pipetes *Pasteur*.
13. Mantenir a 37°C durant dues hores.
14. Eliminar la solució C i afegir solució D (1% liti dodecil sulfat; 100 mM EDTA; 10 mM Tris HCl pH 8).

15. Mantenir a 37°C durant 1 hora.
16. Canviar la solució per solució fresca i mantenir a 37°C durant tota la nit.
17. Eliminar la solució D i afegir TE baix en EDTA (0,1 mM) pH 8. Mantenir a temperatura ambient i agitació molt suau durant 30 minuts. Repetir el procediment.
18. Guardar els inserts en TE baix en EDTA a 4°C.
19. Abans de carregar un gel amb la mostra és recomanable córrer algun gel amb només un marcador de pes molecular per determinar les condicions.
20. Un cop s'han col·locat els inserts als pous del gel s'omplen amb agarosa al 0,5 %.
21. Després de tenyir el gel es talla la banda on es troba el DNA que volem extreure (2.2.1.3).

2.2.1.3 Extracció de DNA d'una banda de gel d'electroforesi

Majoritàriament s'ha utilitzat el *kit* comercial *GENECLEAN*[®] de BIO 101 Inc.

1. Exposar el gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi a llum ultraviolada per visualitzar les diferents bandes de DNA.
2. Retallar la banda i introduir-la en un tub *ependorf* de pes conegut. El pes de la banda ha de ser inferior a 0,4 g.
3. Afegir 2,5 volums de solució de NaI 6 M.
4. Mantenir el tub a 55°C durant 5 minuts. Després de 2 minuts agitar el tub i tornar-lo a 55°C. Si passats els 5 minuts no s'ha desfet completament l'agarosa s'ha de mantenir el tub a 55°C.
5. Un cop s'ha desfet completament l'agarosa afegir 5 µl de la suspensió *GLASSMILK*[®]. Barrejar fins que el líquid estigui homogeni.
6. Mantenir el tub en gel durant un mínim de 5 minuts. Cal agitar-lo cada 1-2 minuts per evitar que les partícules en suspensió precipitin.
7. Centrifugar durant 30 segons i eliminar el sobrenedant.
8. Rentar el *pellet* tres vegades amb 500 µl de solució NEW, centrifugant durant 5-10 segons i ressuspenent bé el *pellet*. Després de l'últim rentat cal eliminar completament el sobrenedant.
9. Afegir 10 µl de TE o aigua Milli-Q i ressuspendre bé el *pellet*.
10. Mantenir a 55°C durant 3-5 minuts.

11. Centrifugar durant 30 segons. Recuperar el sobrenedant i passar-lo a un tub *eppendorf* nou.

Quan el DNA de la banda que es volia recuperar té una mida inferior a 1 kb, o quan es tractava d'un producte de PCR que es vol seqüenciar directament (sense clonar-lo en un plasmidi) s'han utilitzat les columnes del *kit GENE CLEAN[®] SPIN* de BIO 101 Inc. Després del punt 6 el protocol segueix els següents passos:

7. Un cop la banda d'agarosa s'ha dissolt es transfereix tota la solució a un tub que conté una columna amb un filtre de niló a la part inferior. Tots els rentats es realitzaran en aquesta columna.
8. Centrifugar durant 30 segons. El sobrenedant passa a través de la membrana fins al tub, mentre que el GLASSMILK[®] amb el DNA al qual s'ha unit hi queda retingut. Eliminar el sobrenedant.
9. Rentar el *pellet* tres vegades amb 500 µl de solució NEW, centrifugant durant 5-10 segons. Després de l'últim rentat cal eliminar bé el sobrenedant tornant a centrifugar durant 5-10 segons. Assecar el *pellet* deixant el tub obert durant 10 minuts a temperatura ambient.
10. Afegir 20-30 µl d'aigua Milli-Q prèviament escalfada a 55 °C per recuperar el DNA. Deixar a temperatura ambient durant 5 minuts.
11. Centrifugar durant 5-10 segons. En centrifugar el GLASSMILK[®] s'uneix a la membrana i el DNA passa a l'interior del tub.

2.2.2 Clonació de fragments de DNA

Alguns dels fragments de DNA obtinguts després de la digestió de fragments més grans de DNA o per PCR s'han clonat en cèl·lules d'*E. coli*. En el cas dels productes de PCR el vector de clonació ha estat el pGEM-T, del *kit* comercial *pGEM[®]-T vector System I* de Promega. En la resta de casos s'ha utilitzat el vector pBSK. El primer pas és la lligació, on s'uneixen les molècules d'insert i plasmidi linealitzat per formar un plasmidi circular. Posteriorment aquest plasmidi s'introdueix a cèl·lules d' *E. coli* (transformació). El protocol és el descrit per Sambrook *et al.* (1989) modificat.

2.2.2.1 Lligació

La reacció de lligació depèn del vector que s'utilitzi. Si el vector és el pBSK se segueixen els següents passos.

1. Si els extrems són roms és recomanable defosforilar els extrems del vector.
2. Afegir a un tub *eppendorf* x μ l d'insert, y μ l de vector digerit i aigua destil·lada estèril o Milli-Q fins arribar a un volum total de 10 μ l (x i y en una relació molar 3:1).
3. Mantenir a 65°C durant 5 minuts.
4. Mantenir en gel durant 10 minuts.
5. Afegir 1 μ l de tampó de lligasa 10x.
6. Afegir 1 μ l de lligasa.
7. Mantenir a 16°C durant tota la nit. Si hi ha més quantitat de DNA pot ser suficient mantenir el tub a temperatura ambient durant 2-3 hores.

Si el vector és el pGEM-T no és necessari fer els passos 3 i 4.

