



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i Microbiologia

**Estudio de la inestabilidad genómica inducida por
transposición en los híbridos interespecíficos de
Drosophila buzzatii y *Drosophila koepferae***

Doris Jimena Vela Peralta

Barcelona, 2011

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Doris Jimena Vela Peralta, para la obtención del título de Doctora en Genética que otorga la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, diciembre de 2011

Este estudio ha sido realizado bajo la dirección de los doctores Antonio Fontdevila Vivanco, Catedrático Emérito y María del Pilar García Guerreiro, Profesora agregada del Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona, quienes certifican que:

El trabajo de investigación con el título: “Estudio de la inestabilidad genómica inducida por transposición en los híbridos interespecíficos de *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae*” es original y cumple con las normas establecidas.

Dr. Antonio Fontdevila Vivanco

Dra. María del Pilar García Guerreiro

Bellaterra, diciembre de 2011

Itaca

Konstantinos Kavafis

Cuando partas hacia Itaca
pide que tu camino sea largo
y rico en aventuras y conocimiento.

A Lestrigones, Cíclopes
y furioso Poseidón no temas,
en tu camino no los encontrarás
mientras en alto mantengas tu pensamiento,
mientras una extraña sensación
invada tu espíritu y tu cuerpo.

A Lestrigones, Cíclopes
y fiero Poseidón no encontrarás
si no los llevas en tu alma,
si no es tu alma que ante ti los pone.

Pide que tu camino sea largo.
Que muchas mañanas de verano hayan en tu ruta
cuando con placer, con alegría
arribes a puertos nunca vistos.

Detente en los mercados fenicios
para comprar finos objetos:
madreperla y coral, ámbar y ébano,
sensuales perfumes, -tantos como puedas-
y visita numerosas ciudades egipcias
para aprender de sus sabios.

Lleva a Itaca siempre en tu pensamiento,
llegar a ella es tu destino.

No apresures el viaje,
mejor que dure muchos años
y viejo seas cuando a ella llegues,
rico con lo que has ganado en el camino
sin esperar que Itaca te recompense.

A Itaca debes el maravilloso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino
y ahora nada tiene para ofrecerte.
Si pobre la encuentras, Itaca no te engañó.
Hoy que eres sabio, y en experiencias rico,
comprendes qué significan las Itacas.

Agradecimientos

Durante estos años he aprendido que el trabajo científico proporciona mucho estrés y también muchas satisfacciones, y agradezco el haber disfrutado de cada uno de esos momentos porque ya no están.

La satisfacción de finalizar este trabajo no habría sido igual sin la presencia de mis directores de tesis Pilar García Guerreiro y Antonio Fontdevila a quienes les agradezco su generosidad, su paciencia y las valiosas ideas que han enriquecido este trabajo y me han estimulado en la estresante recta final de la tesis, a ustedes mi agradecimiento especial y sincero.

A mis amigos: Montse, Tomás, Naty, Walky, Govi, Edu, Mike, Lynn y A.M.V. que han sido parte fundamental en mi crecimiento personal, que han compartido conmigo los momentos estresantes y relajados de la tesis, que me han visto llorar, reír, bailar y crecer, un millón de gracias por estar ahí. Gracias a todos los amigos que de cerca o de lejos disfrutaban conmigo de cada paso, gracias por esa sonrisa, por esa palabra, por ese gesto inesperado que lo cambia todo. Gracias a mis compañeros de baile, la música y ustedes le han puesto el ritmo a este camino, mis pies se lo agradecen.

El trabajo habría resultado aburrido sin la presencia de buenas compañeras y compañeros que le pusieran color al laboratorio: Luz, Olga, Mercé y Enrico gracias por todas las anécdotas diarias que daban vida al laboratorio. También gracias a todas aquellas personas con quienes cada tarde compartía ensordecedoras comidas, gracias por sus ataques de espontaneidad que de vez en cuando vienen bien.

Un ¡gracias! enorme a mis compañeras Eulalia y Adriana, a quienes debo la tranquilidad y el calor familiar, y a través de ellas a cada miembro de la familia Gomá Presas, quienes me han acogido cariñosamente durante más de cinco años.

Mis queridos padres tienen mi infinito agradecimiento por sus incansables estímulos y su apoyo incondicional en cada momento, gracias por encaminarme, por darme alas y dejarme volar libremente.

A todos quienes integran el Grupo de Biología Evolutiva de la UAB y de la UB, un agradecimiento fuerte. Finalmente he de mencionar que este trabajo ha sido posible gracias a la Beca predoctoral PIF concedida a mi persona por la Universidad Autónoma de Barcelona y gracias a los proyectos No. POS2003-05904-C02-01, CGL2006-13423-C02-01, CGL2009-12912-C03-01 y CGL2010-15395 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España y los proyectos No. 2005SGR 00995 y 2009SGR 636 de la Generalitat de Catalunya concedidos al Grupo de Biología Evolutiva.

Y gracias por este final, porque todo final es un comienzo.

Índice de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	La hibridación entre especies	3
1.2	La inestabilidad híbrida	5
1.3	Elementos transponibles (ETs).....	7
1.3.1	Clasificación de los elementos transponibles en eucariotas	7
1.4	Los elementos móviles y la evolución de los genomas.....	11
1.4.1	"Secuencias de Inserción" en el genoma procariota	12
1.4.2	Elementos transponibles en el genoma eucariota.....	13
1.5	Mecanismos de activación de los ETs.....	16
1.5.1	Estrés ambiental	16
1.5.2	Estrés genómico	16
1.5.3	Transposición espontánea y eventos poblacionales	18
1.6	Mecanismos de control de los ETs: control epigenético	19
1.6.1	Metilación del ADN y modificación de las histonas	19
1.6.2	Silenciamiento de los ETs a través de pequeños RNAs	20
1.7	<i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i> y sus híbridos interespecíficos	23
1.8	Características de los marcadores moleculares AFLP.....	25
1.9	Objetivos	27
1.9.1	Objetivos generales	27
1.9.2	Objetivos específicos	28
2	MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1	Material biológico	31
2.2	Cruzamientos.....	31
2.2.1	Cruzamientos interespecíficos.....	32
2.2.2	Híbridos segmentales e híbridos HR3 externos.....	34
2.2.3	Cruzamientos intraespecíficos (controles)	35