2.2.2.2 Transformació

1. Descongelar una alíquota (50-100 μ l) de cèl·lules competents en gel (5-10 minuts).
2. Afegir 5-10 μ l de la reacció de lligació i barrejar suaument.
3. Mantenir en gel durant 20-30 minuts.
4. Mantenir en un bany a 42°C durant 1 minut i 30 segons.
5. Mantenir en gel durant 5 minuts.
6. Afegir 1 ml de LB prèviament escalfat a 37°C i barrejar per inversió.
7. Mantenir a 37°C durant 1 hora.
8. Escampar 100-200 μ l amb una nansa de Digrafsky sobre una placa Amp/IPTG/X-Gal.
9. Mantenir a 37°C durant tota la nit.

Obtenció de cèl·lules competents

S'ha utilitzat la soca DH5 α d' *E. coli*.

1. Afegir una colònia aïllada a 3ml de LB i mantenir durant tota la nit a 37°C i en agitació (250-300 rpm).

2. Afegir a 20 ml de LB 0,2 ml del cultiu de nit i mantenir a 37°C i en agitació (250-300 rpm) fins que OD₅₅₀=0,4-0,5 (aproximadament 3 hores).
3. Mantenir el cultiu en gel durant 15-20 minuts.
4. Repartir en dos tubs de 10 ml.
5. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
6. Eliminar el sobrenedant. Ressuspendre les cèl·lules en CaCl₂ 50 mM fred (1/2 del volum inicial).
7. Mantenir en gel durant 45-60 minuts.
8. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
9. Eliminar el sobrenedant. Ressuspendre suaument les cèl·lules en CaCl₂ 50 mM fred (1/10 del volum inicial).
10. Mantenir 1 hora en gel.
11. Afegir glicerol fins a un 15% del volum final.
12. Repartir en alíquotes de 50 o 100 µl i guardar-les a -70°C fins al moment d'utilitzar-les.

2.2.3 Southern blotting

La transferència del DNA del gel d'agarosa a la membrana s'ha realitzat basant-se en el protocol descrit per Sambrook *et al.* (1989), mentre que pel revelat i el marcatge de les sondes s'ha utilitzat el *kit* comercial de Roche i el seu protocol.

S'han realitzat dos tipus d'hibridacions: homòlogues i heteròlogues. En les hibridacions homòlogues el DNA de la sonda i de la membrana són de la mateixa espècie, mentre que en les heteròlogues pertanyen a espècies diferents. Les temperatures d'hibridació i dels rentats posthibridació varien en funció del tipus d'hibridació.

2.2.3.1 Transferència del DNA a la membrana

Les transferències s'han realitzat amb DNA digerit amb diferents enzims de restricció. La quantitat de DNA variava entre els 300-400 ng quan procedia d'algun clon, i 1.000-2.000 ng quan es tractava de DNA genòmic. La transferència s'ha produït per capil·laritat i s'han utilitzat membranes de niló carregades positivament.

1. Un cop el gel d'agarosa està tenyit s'irradia amb llum ultraviolada i es fotografia. Es col·loca un regle fluorescent al costat per posteriorment poder comparar la

posició de les bandes a la membrana amb la del marcador de pes molecular del gel. El gel es divideix en tres regions, segons si inclouen les bandes amb major o menor pes molecular. La part que inclou el DNA de menor mida s'irradia durant 30 segons, la part que inclou les bandes de mida intermitja durant un minut i la part amb les bandes de major mida durant 1 minut i 30 segons.

2. El gel se submergeix en solució de desnaturalització (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) durant 1 hora, a temperatura ambient i en agitació suau.
3. Eliminar la solució de desnaturalització i afegir el mateix volum de solució de neutralització (0,5M Tris HCl pH 7,5; 1,5M Na Cl). Mantenir durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació suau.
4. Preparar un recipient ple amb 10xSSC. Col·locar damunt del recipient una plataforma. Damunt de la plataforma s'hi col·loca un full de paper *Whatman 3MM* prèviament mullat en la solució de 10xSSC, de manera que els seus extrems estiguin dins d'aquesta solució. Eliminar les bombolles que quedin entre el paper i la plataforma.
5. Col·locar el gel damunt del paper humit i eliminar les bombolles.
6. Preparar 100-200 ml de 2xSSC. Col·locar damunt del gel una membrana de niló de la mateixa mida que el gel i prèviament humitejada en el 2xSSC. Eliminar les bombolles.
7. Humitejar en 2xSSC dos o tres fulls de paper *Whatman 3MM* de la mateixa mida que el gel i col·locar-los damunt de la membrana. Eliminar les bombolles.
8. Col·locar damunt aquests fulls un feix de paper absorbent. Damunt seu s'hi col·loca un pes.
9. Aturar la transferència després de 12-20 hores.
10. Marcar a la membrana les posicions corresponents als pous del gel.
11. Submergir la membrana en 2xSSC durant 2-5 minuts a temperatura ambient i en agitació.
12. Deixar assecar la membrana a temperatura ambient.
13. Irradiar la membrana amb llum ultraviolada durant 2-3 minuts per cada costat per fixar el DNA.

2.2.3.2 Prehibridació i hibridació

1. Col·locar la membrana en un *roller* d'hibridació amb 20 ml de solució de prehibridació (5x SSC; 50% formamida; 0,1 % N-laurilsarcosina; 0,02% SDS; 2,5% agent bloquejant) escalfada a la temperatura d'hibridació. Mantenir en rotació durant 1-3 hores a la temperatura d'hibridació (42°C si la hibridació és homòloga i 37°C quan és heteròloga).
2. Desnaturalitzar la sonda escalfant-la a 95°C durant 10 minuts i posant-la ràpidament en gel durant un mínim de 3 minuts.
3. Eliminar la solució de prehibridació i afegir 10 ml de solució d'hibridació (solució de prehibridació amb 5-25 ng de DNA de sonda/ml). Mantenir en rotació durant 12-16 hores a la temperatura d'hibridació.

2.2.3.3 Posthibridació i detecció

1. Treure la membrana del *roller* i submergir-la en 2x SSC/0,1% SDS durant 15-20 minuts a temperatura ambient i en agitació. Repetir el rentat.
2. Submergir la membrana en 0,1x SSC/0,1% SDS durant 20 minuts a 68°C (en les hibridacions homòlogues) o a 50°C (en les hibridacions heteròlogues) i en agitació. Repetir el rentat.
3. Rentar la membrana durant 1-5 minuts amb tampó 1 (0,1M àcid maleic; 0,15M NaCl; pH 7,5).
4. Mantenir durant 30 minuts en tampó 2 (1% d'agent de bloqueig en tampó 1).
5. Mantenir durant 30 minuts en tampó 2 amb anti-DIG-AP conjugat (1:5.000).
6. Rentar dos cops durant 15 minuts amb tampó 1.
7. Equilibrar durant 2-5 minuts amb tampó 3.
8. Eliminar el tampó 3 i afegir solució colorimètrica (200 µl en 10 ml de tampó 3). Mantenir a temperatura ambient i a la foscor durant 30 minuts-20 hores.
9. Eliminar la solució colorimètrica. Rentar amb aigua destil·lada (15 minuts-2 hores en agitació a temperatura ambient).

2.2.3.4 Marcatge de les sondes

Les sondes s'han marcat amb DIG-dUTP amb el mètode de *random primer*. S'ha utilitzat el *DIG Nucleic Acid Detection Kit* de Roche.

1. Desnaturalitzar el DNA mantenint-lo durant 10 minuts a 100°C i posant-lo ràpidament en gel durant 5 minuts.
2. Afegir a x µl de DNA: 2 µl de mescla d'hexanucleòtids, 2 µl de mescla de dNTPs, 1 µl d'enzim *Klenow*, i aigua destil·lada estèril o Milli-Q fins a un volum de 20 µl.
3. Mantenir a 37°C durant 1-20 hores.
4. Afegir 2 µl de EDTA 0,2M pH 8.
5. Afegir 2,5 µl de LiCl 4M.
6. Afegir 75 µl d'etanol absolut a -20°C. Mantenir durant un mínim de 2 hores a -20°C o 30 minuts a -70°C.
7. Centrifugar durant 15 minuts. Eliminar el sobrenedant.
8. Afegir 50 µl d'etanol 70% a -20°C.
9. Centrifugar 5 minuts i eliminar el sobrenedant.
10. Assecar el *pellet* al buit.
11. Ressuspensar el *pellet* en 50 µl de TE o aigua Milli-Q.
12. Guardar a -20°C.

2.2.4 Hibridació *in situ*

El protocol utilitzat s'ha basat en el descrit per Montgomery *et al.* (1987) amb algunes modificacions.

S'han realitzat dos tipus d'hibridacions: homòlogues i heteròlogues. En les hibridacions homòlogues el DNA de la sonda i de la preparació són de la mateixa espècie, mentre que en les heteròlogues pertanyen a espècies diferents. Les temperatures d'hibridació varien en funció del tipus d'hibridació.

2.2.4.1 Preparacions cromosòmiques

Seleccionar una larva que es trobi entre el segon i el tercer estadi de desenvolupament.

1. Col·locar-la en un portaobjectes i afegir-hi una gota d'una solució fresca d'àcid acètic 45%.
2. Disseccionar la larva i extreure les glàndules salivals, eliminant el greix que les envolta.
3. Posar les glàndules salivals en una gota de solució d'àcid acètic /aigua destil·lada/àcid làctic en proporció 3:2:1 col·locada sobre un cobreobjectes.
4. Deixar caure lentament un portaobjectes sobre el cobreobjectes.
5. Localitzar amb el microscopi de contrast de fases la zona on es troben els cromosomes.
6. Girar el cobreobjectes i colpejar suaument amb algun objecte punxegut fins que els cromosomes estigui ben separats.
7. Aixafar fent força especialment sobre la zona on es troben els cromosomes. Comprovar amb el microscopi que han quedat ben aixafats.
8. Deixar en posició horitzontal durant tota una nit.
9. Submergir les preparacions en nitrogen líquid durant 8-10 segons i treure el cobreobjectes. Es pot utilitzar una fulla d'afaitar.
10. Submergir la preparació en etanol 95% durant 15 minuts.
11. Deixar assecar a temperatura ambient i guardar a 4°C.

Els portaobjectes i cobreobjectes s'han de tractar abans d'utilitzar-los.

a) Tractament dels portaobjectes

1. Bullir àcid clorhídric 1N en un vas de precipitats.
2. Col·locar-hi 20 portaobjectes durant 5 minuts.
3. Rentar amb aigua destil·lada.
4. Assecar a temperatura ambient durant 1 hora.
5. Submergir els portaobjectes en solució SSC Denhart (0,12 g PVP; 0,12 g Ficoll; 0,12 g BSA; 90 ml 20xSSC; 600 ml d'aigua destil·lada) a 65°C durant 2-3 hores.
6. Rentar els portaobjectes submergint-los en una solució d'etanol/àcid acètic glacial (3:1) durant 20 minuts.
7. Fer aproximadament 10 rentats de 2 segons en etanol 95%.
8. Assecar a temperatura ambient.
9. Guardar a 4°C.

b) Tractament dels cobreobjectes

1. Bullir àcid clorhídric 1N en un vas de precipitats.
2. Col·locar-hi 80-100 cobreobjectes durant 5 minuts.
3. Rentar amb aigua destil·lada.
4. Rentar un a un els cobreobjectes amb etanol absolut.
5. Deixar assecar a temperatura ambient.
6. Passar un a un els cobreobjectes per una solució Repel-Silane (20g/l de dimetildiclorosilà en 1,1,1-triclorometà).
7. Rentar un a un els cobreobjectes amb etanol absolut.
8. Deixar assecar i guardar a temperatura ambient.

2.2.4.2 Sondes

A la primera part del treball s'han hibridat sondes procedents de *D. melanogaster* i *D. virilis* sobre cromosomes de *D. buzzatii* i *D. repleta*. En aquests casos sempre s'ha fet una hibridació control sobre cromosomes de l'espècie d'origen. Aquestes sondes són de quatre tipus diferents: gèniques, cosmidis, bacteriòfags P1 i un cromosoma artificial de llevat (YAC).