2.3	Extracción de ADN individual.....	35
2.4	Selección de híbridos para la obtención de marcadores AFLP.....	36
2.5	Selección de individuos de cruces intraespecíficos (controles) para obtener los marcadores AFLP	38
2.6	Obtención de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism)	39
2.6.1	Reacción de digestión-ligación	39
2.6.2	Preparación de los adaptadores.....	41
2.6.3	PCR preselectiva	41
2.6.4	PCR selectiva	42
2.7	Combinaciones de cebadores <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i> utilizadas para obtener los AFLP	42
2.8	Electroforesis en geles de poliacrilamida	45
2.9	Selección de marcadores AFLPs de inestabilidad en los híbridos	45
2.10	Clonación de marcadores AFLP de inestabilidad	47
2.10.1	Selección de colonias positivas.....	47
2.11	Secuenciación y análisis bioinformático	48
2.12	FISH (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization)	49
2.12.1	Preparación de cromosomas politénicos	49
2.12.2	Prehibridación	50
2.12.3	Hibridación	50
2.12.4	Marcaje de la sonda con fluoresceína.....	50
2.12.5	Desnaturalización y aplicación de la sonda	51
2.12.6	Posthibridación y revelado.....	52
2.13	Observación de las señales de hibridación	53
2.14	Transposon display.....	53
2.14.1	Reacción de digestión del ADN.....	55
2.14.2	Ligación de los adaptadores	55
2.14.3	Amplificación externa	56
2.14.4	Amplificación interna.....	57
2.15	Selección de híbridos para el análisis del transposon display.....	58

2.16	Selección de individuos de cruces intraespecíficos (controles) para el análisis del transposon display.....	58
2.17	Secuenciación del ADN por electroforesis capilar.....	58
2.18	Cálculo de las tasas de transposición	62
2.19	Aislamiento de ARN y RT-PCR (Reverso transcriptasa PCR).....	63
3	RESULTADOS.....	67
3.1	Descendencia obtenida de los cruzamientos interespecíficos.....	67
3.2	Descendencia obtenida de los cruzamientos intraespecíficos.....	67
3.3	Marcadores AFLP de inestabilidad híbrida en los híbridos HR1, HR2 y HR3	69
3.4	Marcadores de inestabilidad híbrida en los híbridos segmentales F3-F4 e híbridos HR3 externos.....	77
3.5	Marcadores de inestabilidad en las especies <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>	79
3.6	Marcadores AFLP de inestabilidad por transposición y elementos transponibles detectados en híbridos interespecíficos y especies parentales.....	80
3.6.1	Marcadores de transposición detectados en los híbridos HR1	81
3.6.2	Marcadores de transposición en los híbridos HR2.....	81
3.6.3	Marcadores de transposición en los híbridos HR3.....	82
3.6.4	Marcadores de transposición en los híbridos segmentales F3-F4	84
3.6.5	Marcadores de transposición en los híbridos HR3 externos	84
3.6.6	Marcadores de transposición en las especies parentales: <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>	84
3.7	Prueba de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para la inestabilidad.....	88
3.8	La transposición/reorganización genómica de <i>Oswaldo</i> , <i>Helena</i> y <i>Galileo</i> estudiada mediante transposon display	90
3.8.1	Resultados del transposon display del retrotransposon <i>Oswaldo</i>	91
3.8.2	Resultados del transposon display del elemento <i>Helena</i>	91
3.8.3	Resultados del transposon display del transposon <i>Galileo</i>	92
3.9	Tasas de transposición	97
3.9.1	Tasas de transposición del elemento <i>Oswaldo</i>	97

3.9.2	Tasas de Transposición del elemento <i>Helena</i>	97
3.9.3	Tasas de Transposición del elemento <i>Galileo</i>	98
3.9.4	Prueba de Mann-Whitney para las tasas de transposición	98
3.10	Localización cromosómica de los elementos <i>Oswaldo</i> , <i>Helena</i> y <i>Galileo</i> en la cepas parentales mediante FISH (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)	102
3.11	Expresión de los Elementos <i>Oswaldo</i> <i>Helena</i> y <i>Galileo</i>	103
4	DISCUSIÓN	107
4.1	La inestabilidad híbrida detectada por AFLPs	107
4.2	Inestabilidad híbrida inducida por transposición	111
4.3	Transposición de los elementos <i>Oswaldo</i> , <i>Helena</i> y <i>Galileo</i> en los híbridos interespecíficos	113
4.3.1	Transposición del retrotransposon <i>Oswaldo</i>	114
4.3.2	Transposición del retroposon <i>Helena</i>	115
4.3.3	Transposición del transposon <i>Galileo</i>	117
4.4	Reorganización del genoma en los híbridos	118
5	CONCLUSIONES	121
	Bibliografía	123
	Anexos	143

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los elementos transponibles en eucariotas. Adaptación de Wicker et al. 2007.....	10
Figura 2. Ciclo “ping pong” de biogénesis de los piRNA.....	22
Figura 3. Sistema de retrocruzamientos interespecíficos	33
Figura 4. Asinapsis en el cromosoma 4, región F3-F4, en híbridos segmentales.....	34
Figura 5. Sistema de cruzamientos intraespecífico (controles)	35
Figura 6. Esquema del desarrollo de la técnica AFLP para la obtención de marcadores moleculares de transposición.....	40
Figura 7. Tipos de bandas AFLP encontradas en el genoma de los híbridos	46
Figura 8. Esquema de la técnica del transposon display.....	54
Figura 9. Visualización de un electroferograma en el programa Peak Scanner.....	61
Figura 10. Cantidad de marcadores AFLP segregados en cada generación, se resalta aquellos que son marcadores de inestabilidad	80
Figura 11. Marcadores AFLP de inestabilidad por transposición.....	88
Figura 12. Hibridación FISH del elemento <i>Helena</i> en el cromosoma 5 de A: <i>D. buzzatii</i> , B: <i>D. koepferae</i> y C: los híbridos segmentales, G1: nueva inserción.....	103
Figura 13. Amplificación por RT-PCR de los elementos <i>Oswaldo Helena</i> y <i>Galileo</i> en las especies parentales	104

Índice de Tablas

Tabla 1. Híbridos HF1 y HR1 analizados par obtener los marcadores AFLP	37
Tabla 2. Híbridos HR2 y HR3 analizados para la obtención de los marcadores AFLP.....	38
Tabla 3. Individuos de los cruces intraespecíficos (controles) analizados para obtener los AFLP	38
Tabla 4. Combinaciones de cebadores AFLP usados en las PCRs preselectiva yselectiva	43
Tabla 5. Combinaciones de cebadores AFLP analizadas en los híbridos segmentales F3-F4	44
Tabla 6. Individuos de la familia 1 analizados en el experimento del transposon display	60
Tabla 7. Individuos de los cruces intraespecíficos (controles) analizados con la técnica del transposon display.....	60
Tabla 8. Moscas eclosionadas en los cruzamientos interespecíficos y retrocruzamientos efectivos.....	68
Tabla 9. Descendencia producida en cada generación de retrocruzamiento en las familias 1, 10, 13 y 40.....	68
Tabla 10. Moscas eclosionadas en los cruzamientos intraespecíficos.....	69
Tabla 11. Combinaciones de cebadores AFLP en las que se detectaron marcadores de inestabilidad en los híbridos HF1.....	71
Tabla 12. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR1	72
Tabla 13. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR2	74
Tabla 14. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR3	75
Tabla 15. Marcadores de inestabilidad en los híbridos segmentales F3-F4 y en los híbridos HR3 externos.....	78
Tabla 16. Marcadores de inestabilidad en las especies parentales <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>	79
Tabla 17. Caracterización de los marcadores de inestabilidad por transposición en los híbridos HR1, HR2 y HR3	83