Les sondes dels gens les han proporcionat diferents autors, excepte en el cas dels gens *α -Est1* i *Pli*, que s'han obtingut per PCR. Totes provenen de *D. melanogaster* excepte la del gen *ro*, que prové de *D. virilis*. A la taula següent se n'especifiquen les característiques.

Taula 7. Sondes gèniques utilitzades en aquest treball.

Gen	Localització	Nom del clon	Tipus de clon	Mida de l'insert	Referència
<i>α-Est1</i>	84D3-10	pGPE200	Genòmic	1,9 kb	Aquest treball
<i>Pli</i>	95C7-9	Pli	Genòmic	1,6 kb	Aquest treball
<i>Ppp</i>	97D	5-8	cDNA	3,9 kb	D. Siekhaus (com. personal)
<i>Rb97D</i>	97D5	Rb97D	Genòmic	8 kb	Karsch-Mizrachi i Haynes (1993)
<i>ro</i>	97D5	pvirSal	Genòmic	9 kb	Heberlein i Rubin (1990)
<i>Toll</i>	97D2	pTl	cDNA	5,1 kb	Hashimoto <i>et al.</i> (1998)
<i>T48</i>	97D9	pNB48.1	cDNA	2,5 kb	Strutt i White (1994)

Els cosmidis són plasmidis híbrids amb un lloc *cos* a cada extrem. Aquests llocs *cos* són reconeguts en el procés d'empaquetament dels caps dels bacteriòfags λ . Els cosmidis utilitzats en aquest treball formen part del mapa físic realitzat dins de l'*European Drosophila Genome Project* per un consorci europeu de laboratoris (Sidén-Kiamos *et al.* 1990; Kafatos *et al.* 1991). La mida dels inserts és de 30-50 kb, i estan clonats en el vector *Lorist 6* (Gibson *et al.* 1987). S'han utilitzat 8 cosmidis de *D. melanogaster* (Taula 9, Resultats).

S'han hibridat 45 bacteriòfags P1 procedents de *D. melanogaster* (Taula 9, Resultats) i 12 procedents de *D. virilis* (Taula 11, Resultats). En el cas dels bacteriòfags P1 de *D. melanogaster* els inserts tenen una mida mitja aproximada de 80 kb i estan clonats en dos vectors diferents: PNS583tet14Ad10 i pAd10sacBII (Kimmerly *et al.* 1996). Aquests bacteriòfags formen part del *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP). Els bacteriòfags P1 de *D. virilis* tenen una mida mitja de 65,8 kb i estan clonats en el vector pAd10sacBII (Lozovskaya *et al.* 1993; Vieira *et al.* 1997b).

Per últim s'ha hibridat un YAC (DY852) procedent d'una genoteca de *D. melanogaster* amb un mida mitja de 211 kb (Cai *et al.* 1994).

A la segona i la tercera part del treball s'han hibridat sondes de *D. buzzatii* generades en aquest treball. Concretament, a la segona part s'han hibridat bacteriòfags λ obtinguts després de rastrejar genoteques i fragments d'aquests bacteriòfags subclonats en vectors plasmídics. A la tercera part s'han hibridat sondes de diferents elements transposables obtingudes per PCR i clonades en vectors plasmídics.

2.2.4.3 Marcatge de les sondes

Les sondes s'han marcat amb biotina-16-dUTP. Totes les sondes s'han marcat pel procediment de *nick translation* excepte el YAC DY852 que, degut a la baixa quantitat de DNA que s'obtenia, s'ha marcat seguint el procediment de *random primer*.

a) Nick translation

1. Afegir en un *eppendorf* 500 ng de DNA de la sonda i completar amb aigua destil·lada estèril o Milli-Q fins a un volum de 16 μ l.
2. Afegir 2,5 μ l de tampó de la reacció de marcatge (100mM DTT; 100 mM Cl_2Mg ; 500 mM TrisHCl pH 8; 1 μ g/ μ l de gelatina).
3. Afegir 3,75 μ l de mescla de nucleòtids no marcats (5 mM dATP, 5 mM dCTP, 5mM dGTP).
4. Afegir 1,25 μ l de biotina-16-dUTP.
5. Afegir 1 μ l de DNAasa (1 mg/ml) a 400 μ l de SM gel (6mM NaSO_4 ; 0,099 NaCl; 0,05 M Tris HCl pH 7,5; 0,1 μ g/ml de gelatina). Afegir 1 μ l d'aquesta solució a la mescla de marcatge.
6. Afegir 0,5 μ l de polimerasa I (5U/ μ l).
7. Mantenir a 12-14°C durant 90-120 minuts.
8. Afegir 1,5 μ l de EDTA 0,5M pH 8.
9. Mantenir a 65°C durant 5 minuts.
10. Afegir 2,9 μ l de NaOAc 3M i 58 μ l d'etanol absolut fred.
11. Mantenir un mínim de 2 hores a -20°C.
12. Centrifugar a 4°C durant 15 minuts.
13. Ressuspendre el *pellet* en 20-80 μ l de solució d'hibridació (2x SSC; 200 μ l dextrà sulfat 50 %; 80 μ l DNA d'esperma de salmó a 5mg/ml; 50% formamida).

b) *Random primer*

S'ha seguit el mateix procediment descrit a l'apartat 2.2.3.4 amb la següent composició de la mescla de reacció: fins a 9 µl de DNA (100 ng és la quantitat òptima), 2 µl de mescla d'hexanucleòtids, 2 µl de dATP (1mM), 2 µl de dCTP (1mM), 2 µl de dGTP (1mM), 2 µl de biotina-16-dUTP, 1 µl d'enzim Klenow i aigua Milli-Q fins arribar a 20 µl. A partir d'aquest moment es procedeix com a partir del punt 3 de l'apartat 2.2.3.4.