Tabla 18. Caracterización de los marcadores de inestabilidad por transposición en los híbridos segmentales F3-F4 y los híbridos HR3 externos	85
Tabla 19. Elementos transponibles detectados a través de los marcadores AFLP en el genoma de los híbridos	86
Tabla 20. Marcador de inestabilidad por transposición en <i>D. buzzatii</i>	87
Tabla 21. Prueba de Mann-Whitney para comparar la inestabilidad inducida por transposición en los híbridos y las especies parentales	89
Tabla 22. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar la inestabilidad entre las familias de híbridos	90
Tabla 23. Inserciones del elemento <i>Oswaldo</i> en los híbridos interespecíficos y las especies parentales	93
Tabla 24. Inserciones del elemento <i>Helena</i> en los híbridos interespecíficos y las especies parentales	95
Tabla 25. Inserciones del elemento <i>Galileo</i> en los híbridos interespecíficos y especies parentales	96
Tabla 26. Cálculo de las tasas de transposición de <i>Oswaldo</i> en los híbridos y en las especies parentales	99
Tabla 27. Cálculo de las tasas de transposición de <i>Helena</i> en los híbridos y en las especies parentales	100
Tabla 28. Cálculo de las tasas de transposición de <i>Galileo</i> en los híbridos y las especies parentales	101
Tabla 29. Prueba de Mann-Whitney para las tasas de transposición de híbridos y parentales	102
Tabla 30. Inserciones de los elementos <i>Oswaldo</i> , <i>Helena</i> y <i>Galileo</i> en los cromosomas politénicos de <i>D. buzzatii</i> y <i>D. koepferae</i>	102

Lista de Anexos

Anexo 1. Secuencias nucleotídicas de los marcadores AFLP de transposición (marcadores de inestabilidad híbrida asociada a ETs).....	145
Anexo 2. Matriz de datos del experimento con la técnica del Transposon Display (TD) de <i>Oswaldo</i> , familia 1, híbridos HR1.....	157
Anexo 3. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 1, híbridos HR2.....	158
Anexo 4. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 1, híbridos HR3.....	159
Anexo 5. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 10, híbridos HR1.....	161
Anexo 6. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 10, híbridos HR2.....	162
Anexo 7. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 10, híbridos HR3.....	163
Anexo 8. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 13, híbridos HR1.....	165
Anexo 9. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 13, híbridos HR2.....	166
Anexo 10. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 13, híbridos HR3.....	167
Anexo 11. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 40, híbridos HR1.....	169
Anexo 12. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 40, híbridos HR2.....	170
Anexo 13. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> , familia 40, híbridos HR3.....	171
Anexo 14. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 1, híbridos HR1.....	173
Anexo 15. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 1, híbridos HR2.....	174
Anexo 16. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 1, híbridos HR3.....	175
Anexo 17. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 10, híbridos HR1.....	176
Anexo 18. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 10, híbridos HR2....	177
Anexo 19. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 10, híbridos HR3.....	178
Anexo 20. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 13, híbridos HR1.....	179
Anexo 21. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 13, híbridos HR2.....	180
Anexo 22. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 13, híbridos HR3.....	181
Anexo 23. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 40, híbridos HR1.....	182

Anexo 24. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 40, híbridos HR2.....	183
Anexo 25. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> , familia 40, híbridos HR3.....	184
Anexo 26. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 1, híbridos HR1.....	185
Anexo 27. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 1, híbridos HR2.....	186
Anexo 28. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 1, híbridos HR3.....	187
Anexo 29. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 10, híbridos HR1.....	188
Anexo 30. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 10, híbridos HR2.....	189
Anexo 31. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 10, híbridos HR3.....	190
Anexo 32. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 13, híbridos HR1.....	192
Anexo 33. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 13, híbridos HR2.....	193
Anexo 34. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 13, híbridos HR3.....	194
Anexo 35. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 40, híbridos HR1.....	196
Anexo 36. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 40, híbridos HR2.....	198
Anexo 37. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> , familia 40, híbridos HR3.....	200
Anexo 38. Matriz de datos del de <i>Oswaldo</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B4.....	202
Anexo 39. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B8.....	203
Anexo 40. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K3.....	204
Anexo 41. Matriz de datos del TD de <i>Oswaldo</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K9.....	205
Anexo 42. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B4.....	206
Anexo 43. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B8.....	207
Anexo 44. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K3.....	208
Anexo 45. Matriz de datos del TD de <i>Helena</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K9.....	209
Anexo 46. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B4.....	210
Anexo 47. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> para <i>D. buzzatii</i> , familia B8.....	211
Anexo 48. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K3.....	212

Anexo 49. Matriz de datos del TD de <i>Galileo</i> para <i>D. koepferae</i> , familia K9.....	213
Anexo 50. Publicación científica sobre la aplicación de los AFLP en la detección de eventos de transposición.....	214

Resumen

El genoma de los híbridos interespecíficos y las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae* ha sido estudiado utilizando marcadores moleculares AFLP. En el genoma de los híbridos segregan *de novo* marcadores AFLP de inestabilidad que no segregan en las especies parentales, señal de que el genoma híbrido es inestable. La caracterización de los marcadores AFLP de inestabilidad ha revelado que un amplio porcentaje, que va desde el 16%, en la primera generación de híbridos, hasta un 90% en las generaciones de híbridos segmentales, está asociado a la movilización de al menos 34 elementos transponibles de clase I y II. Las tasas de transposición estimadas en los híbridos y las especies parentales para los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* confirman que hay un incremento estadísticamente significativo de la transposición del retrotransposon *Oswaldo* (10^{-2}) en las tres generaciones analizadas, mientras que la tasa de transposición de *Helena* y *Galileo* se incrementa (10^{-2}) en la generación R1 pero decrecen en la generación R3 hasta el nivel de la transposición basal de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae* (10^{-3}). Las inserciones de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* observadas por FISH y por transposon display señalan que la mayor parte de las inserciones se encuentran en la heterocromatina, región en la que se encuentran silenciados. La movilización de los 34 elementos transponibles en el genoma de los híbridos evidencia que en estos genomas ocurre una reorganización genómica inducida por la movilización de los elementos transponibles, y pone de manifiesto que el estrés genómico generado por la hibridación inhibe momentáneamente los mecanismos que controlan la transposición de los ETs en el genoma híbrido, permitiendo su movilización.

Abstract

The genomes of the species *D. buzzatii* and *D. koepferae* and their interspecific hybrids have been studied using AFLPs markers. In the hybrids genome markers that are absent in the parental species have been detected unveiling genome instability. High amount of AFLP instability markers, ranging from 16 % in hybrids R1 to 90 % in segmental hybrids, are related to mobilization of at least 34 transposable elements of classes I and II. Transposition rates of *Oswaldo* retrotransposon confirm the increase of transposition in the three generations of hybridization, however *Helena* and *Galileo* transposable elements only increase transposition in generation R1 (10^{-2}), but show transposition rate at the basal level (10^{-3}) in generation R3 as in parental species. Insertions of *Oswaldo*, *Helena* and *Galileo* observed by FISH and by the transposon display technique indicate that most of the insertions are located in the heterocromatic regions, where they are silenced. Mobilization of 34 transposable elements in the hybrid genome bolsters that a genome reorganization is occurring in the hybrids. This reorganization is probably induced when hybrid genomic stress inactivates the control mechanisms of transposable elements mobilization.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La hibridación entre especies

El concepto de especie biológica propuesto por Dobzhansky (Dobzhansky, 1937) y popularizado por Mayr (Mayr, 1942) considera que todas las especies han desarrollado mecanismos de aislamiento reproductivo altamente eficaces que permiten mantener la unidad genética de las mismas evitando introducir variación genética externa. Sin embargo, el cruzamiento entre grupos o taxones genéticamente diferenciados, especies en particular, y la producción de descendencia viable parece un hecho cada vez más comprobado (Mallet, 2005). Esto sugiere que la hibridación natural puede tener un papel importante como productora de nueva diversidad genética a través de la introgresión, en primera instancia, y la formación posterior de genotipos recombinantes híbridos (Burke & Arnold, 2001).

El tema de la hibridación y el de la presencia de híbridos en la naturaleza ha sido y continúa siendo ampliamente discutido. Así pues, los eventos de hibridación fueron considerados, durante mucho tiempo, escasos o inexistentes y desestimados al ser considerados fenómenos aislados sin importancia evolutiva o ecológica. Sin embargo, entre los botánicos la hibridación ha sido mejor aceptada que entre los zoólogos debido a que los primeros dan mayor importancia al fenómeno de la introgresión, mientras que los segundos conceptúan la introgresión como un error reproductivo. Actualmente existen evidencias que suponen que al menos un 25 % de las especies de plantas y un 10 % de las especies de animales pueden estar involucradas en eventos de hibridación en la naturaleza (Mallet, 2005). Sin embargo, el mayor problema de la identificación de los eventos de hibridación radica en la dificultad para diferenciar los híbridos de las especies parentales, pues en muchos casos pueden no presentar características fenotípicas fácilmente distintivas.

La probabilidad de que ocurran sucesos puntuales de hibridación y de que se formen híbridos aumenta entre las especies que viven en simpatria y tienen una divergencia baja, y disminuye cuando las barreras reproductivas están mejor desarrolladas entre las especies, lo cual hace que los híbridos presenten inviabilidad o esterilidad. En este momento conocemos muchos casos de hibridación natural en diversos taxones, por ejemplo en microeucariotas (Casteleyn

et al., 2009), en insectos como *Drosophila* (Carson *et al.*, 1975), *Simulium* (Post, 1984) y *Anopheles* (Torre, 1997), en plantas (Zha *et al.*, 2010) y en animales vertebrados (Arnold, 2006; Arnold & Hodges, 2007). En algunos casos se ha comprobado que la hibridación tiene mucha importancia en la generación de biodiversidad pues ha dado lugar a la formación de nuevas especies de origen híbrido (Teo *et al.*, 2002; Turelli *et al.*, 2001; Ungerer *et al.*, 1998). Además existe evidencia de que algunos híbridos presentan incremento de la aptitud biológica frente a las especies parentales, lo cual les permitiría ocupar nuevos hábitats diferentes a los de sus parentales (Arnold, 2004).

En plantas existen muchos casos documentados de hibridación natural. Uno de los ejemplos mejor conocidos se presenta en las especies del género *Iris*, donde estudios moleculares y citológicos junto con observaciones morfológicas y del hábitat, confirman que la especie *I. nelsonii* se originó del cruzamiento entre al menos tres especies: *I. fulva*, *I. hexagona*, y *I. brevicaulis*. La adaptación de *I. nelsonii* a nuevos hábitats, no ocupados por las especies parentales, probablemente ha influido en el proceso de especiación (Rieseberg *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la hibridación entre las especies *Pseudopanax crassifolius* y *P. lessonii* cuyos híbridos aparentemente producen frutos viables (Pollock, 1988) y las especies *Rhododendron irroratum* y *R. delavayi*, las cuales han originado el taxón híbrido *R. agastum* que únicamente produce híbridos F1 (Pollock, 1988).

Un ejemplo bien documentado en insectos lo constituye el complejo de mariposas del género *Heliconius*, cuyas especies viven en simpatria y forman híbridos naturales que se caracterizan por tener distorsionado el patrón de pigmentación de las alas. Estudios moleculares han confirmado indicios de introgresión de los genomas en los híbridos entre *H. melpomene* y *H. cydno*, evento que parece común entre las especies de este género y que probablemente ha dado origen, en este caso a la especie *H. heurippa* (Jiggins *et al.*, 2008). Otro ejemplo en mariposas es la hibridación natural observada entre las especies *Papilio glaucus* y *P. canadensis*, las cuales presenta diferencias a nivel ecológico fisiológico y genético (Putnam *et al.*, 2007; Rockey *et al.*, 1987). En *Drosophila* los casos de hibridación natural mejor conocidos se producen entre las especies hawaianas *D. heteroneura* y *D. silvestris*, y entre *D. setosimentum* y *D. ochrobasis* (Carson *et al.*, 1975; Kaneshiro, 1990).

En mamíferos ejemplos de hibridación natural son menos frecuentes, sin embargo existen varios casos estudiados. Por ejemplo, en el género *Artibeus*, el análisis del ADN nuclear y mitocondrial, y la variación morfométrica entre las especies *A. schwartzi*, *A. jamaicensis* y *A. planirostris* permitió demostrar que *A. schwartzi* tiene un origen híbrido pues su genoma deriva de los genomas de *A. jamaicensis* y *A. planirostris*, mientras que su ADN mitocondrial viene de un tercer linaje no caracterizado o extinto. Además *A. schwartzi* presenta diferencias morfológica y aislamiento geográfico de las otras especies (Larsen *et al.*, 2010). Los eventos de hibridación natural observados tanto en plantas como en animales, ponen de manifiesto que, en algunos taxones, la hibridación ha cumplido un papel un importante como mecanismo de especiación.