2.2.4.4 Prehibridació i hibridació

1. Submergir les preparacions en 2x SSC a 65°C durant 30 minuts.
2. Posar les preparacions en una cubeta amb etanol al 70% durant 5 minuts.
3. Passar-les a una altra cubeta amb etanol al 70% durant 5 minuts més.
4. Passar-les a una altra cubeta amb etanol al 95 % durant 5 minuts.
5. Assecar a temperatura ambient.
6. Col·locar les preparacions en una cubeta amb solució de desnaturalització (NaOH 0,07 N) durant 2 minuts.
7. Passar les preparacions a una cubeta amb 2x SSC durant 5 minuts. Repetir-ho dos cops més.
8. Posar les preparacions en una cubeta amb etanol al 70% durant 5 minuts.
9. Passar-les a una altra cubeta amb etanol al 70% durant 5 minuts més.
10. Passar-les a una altra cubeta amb etanol al 95 % durant 5 minuts.
11. Assecar a temperatura ambient.
12. Mantenir el volum de sonda que es vulgui utilitzar a 65°C durant 5 minuts.
13. Mantenir la sonda en gel fins al moment de la seva utilització.
14. Afegir 20 µl de sonda a la zona on es troben els cromosomes de cada preparació cromosòmica.
15. Col·locar un cobreobjectes damunt la zona on s'ha afegit la sonda. Eliminar les bombolles que es formin.
16. Col·locar les preparacions en una cambra humida i mantenir a 37°C (a les hibridacions homòlogues) o a 25°C (a les hibridacions heteròlogues).

2.2.4.5 Posthibridació i revelat

1. Col·locar les preparacions en una cubeta amb 2x SSC escalfat a 37°C i treure els cobreobjectes.
2. Mantenir les preparacions en 2x SSC a 37°C durant deu minuts. Repetir-ho una vegada.
3. Passar les preparacions a una cubeta amb 2xSSC i mantenir-les a temperatura ambient durant 10 minuts. Repetir-ho una vegada.
4. Passar les preparacions a una cubeta amb 1xPBS (1,3M NaCl; 0,07M Na₂HPO₄·12H₂O; 0,03M NaH₂PO₄·H₂O) durant 5 minuts.
5. Afegir a 0,210 µl de solució I (4% d'albumina de sèrum boví en Tris 50 mM pH 7,6) 3,5 µl de reactiu A i 3,5 µl de reactiu B del *kit* Vectastain[®] ABC Elite dels laboratoris *Vector*.
6. Afegir a la zona on es troben els cromosomes 20 µl de la solució anterior.
7. Col·locar un cobreobjectes a la zona on s'ha afegit la solució.
8. Posar les preparacions en una cambra humida i mantenir-les a 37°C durant 45 minuts.
9. Passar les preparacions a una cubeta amb 1xPBS i treure el cobreobjectes. Mantenir-ho a temperatura ambient durant 10 minuts. Repetir el procediment dues vegades.
10. Afegir a cada preparació 500 µl de solució III (0,006 g de diaminobencidina i 21,8 µl de H₂O₂ 33% en 12 ml de TrisHCl 50mM).
11. Col·locar un cobreobjectes damunt de la zona on s'ha afegit la solució III.
12. Mantenir a 37°C durant 45 minuts.
13. Posar les preparacions en una cubeta amb 1xPBS durant 5 minuts. Treure el cobreobjectes.
14. Preparar la solució de tinció, afegint 1 ml de Giemsa per cada 20 ml de tampó P (40% de NaH₂PO₄·H₂O 50 mM; 60% de Na₂HPO₄·12H₂O 50 mM).
15. Posar les preparacions en solució de tinció durant 1 minut.
16. Rentar les preparacions posant-les en una cubeta amb aigua destil·lada, realitzant banys curts durant 10 segons. Repetir el procediment una vegada.
17. Assecar les preparacions a temperatura ambient.
18. Afegir a cada preparació una gota de muntador de preparacions biològiques i col·locar un cobreobjectes.
19. Guardar a 4°C.

2.2.4.6 Localització dels senyals d'hibridació

Les preparacions cromosòmiques s'han observat amb un microscopi Nikon Optiphot-2. Els senyals d'hibridació mostren un color rosat o blau intens que contrasta amb el color blau-lila dels cromosomes.

Per poder determinar amb precisió la banda o bandes en les que s'observen els senyals d'hibridació s'han utilitzat els mapes de *D. melanogaster* de Lefevre i Bridges (Bridges 1935; Lindsley i Zimm 1992), i per a les espècies del grup *repleta* el mapa de *D. repleta* de Wharton (1942) i una reconstrucció del mapa de *D. buzzatii* basada en el mapa de *D. repleta* (Ruiz i Wasserman 1993). Per a *D. virilis* s'han utilitzat els mapes de Kress (1993) i de Gubenko i Evgen'ev (1984). S'han fet fotografies de les preparacions cromosòmiques obtingudes utilitzant el microscopi Nikon Optiphot-2 a 600 augments. Per això s'han utilitzat les pel·lícules Ektar-25 i Royal Gold 25 ASA i 100 ASA de Kodak, i la pel·lícula Agfa Ultra 50 ASA.

2.2.4.7 Localització dels marcadors sobre la seqüència de *D. melanogaster*

La posició dels gens sobre la seqüència de *D. melanogaster* s'ha pogut establir inequívocament. En el cas dels bacteriòfags P1 la seva localització s'ha calculat en funció de les STS que contenen. Les STS són petites seqüències derivades dels extrems d'alguns bacteriòfags P1, que permeten ordenar els bacteriòfags P1 segons les continguin o no. Si el bacteriòfag P1 només conté una STS en un dels seus extrems, i existeix informació sobre la seva orientació, s'ha calculat que el clon mesura 80 kb a partir de la STS de l'extrem i en la direcció indicada. Si no existeix informació sobre la seva informació, o si no conté cap STS als seus extrems s'ha calculat el punt mig de les STS que conté i s'ha considerat que el clon mesura 80 kb. En el cas dels cosmidis s'ha considerat la seva localització per hibridació *in situ* i quin gen es troba enmig de les bandes on es troba. S'ha considerat aquest gen com el seu punt mig i que el clon mesura 40 kb.