1.2 La inestabilidad híbrida

Los híbridos presentan con frecuencia inestabilidad genética producto de la interacción de los dos genomas parentales divergentes. Esta inestabilidad se expresa en los híbridos como incompatibilidades genéticas (Johnson, 2010) o disfunciones genéticas que pueden ser observadas a nivel fenotípico: variaciones fenotípicas, atrofia de las gónadas (Rahman & Uehara, 2004) y a nivel cromosómico: reordenaciones cromosómicas, inversiones, poliploidías, etc. (Hegarty *et al.*, 2006; Hegarty *et al.*, 2009). A nivel génico y epigenético también se observan alteraciones como: alta tasa de mutaciones, alteraciones de los patrones de expresión y regulación génica, metilación, regulación por vía materna (Michalak & Noor, 2003; Salmon *et al.*, 2005). Todas estas incompatibilidades afectan de algún modo la viabilidad y la fertilidad de los híbridos disminuyendo su aptitud biológica.

En el caso de la hibridación en plantas, observamos que una de las principales causas de la inestabilidad del genoma en los híbridos es la poliploidía. Se ha observado que después de la hibridación, los híbridos poliploides sufren rearrreglos cromosómicos y reestructuración de secuencias de ADN. En alotetraploides de *Brassica* por ejemplo, la comparación de los genomas desde la segunda hasta la quinta generación de híbridos demostró la pérdida o ganancia de segmentos de ADN de origen parental y la formación de segmentos de origen nuevo (Pires *et al.*, 2004). En otros casos como por ejemplo en poliploides de *Arabidopsis* (Madlung *et al.*, 2005) y *Gossypium* (Zhao *et al.*, 1998) se ha observado el incremento de la expresión y/o transposición de secuencias repetitivas. Las

poliploidias en algunos casos han sido asociadas a explosiones de transposición seguidas de una reestructuración del genoma y a cambios a nivel epigenético (Parisod *et al.*, 2009; Parisod *et al.*, 2010). Sin embargo, en híbridos homoploides también se ha observado reorganización del genoma, por ejemplo la comparación de los genomas de la especie *Helianthus anomalus*, de origen híbrido y las especies parentales *H. petiolaris* y *H. annuus* ha revelado que se produjo al menos tres roturas de cromosomas, tres fusiones y una duplicación que explican las diferencias genéticas entre estas especies. Resultados similares se obtuvieron al reproducir el evento de hibridación en condiciones de laboratorio (Rieseberg *et al.*, 1996), en los cuales se obtuvieron linajes de híbridos fértiles después de tan solo cinco generaciones. Estos resultados indican que la reorganización del genoma en los híbridos puede ser muy rápida y además repetible (Fontdevila, 2011).

En el caso de *Drosophila*, estas incompatibilidades genéticas han sido estudiadas en híbridos generados en condiciones de laboratorio. Sturtevant fue uno de los primeros investigadores interesados por el estudio de los híbridos entre *D. melanogaster* y *D. simulans* y probablemente quien reportó la primera incompatibilidad en los híbridos asociada al cromosoma X. Los estudios de Sturtevant se vieron limitados debido a que los híbridos F1 eran estériles lo cual impedía realizar retrocruzamientos (Barbash, 2010). Posteriormente, se descubrió que las hembras de determinadas cepas de *D. simulans* cruzadas con machos de *D. melanogaster* producían hembras parcialmente fértiles que podían producir prole en un retrocruzamiento (Davis, 1996). A través de estos híbridos se han observado diversas incompatibilidades a nivel fenotípico, cambios en la expresión génica y a nivel conductual. También se han identificado los genes que causan estas incompatibilidades, las cuales han sido ampliamente descritas y actualmente siguen siendo estudiadas debido a las diferencias observadas entre las dos especies en la divergencia a nivel de la heterocromatina, y las diferencias en el contenido de ADN satélite y elementos transponibles (Barbash, 2010). Otro caso muy estudiado por Dobzhansky (Dobzhansky, 1936), son los cruces entre las especies *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* los cuales producen hembras híbridas fértiles y machos híbridos infértiles. El estudio de estos híbridos permitió a Dobzhansky determinar que las incompatibilidades observadas en los híbridos eran producto de la interacción epistática entre los genes de los parentales en el genoma de los híbridos, lo que conducía a la esterilidad o inviabilidad de los híbridos.

Un hecho interesante observado en los híbridos de *D. melanogaster* y *D. simulans* es la esterilidad producida por el gen JYalpha (Na⁺-K⁺-ATPasa requerida para la motilidad del esperma), el cual está localizado en el cromosoma 4 de *D. melanogaster* y en el cromosoma 3 de *D. simulans*. Al parecer un evento de transposición, entre los últimos 0.5-5 millones de años, condujo al cambio de posición de este gen en las dos especies. Los híbridos que presentan homocigosis del cromosoma 3 de *D. melanogaster* y el cromosoma 4 de *D. simulans* carecen de este gen, por lo tanto son totalmente estériles. Este hecho muestra que la transposición de genes con funciones importantes pueden contribuir a un aislamiento postcigótico (Lynch & Force, 2000).

Los híbridos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* constituyen otro modelo en los cuales se ha observado inestabilidad genética a nivel cromosómico y fenotípico, presentando una gran cantidad de nuevos rearrreglos cromosómicos (Labrador *et al.*, 1999; Naveira & Fontdevila, 1985). La inestabilidad genética observada en estos híbridos ha sido relacionada con el incremento de la transposición del retroelemento *Osvaldo* (Labrador *et al.*, 1999) como se detallará más adelante.

1.3 Elementos transponibles (ETs)

Los elementos transponibles (ETs) son secuencias de ADN que pueden moverse hacia diferentes posiciones y multiplicarse dentro del genoma del organismo hospedador. Fueron descubiertos por Barbara McClintock en la década de los 40, quien observó que en el maíz la expresión de ciertos genes podía ser alterada por la actividad de unos elementos con capacidad de movilización en el genoma. Los ETs se encuentran formando parte integral de casi todos los genomas en los que se han buscado. Por ejemplo en el genoma humano constituyen el 45 %, 80% en el del maíz, 15-22 % en *Drosophila melanogaster*, 3-5 % en la levadura (Biémont & Vieira, 2006), 1 %, en *E. coli*, 13 % en *Mycoplasma mycoides* (Gregory & DeSalle, 2005) y 25% en *Enterococcus faecalis* (Paulsen *et al.*, 2003). Entre los escasos ejemplos de genomas carentes de ETs está el de *Plasmodium* (Evgen'ev, 2007)

1.3.1 Clasificación de los elementos transponibles en eucariotas

Finnegan propuso en 1989 la primera clasificación de los ETs de eucariotas basada en los mecanismos de transposición. Así, los dividió en dos clases: clase I

(necesitan un RNA intermediario para la transposicion) y clase II (no necesitan un intermediario RNA). Debido al incremento en la rapidez y eficiencia en la secuenciación de genomas, se describen continuamente nuevas secuencias de ETs y con ello se generan adaptaciones de la clasificación a los nuevos elementos emergentes. Así pues aún cuando se ha mantenido el sistema de clasificación original, se han creado nuevos órdenes con superfamilias y familias, en función de las características estructurales de los elementos. A continuación se presenta un breve resumen de la clasificación de los ETs basado en la propuesta de Wicker y colaboradores (figura 1)(Wicker *et al.*, 2007).