2.2.5 Genoteques

S'ha construït una genoteca de la soca jq⁷-4 utilitzant com a vector el bacteriòfag LambdaGEM[®]-11 basant-se en les instruccions descrites al *Genomic cloning manual* de Promega. Una genoteca de la soca j-19 construïda anteriorment (Cáceres *et al.* 2001) es va amplificar seguint el procediment descrit per Sambrook *et al.* (1989). Les dues genoteques s'han rastrejat segons el protocol descrit a Sambrook *et al.* (1989).

2.2.5.1 Construcció

a) Digestió del DNA genòmic

1. Extreure DNA genòmic de la soca a partir de la qual es vol construir la genoteca seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.1.1.
2. Preparar una mescla que contingui aproximadament 10 µg de DNA genòmic i 45 µl de tampó B (és el tampó òptim per *Sau3A*, l'enzim que s'utilitzarà) en un volum final de 450 µl. Repartir en 10 alíquotes de 45 µl.
3. Preparar una mescla (mescla de dilució) que contingui 150 µl de tampó B i 1,35 ml d'aigua Milli-Q. Mantenir aquesta mescla en gel.
4. Preparar diferents dilucions de l'enzim *Sau3A* (a 3U/µl) en la mescla de dilució (1/15; 1/150; 1/300; 1/600; 1/900; 1/1.200; 1/1.500; 1/1.800; 1/3.000; 1/4.500). Mantenir en gel.
5. Afegir a cadascuna de les mescles de DNA genòmic una de les anteriors dilucions de l'enzim. D'aquesta manera s'obtenen les següents concentracions d'unitats d'enzim per µg de DNA: 1; 0,1; 0,05; 0,025; 0,015; 0,0125; 0,0100; 0,0085; 0,0050; 0,0035).
6. Mantenir a 37°C durant 45 minuts.
7. Comprovar 10-20 µl de cada digestió en un gel d'agarosa. Determinar quina és la quantitat d'enzim que produeix la màxima intensitat de fluorescència en la zona on es troben la bandes amb la mida desitjada (és la mida que volem que tinguin els inserts, en aquest cas 15-20 kb).
8. Preparar una digestió a gran escala amb 50-100 µg de DNA genòmic en les condicions que abans hem considerat òptimes.
9. Mantenir a 37°C durant 45 minuts. Aturar la reacció i comprovar 10-20 µl en un gel d'agarosa.

10. Carregar tota la mostra en un gel d'agarosa i extreure el DNA contingut a la zona on es troben les bandes amb la mida desitjada (2.2.1.3). Diluir el DNA en aigua Milli-Q.

b) Lligació i empaquetament

1. Concentrar el DNA obtingut després de l'extracció de la banda del gel d'agarosa centrifugant al buit fins obtenir un volum aproximat de 6 µl.
2. Preparar una reacció de lligació que inclourà: 6 µl de DNA, 2 µl de vector (inclou els dos braços separats per una digestió amb l'enzim *BamHI*), 1 µl del tampó de la lligasa i 1 µl de lligasa.
3. Mantenir a temperatura ambient durant 3 hores.
4. Afegir tot el volum de la reacció de lligació a una alíquota de 50 µl del *kit* d'empaquetament (Packagene[®] Extract).
5. Mantenir a temperatura ambient (22°C) durant 3 hores.
6. Afegir 445 µl de tampó de fags (100mM NaCl; 10mM MgSO₄; 20mM TrisHCl pH 7,4) i 25 µl de cloroform. Agitar suaument per inversió.
7. Titular la genoteca sembrant diferents dilucions en tampó de fags segons la fórmula: (nº de calbes x factor de dilució)/volum sembrat. (la sembra de plaques de la genoteca s'explica a l'apartat 2.2.5.2).

2.2.5.2 Amplificació

1. Si la genoteca no ha estat utilitzada recentment cal tornar a titular-la.
2. Mantenir a 37°C i en agitació (250-300 rpm) durant un mínim de 8-10 hores un cultiu d'una colònia de la soca LE d'*E. coli* en 3 ml de LB (maltosa 0,2 %; 0,01M MgSO₄).
3. Preparar un volum mínim de 1,1 ml de la genoteca a la dilució necessària per produir plaques plenes de calbes de lisi.
4. Col·locar volums de 100 µl del cultiu d' *E. coli* en 11 tubs de 5 ml. Afegir a cada tub 100 µl de la dilució de la genoteca.
5. Mantenir a 37°C durant 20-30 minuts.
6. Escalfar a 46°C un recipient amb LB Top-Agar (1g de Bacto[®]-tryptone; 0,5g de Bacto[®]-yeast extract; 0,5g NaCl; 0,6g d'agarosa en 100 ml).

7. Afegir 3 ml de LB Top-Agar a cada tub, agitar suaument per inversió i escampar damunt una placa de LB-agar.
8. Mantenir a 37°C durant 10-12 hores.
9. Comprovar que ha aparegut el nombre esperat de calbes a les plaques i afegir a cada placa 2,5 ml de tampó SM (100mM NaCl; 8mM MgSO₄; 50 mM TrisHCl pH 7,5; 0,01% gelatina).
10. Mantenir a 4°C durant un mínim de 12 hores.
11. Agitar les plaques suaument durant 1-2 hores.
12. Recuperar el tampó SM de les plaques i passar-lo a un tub estèril.
13. Afegir 1 ml de tampó a cada placa i mantenir-les lleugerament inclinades durant 15 minuts.
14. Recuperar el líquid de les plaques. Repartir en tubs de 10 ml.
15. Afegir a cada tub 150 µl de cloroform i agitar suaument per inversió.
16. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
17. Ajuntar el sobrenedant de tots els tubs i afegir 200 µl de cloroform.
18. Agitar suaument per inversió i guardar a 4°C (cal titular-la abans d'utilitzar-la).