1.3.1.1 Elementos de Clase I

Los elementos transponibles de clase I se conocen como retrotransposones, se movilizan usando un RNA transcrito intermediario y un sistema de transcripción inversa e inserción (“copia y pega”), por lo cual tienen la capacidad de crear nuevas copias cada vez que se movilizan, lo que permite que se hagan más abundantes en algunos genomas. Dentro de los retrotransposones se han creado 5 órdenes: LTR, DIRS, PLE, LINE y SINE en base a su organización y a la filogenia de su reverso transcriptasa (Wicker *et al.*, 2007).

Los **retrotransposones LTR**, presentan LTRs (Long Terminal Repeats) en los extremos del elemento, que se caracterizan por iniciar con 5'-TG-3' y terminar con 5'-CA-3', y secuencias cortas duplicadas en los extremos: TSDs (target site duplications) que tienen de 4 a 6 pares de bases (pb). Estructuralmente presentan un marco abierto de lectura: ORF (Open Reading Frame) que codifica para GAG, una proteína estructural, y otro para POL, una poliproteína que codifica para una proteinasa, una reverso transcriptasa, una RNAsaH y una integrasa. En algunos elementos puede existir un tercer ORF del cual se desconoce su función. Los transposones con LTR son los elementos más abundantes en plantas y en algunos insectos como *D. melanogaster*, pero en muchos animales disminuye su presencia. En humanos existen numerosas familias pero la mayoría de elementos de esta clase se encuentran en estado inactivo. Los retrovirus han sido agrupados en este orden aunque difieren de los retroelementos en la presencia de un ORF llamado ENV que codifica para una proteína de la envuelta (“envelope protein”) lo cual les confiere propiedades infecciosas.

Los **LINEs (Long Interspersed Elements)** se caracterizan por no presentar LTRs, algunos de ellos son autónomos ya que poseen un ORF para POL que codifica

para varias proteínas incluida una reverso transcriptasa. Algunas familias presentan un ORF para GAG, aunque se desconoce su actividad. Algunos presentan una cola poliadenilada, repeticiones en tándem ó una región rica en adeninas en el extremo 3'. Su sistema de integración implica la rotura de la cadena de ADN la misma que es utilizada como cebador en la transcripción reversa del RNA transcrito del elemento.

Los **SINEs (Short Interspersed elements)** carecen de LTRs y no tienen ORFs, por lo tanto no codifican para ninguna enzima. Sin embargo tienen un promotor interno de una polimerasa III lo cual les permite transcribirse utilizando la maquinaria de transcripción de los elementos LINEs aledaños. En algunos casos pueden presentar repeticiones en tándem de adeninas. Las secuencias *Alu* son los elementos de tipo SINE mejor conocidos y más abundantes en el genoma humano.

Los elementos **DIRs** presentan TIRs (Terminal Inverted Repeats), tienen ORFs tanto para GAG como para POL, sin embargo en lugar de codificar para una integrasa, codifican para una tirosin-recombinasa lo cual hace que no presenten TSDs.

Los elementos de tipo **PLE** tienen un ORF que codifica para una reverso transcriptasa que al parecer está más relacionada con una telomerasa que con las reverso transcriptasas de los LTR retrotransposones y también para una endonucleasa que está relacionada con la proteína UvrC homóloga a la implicada en la reparación del DNA bacteriano. Algunos de estos elementos poseen LTRs que pueden estar orientadas en forma directa o inversa.

1.3.1.2 Elementos de Clase II

Los elementos de clase II, llamados también DNA transposones, se caracterizan por tener un sistema de movilización directa a través del DNA mediante escisiones que se insertan en lugares nuevos ("corta y pega"). Esta clase se ha subdividido en dos subclases: subclase I y subclase II.

Los elementos de la **subclase I** se han subdividido en dos ordenes: TIR y Crypton. Los elementos de la subclase **TIR**, que comprenden el elemento P, presentan TIRs (regiones invertidas que se repiten en los extremos del elemento) y la mayoría de ellos tiene un ORF que codifica para una transposasa. En algunos casos pueden presentar un segundo ORF del cual se desconoce su función. El segundo orden, **Crypton**, agrupa elementos que tienen la capacidad de codificar

para una tirosin-recombinasa y no presentan TIRs. Para movilizarse, los elementos de la subclase I cortan las dos cadenas de ADN.

En la **subclase II** se han ubicado elementos que para movilizarse cortan una sola de las hebras de ADN. En el caso de los elementos del tipo **Helitron** se replican a través del mecanismo de círculo rodante. Estos elementos codifican para una Y2-tirosin-recombinasa y para una proteína de unión de cadena simple, no tienen TIRs. Están presentes en organismos eucariotas, fueron descritos en *A. thaliana* y se los ha identificado en *Caenorhabditis*, vertebrados y en hongos. Los elementos del tipo **Maverick**, también conocidos como Polintrons, presentan TIRs y codifican para una DNA polimerasa B y una integrasa. Para movilizarse cortan el ADN y se replican extracromosómicamente y luego vuelven a integrarse. Estos elementos están presentes en animales vertebrados e invertebrados, en hongos y en algunos eucariotas unicelulares, pero no han sido encontrados en plantas.

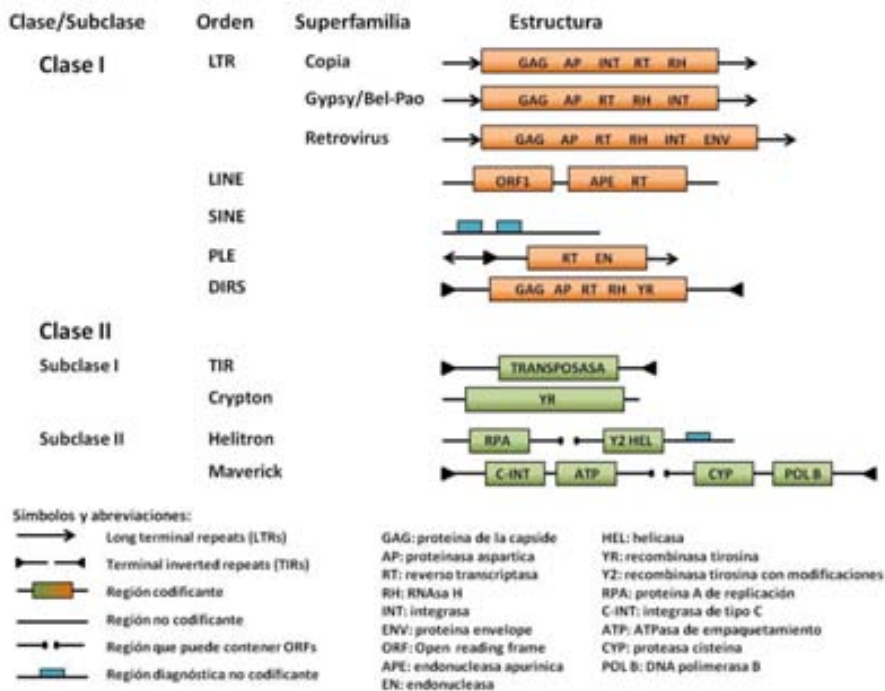


Figura 1. Clasificación de los elementos transponibles en eucariotas. Adaptación de Wicker et al. 2007.

1.4 Los elementos móviles y la evolución de los genomas

Fue Barbara McClintock quien descubrió la presencia de elementos que se movilizaban de un lugar a otro en el genoma. Sus estudios, basados en el genoma del maíz, sugirieron que estos elementos tenían la capacidad para ejercer de controladores de la expresión de los genes aledaños, y que las modificaciones producidas en el genoma podrían tener efectos importantes a nivel evolutivo, e incluso podrían actuar como mecanismos de aislamiento y especiación (McClintock, 1984).

Después del descubrimiento de los ETs, la discusión se centró en la función que cumplían estos elementos en el genoma. Por un lado se consideró a los ETs como ADN parásito que no cumplía ninguna función importante, debido a que su única función era perpetuarse en el genoma (Hickey, 1982). Esta visión determinó que se considerase a los ETs como “DNA egoista” y que se desestimara su importancia en la evolución de los genomas (Doolittle & Sapienza, 1980). No obstante, los estudios moleculares han demostrado que, en muchos casos, ha ocurrido un fenómeno conocido como “domesticación molecular” en el cual los ETs han jugado un papel importante en la evolución del genoma del organismo hospedador influyendo en la evolución de la regulación génica y en la evolución de las secuencias codificantes de las proteínas (Bowen & Jordan, 2002). La idea de los ET como reguladores de la expresión génica, que inicialmente fue propuesta por McClintock, retoma fuerza al demostrarse, en diversos estudios y con la ayuda de los genomas secuenciados, que los ETs se encuentran formando parte de regiones codificantes de los genes, actuando como promotores del mismo gen o genes aledaños y por lo tanto creando variabilidad en la expresión génica o creando nuevos genes con funciones diferentes cuya acción puede influir en la diversificación de las especies (Bowen & Jordan, 2002).

Los estudios moleculares han demostrado la capacidad que tienen los ETs para movilizarse dentro del genoma hospedador convirtiéndolos en fuentes potenciales e inagotables de variabilidad genética, la cual puede ser introducida por transposición, escisión imprecisa y recombinación homóloga. Por transposición se generan nuevas inserciones que, dependiendo del lugar en el que se inserten, conducirán a nuevas mutaciones. La escisión imprecisa deja una huella genética, consistente generalmente en unos pocos pares de bases, en el lugar de escisión. Estos fenómenos, en zonas codificantes, pueden conllevar a la inactivación o el

cambio de la expresión de los genes. El último mecanismo, la recombinación ectópica, tiene lugar entre dos elementos en posiciones no alélicas, es decir en loci de diferente posición en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Cuando esto ocurre se producen rearrreglos y pérdidas de fragmentos cromosómicos.

1.4.1 "Secuencias de Inserción" en el genoma procariota

Han sido descritos más de 1500 ETs en el genoma procariota (Siguier *et al.*, 2006). Los elementos móviles del genoma procariota más conocidos son las secuencias de inserción (IS, insertion sequences). En general, el tamaño del genoma de los organismos procariotas se caracteriza por ser pequeño, el genoma bacteriano tiene un tamaño promedio de 3.10 ± 0.09 Mb (Gregory & DeSalle, 2005). Una de las características del genoma procariota es la poca presencia de regiones de ADN no codificante: elementos móviles, intrones y pseudogenes, lo cual probablemente influye en el mantenimiento del genoma de tamaño pequeño. En el genoma bacteriano se considera que la densidad de ETs es menor al 3% (Siguier *et al.*, 2006), en *E. coli* por ejemplo, apenas el 1 % corresponde a ETs y en *Mycoplasma mycoides*, uno de los procariotas con mayor cantidad de ETs en su genoma, llega al 13 %, aunque actualmente con la descripción de los genomas completos se ha observado que algunos procariotas pueden presentar un contenido mayor de ETs en su genoma, por ejemplo *Enterococcus faecalis* posee un 25% de secuencias repetitivas.

El genoma procariota ha evolucionado por mecanismos que incluyen la reducción del genoma, rearrreglos genómicos, duplicación génica, y pérdida/ganancia de genes por transferencia horizontal. La importancia de la presencia de ETs en el genoma procariota radica en las ventajas que genera para el hospedador a través de su actividad mutagénica y la capacidad de transportar genes por transferencia horizontal, que en algunos casos pueden conferirle resistencia a antibióticos (Siguier *et al.*, 2006). Este mecanismo tiene un papel importante en la evolución de la diversidad procariota, ya que incluso entre miembros de la misma especie se han observado diferencias en el contenido de genes que pueden variar entre el 25 y el 30%. Se podría asumir que estas variaciones se producen por mecanismos de transferencia horizontal mediados por ETs y que en el genoma de algunas especies procariotas existen genes no esenciales para algunas de ellas (Medini *et al.*, 2005). La expansión de los ETs en el

genoma procariota ha producido rearrreglos genómicos y altos niveles de inactivación génica provocando la reducción del tamaño del genoma. Esto se ha observado en estudios con miembros de la familia *Bordetellae* (Parkhill *et al.*, 2003) y del género *Sulfolobus* (Parkhill *et al.*, 2003; Siguier *et al.*, 2006) en los cuales la especie más antigua posee un tamaño de genoma más grande y un menor número de IS, mientras que las especies más recientes presentan un mayor número de IS y su genoma se ha reducido de tamaño. Por otro lado, es posible que después de un proceso de expansión, los ETs sean eliminados del genoma para conservar el tamaño pequeño del genoma (McDonald, 1993; Wagner, 2006).