2.2.5.3 Rastreig

1. Calcular el nombre de fags necessaris per assegurar-nos de què la seqüència que es vol trobar hi estarà representada. S'utilitza la formula: $\ln(1-P)/\ln(1-f)$, on P és la probabilitat de què la seqüència estigui representada en els clons que es rastrejaran i f la fracció del genoma present a cada clon. Per *D. buzzatii* suposem una mida del genoma similar a la d'una espècie propera, *D. arizonensis*, que és de 220 Mb (Schulze i Lee 1986).
2. Sembrar plaques de LB amb la soca LE d'*E. coli* infectada amb la dilució adequada de la genoteca com està descrit a l'apartat 2.2.5.2.
3. Mantenir a 37°C durant tota la nit.
4. Guardar les plaques a 4°C durant un mínim de 2 hores.
5. Preparar membranes de niló amb la mateixa mida que les plaques.
6. Col·locar les membranes damunt de les calbes durant 3 minuts. Fer marques a la placa i al filtre en la mateixa posició, foradant-los amb una agulla.
7. Assecar les membranes a temperatura ambient i guardar les plaques a 4°C.

8. Col·locar les membranes, amb la part on s'ha transferit el DNA cap a dalt, damunt un full de paper *Whatman 3MM* humitejat amb solució de desnaturalització (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) durant 5 minuts.
9. Col·locar les membranes damunt un full de paper *Whatman 3MM* humitejat amb solució de neutralització (0,5M Tris HCl pH 7,5; 1,5M Na Cl) durant 5 minuts.
10. Col·locar les membranes damunt un full de paper *Whatman 3MM* humitejat amb 2x SSC durant 15 minuts.
11. Assecar les membranes a temperatura ambient.
12. Irradiar la membrana amb llum ultraviolada durant 2-3 minuts per cada costat per fixar el DNA.
13. La prehibridació, hibridació, detecció i el marcatge de les sondes són els mateixos que els utilitzats en el *Southern blotting* (2.2.3.2, 2.2.3.3 i 2.2.3.4).

Recuperació dels fags positius i preparació de lisats

1. Identificar els fags positius amb l'ajut dels senyals que s'han fet a les plaques i les membranes.
2. Recuperar-los amb una pipeta *Pasteur* i passar-los a un tub *ependorf* amb 500 µl de tampó SM i 20 µl de cloroform.
3. Mantenir a temperatura ambient durant 1 hora o a 4°C durant tota la nit.
4. Infectar un cultiu de la soca LE d' *E. coli* amb vàries dilucions de cada fag i sembrar plaques de LB com s'ha descrit a l'apartat 2.2.5.2.
5. Mantenir a 37°C durant tota la nit.
6. Escollir la placa que presenti el nombre adequat de calbes per cada fag per tornar a rastrejar-les (apartat 2.2.5.3).
7. Recuperar els fags positius amb una pipeta *Pasteur* i passar-los a un tub *ependorf* amb 300 µl de tampó SM i 15 µl de cloroform. Aquest pas permet aïllar fags positius que no estiguin contaminats amb fags de calbes properes i assegurar-nos de què realment són positius.
8. Mantenir a temperatura ambient durant 1 hora o a 4°C durant tota la nit.
9. Infectar un cultiu de la soca LE d' *E. coli* amb algunes dilucions de cada fag i sembrar plaques de LB com s'ha descrit a l'apartat 2.2.5.2. L'objectiu és tenir alguna calba completament aïllada.
10. Recuperar una d'aquestes calbes amb una pipeta *Pasteur* i passar-la a un tub *ependorf* amb 300 µl de tampó SM i 15 µl de cloroform.

11. Infectar un cultiu de la soca LE d' *E. coli* amb vàries dilucions de cada fag i sembrar plaques de LB com s'ha descrit a l'apartat 2.2.5.2. L'objectiu és aconseguir plaques completament lisades.
12. Afegir 2,5 ml de tampó a les plaques completament lisades.
13. Mantenir a 4°C durant un mínim de 12 hores.
14. Agitar les plaques suaument durant 1-2 hores.
15. Recuperar el tampó SM de les plaques i passar-lo a un tub estèril.
16. Afegir 1 ml de tampó a cada placa i mantenir-les lleugerament inclinades durant 15 minuts.
17. Recuperar el líquid de les plaques. Posar-lo en tubs de 10 ml.
18. Afegir a cada tub 50 µl de cloroform i agitar suaument per inversió.
19. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
20. Passar el sobrenedant a un tub nou i afegir 50 µl de cloroform. Guardar a 4°C. Abans d'utilitzar cada fag s'haurà de titular aquest lisat. L'extracció de DNA s'explica a l'apartat 2.2.1.2.d.

2.2.6 PCR

Les reaccions de PCR s'han dut a terme en un volum de 50 µl amb la següent composició: 50-200 ng de DNA, 20 pmols de cada oligonucleòtid, 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ i 1-1,5 unitats de TaqDNA polimerasa. Les condicions d'amplificació van ser: 5 minuts a 94°C/1 minut a la temperatura d'aparellament (depenent de la parella d' oligonucleòtids)/1minut a 72°C; 30 segons a 94°C/1 minut a la temperatura d'aparellament /1minut a 72°C (25-30 cicles); 9 minuts a 72 °C. Per a l'amplificació dels fragments A1-B1 i C1-D1 a *D. koepferae* la temperatura d'aparellament va ser de 54°C.

En les PCRs realitzades per obtenir els gens *α-EstI* i *Pli* es va utilitzar DNA de la soca Canton S de *D. melanogaster*. En les PCRs fetes per obtenir DNA dels punts de trencament de la inversió *2q⁷* es va utilitzar DNA de diferents soques de *D. buzzatii* i de *D. koepferae*. En el cas de les PCRs realitzades per obtenir sondes dels elements transposables es va utilitzar DNA de la soca st-1 de *D. buzzatii* i plasmidis on estaven subclonats aquests elements (Cáceres, comunicació personal).

Per dissenyar els oligonucleòtids i calcular la temperatura d'aparellament s'ha utilitzat el programa *Primer designer1.01* (1990 Scientific and Educational Software). Els oligonucleòtids utilitzats es mostren a la següent taula.

Taula 8. Oligonucleòtids utilitzats.

Nom	Seqüència (5' - 3')	Parelles
e1left	CGATTGTTCTGGTTCAT	e1right
e1right	TTAGCAATCACGACTTGG	e1left
Pli1	CAGCATTCAATCTCGTAC	Pli2
Pli2	TGAGGTATCTCCACATTG	Pli1
A1	GTGAATAACTCGTGCGTGTA	B1, C1, T1, T2
B1	TTGCGGACGCGATAATGTTAA	A1, D1, T4, T5, T7
C1	GAGGAAACACTCATTGTCTCA	A1, D1, T3
D1	GTATGAAGTGACTGGTGATCA	B1, C1, T3, T6, T8, T9
T1	GCAGCAGCTTACCTGATATG	A1
T2	TTCCAGTTGTCCAGTCTATGT	A1
T3	TTGTTCCAGTTGTCCAGTCTA	C1, D1
T4	GTGTTACTCAATCGTGTGTTG	B1
T5	CGAGCAAATACGAAGATGACT	B1
T6	TGTTCCAGTTGTCCAGTCTAT	D1
T7	GATATAGCGCTTATGGAGTAC	B1
T8	CTTATCCACGAATCATTTCAG	D1, E14
T9	AACGAGTGATGTGTCAAACG	D1
E1	CAGTGATGCCAACTTGTCT	E2
E2	TAGGCAAACTGTCCGTAA	E1

E3	CAGTGCTGCCAACAATTTGT	E4
E4	CACTGCTGCCAATTTAGCTA	E3
E6	TAGAGCTGGCAAACACTATCGA	E6
E8	TAGTGCTGGGAAAAGATCGA	E8
E9	CACGATTGAGTAACACTAGG	E10
E10	CACTGTAAAAGACTCAGTAG	E9
E11	CAGTGTTTGAAAAGCAAAGC	E12
E12	CAGTGTTAAAAAACTGCGA	E11
E14	CACTAACCATACAACACATAG	T8

2.2.7 Seqüenciació de DNA

Els fragments de DNA clonats en els vectors pBSK o pGEM-T s'han seqüenciat utilitzant els oligonucleòtids universals M13 directe i revers. Els productes de PCR obtinguts a partir d'una banda d'un gel d'agarosa s'han seqüenciat amb els mateixos oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació. La seqüenciació s'ha realitzat amb un seqüenciador ABI 373 A (Perkin-Elmer) al Servei de Seqüenciació de la Universitat Autònoma de Barcelona.

2.3 Anàlisi de les dades

2.3.1 Estima de les taxes d'evolució cromosòmica

S'han cartografiat a *D. repleta* i *D. buzzatii* marcadors procedents de quatre regions cromosòmiques de *D. melanogaster*. S'ha comptabilitzat el nombre de punts de trencament observats en cada regió, i a partir d'aquests resultats s'ha obtingut una estima de la taxa de fixació d'inversions. Segons González *et al.* (2000), si se suposa que els punts de trencament es distribueixen a l'atzar per tot el cromosoma, la probabilitat de què un punt de trencament es trobi dins d'una regió determinada és el mateix que la seva longitud relativa ($l = L_R/L_T$, on L_R és la longitud de la regió i L_T és la

longitud de tot el cromosoma). Si s'han fixat N punts de trencament en tot el cromosoma, la probabilitat de trobar N_R punts de trencament en una determinada regió segueix una distribució binomial $[l + (1-l)]^N$, amb una valor mig de $N l$ i variança $N l (1-l)$. La densitat de punts de trencament en una regió és $d = N_R/L_R$. El nombre de punts de trencament fixats en tot el cromosoma es pot estimar com $N = N_R/l$. La variança d'aquestes estimes s'obté de : $\text{Var} (d) = (1/L_R)^2 N_R(1-l)$; $\text{Var} (N) = (1-l)^2 N_R (1-l)$ (González *et al.* 2000).

2.3.2 Anàlisi de seqüències nucleotídiques

Les seqüències nucleotídiques s'han analitzat amb programes inclosos dins del Wiscosin Package (Genetics Computer Group) i amb el programa Gene Tool Lite 1.0 (Biotoools Incorporated). Les cerques de similitud amb altres seqüències incloses a les bases de dades de GenBank/EMBL s'han realitzat amb les funcions Blastx, Tblastx i Fasta. L'alineament de les seqüències s'ha fet amb el programa ClustalW (Thompson *et al.* 1994), i l'anàlisi de la variabilitat nucleotídica amb el programa DnaSP ver 3.51 (Rozas i Rozas 1999).

2.3.3 Distribució cromosòmica dels elements transposables

Per a l'anàlisi de la distribució cromosòmica dels elements transposables s'ha comparat el número observat de còpies d'elements transposables a cada cromosoma o regió cromosòmica amb l'esperat segons un repartiment aleatori dels elements. Per fer-ho s'han realitzat diferents proves de χ^2 utilitzat el programa Statistica'99.

2.3.4 Associació entre elements transposables i punts de trencament d'inversions cromosòmiques

S'ha considerat que la localització d'un element transposable i un punt de trencament d'una inversió cromosòmica coincidia quan s'han assignat a la mateixa banda cromosòmica. El número esperat de bandes cromosòmiques compartides pels elements transposables i els punts de trencament es pot calcular amb: $N_1 N_2/N$, on N_1 és el número d'insercions d'un element, N_2 el número de punts de trencament, i N és el

número de bandes cromosòmiques. La probabilitat de què el número de bandes compartides (C) sigui igual o més gran a l'observat és (Zelenstova *et al.* 1999):

$$P = 1 - \sum_{C=0}^{C_{\text{obs}}-1} \binom{N_1}{N_2}^{-1} \binom{N_2}{C} \binom{N-N_2}{N_1-C}$$

Per al càlcul d'aquestes probabilitats s'ha utilitzat el programa Mathematica 4.2.