1.4.2 Elementos transponibles en el genoma eucariota

El genoma eucariota es de tamaño grande pero tiene poco contenido de ADN codificante. La duplicación génica y los rearrreglos cromosómicos constituyen dos importantes mecanismos de su evolución, aunque no los únicos. Los ETs han jugado también un papel importante creando variabilidad a través, principalmente, de la recombinación cromosómica y molecular y el cambio de los patrones de expresión génica (McDonald, 1993). En el genoma eucariota, los ETs están distribuidos tanto en la eucromatina como en la heterocromatina, sin embargo se ha observado que una gran proporción de ellos está presente mayoritariamente en la heterocromatina, una región de baja recombinación. Por lo tanto se podría considerar que los ETs están inactivos en estas regiones a nivel de transposición, aunque muchos de ellos puedan permanecer estructuralmente activos o ser lugares importantes para la síntesis de siRNAs implicados en el control de la transposición de otros elementos eucromáticos.

En los eucariotas, los genomas de mayor tamaño tienden a presentar mayor proporción de ETs. Se ha observado que algunas familias de ETs están ausentes en algunos organismos eucariotas, así como otras familias están muy relacionadas con cierto grupo de organismos, esto indicaría que en ciertos casos las relaciones entre ETs y especies son especie-específicas (Evgen'ev, 2007). Un ejemplo en este sentido serían las familias de los ETs LOA, *Oswaldo* y *Penelope* que están presentes en el genoma de *Aedes aegypti* pero ausentes en *Anopheles gambiae* (Nene *et al.*, 2007). Un dato interesante es la ausencia de ETs en el genoma de *Plasmodium falciparum* y algunos rotíferos lo cual podría estar relacionado con la falta de un proceso reproductivo sexual obligatorio (Evgen'ev, 2007). En el genoma de las plantas, cuyo principal mecanismo de incremento de

ADN son las poliploidías, se ha observado que la diversidad genética obedece a la expansión diferencial de los ETs, especialmente retrotransposones con LTR y a su actividad en la creación de nuevos genes (Bennetzen, 2005). La comparación de los genomas de especies con un ancestro en común muestra que las regiones intergénicas y el contenido de ETs es muy diferente, en algunos casos hasta un 35 % de los genes ha cambiado de posición en el genoma. En el maíz, por ejemplo, hasta un 80% del genoma está compuesto por ETs, mientras que en algunas liliáceas puede llegar hasta el 90% (Evgen'ev, 2007). En el caso del genoma de *D. melanogaster* estos elementos representan entre un 15 y un 22% y corresponden a elementos de clase I y II entre los que se han identificado más de 100 familias (Kaminker *et al.*, 2002), pero no se han encontrado elementos de tipo SINE ni MITE (Evgen'ev, 2007). Las secuencias anotadas de transposones cubren el 7 % de la eucromatina y alrededor del 75% de la heterocromatina en *D. melanogaster*. Además el contenido de ETs es muy variable, aunque al parecer se mantienen las mismas familias, sin embargo los elementos y sus secuencias son especie-específicos (Clark *et al.*, 2007). Por ejemplo la especie *D. simulans* tiene apenas un 5% de secuencias repetitivas mientras que su especie hermana *D. melanogaster* tiene alrededor de un 15%.

En el genoma humano, el 45% está compuesto por ETs, de los cuales el 17% son retrotransposones sin LTR (LINE-1), el 11% corresponden a secuencias de tipo Alu, un tipo de elementos SINEs, que se encuentran mayoritariamente en regiones promotoras de genes, el 8% son LTR retrotransposones y tan solo del 2 al 3% del genoma humano está compuesto por DNA transposones (Ivics & Izsvák, 2010; Thornburg *et al.*, 2006). El interés del estudio de los ETs en el genoma humano está dirigido principalmente a descubrir los patrones de expresión génica que están siendo alterados por efecto de la transposición, lo cual puede desencadenar una serie de enfermedades, entre ellas el cáncer. Otro punto a elucidar son los mecanismos a través de los cuales los ETs han intervenido en la evolución del genoma.

Los ETs han intervenido activamente en la evolución de los genomas eucariotas, algunos de éstos los han “domesticado” integrándolos como parte de éste, convirtiéndolos en secuencias promotoras, codificantes o utilizando su actividad enzimática para beneficio del hospedador. En humanos por ejemplo, un estudio de alrededor de 14.000 genes permitió observar que al menos el 4% de los

genes que codifican proteínas tiene secuencias de retrotransposones (Bowen & Jordan, 2002; Evgen'ev, 2007). Se ha observado que alrededor del 10% de estas inserciones están presentes en exones, lo que indica que probablemente la mayor parte de las inserciones de ETs han ocurrido en intrones y luego han sido integrados a los exones a través del proceso de exonización. Por otro lado, también se ha comprobado que la divergencia entre 100 genes ortólogos de diferentes especies se ha producido por la presencia de inserciones de ETs. Otro ejemplo es la presencia de los elementos HetA y TART, del tipo LINE-like en *D. melanogaster*, la cual aprovecha la función de reparación que cumple la telomerasa de los ETs para mantener la integridad de sus telómeros, ya que esta especie no dispone de una función telomerasa propiamente dicha.

Otro claro ejemplo de domesticación de los ETs en donde actúan produciendo recombinación por transposición es el complejo proteico RAG1 y RAG2. Estas proteínas linfoides se expresan únicamente en las células B y T e interactúan con el sistema de recombinación V(D)J (variable, diversity, joining) para crear el enorme repertorio de inmunoglobulinas y receptores de las células T. El sistema de recombinación V(D)J son genes que se encuentran formados por varios segmentos los cuales tienen en sus extremos secuencias señales de recombinación RSS (recombination signal sequences). Las proteínas RAG1 y RAG2 tienen actividad endonucleasa y un dominio proteico similar al de una transposasa, localizan los RSS, cortan la doble cadena de ADN y juntan los segmentos de ADN. Esta capacidad de recombinación se efectúa bajo el mismo sistema de “corta y pega” que utilizan los transposones, de ahí que se proponga que este sistema sea producto de la integración de un transposón en el genoma de los vertebrados, el cual ha permitido ampliar la capacidad del sistema inmunológico (Santagata *et al.*, 1999). La enorme cantidad de inmunoglobulinas se debe a la cantidad de segmentos que posee cada gen V, D, J (125, 25 y 9 respectivamente), los cuales pueden ser recombinados aleatoriamente (Fontdevila, 2011). La capacidad para producir recombinación y moverse que tienen los ETs les permite trasladar segmentos de exones o de secuencias promotoras hacia nuevos lugares del genoma, incrementando la recombinación de segmentos de exones de diferentes genes, este mecanismo se denomina exón shuffling (Gilbert, 1987). Análisis comparativos del genoma de eucariotas proponen que más del 20% de exones podrían haberse originado por este mecanismo (Long *et al.*, 1995). Los ETs participan activamente en estos mecanismos que han permitido la emergencia de nuevas unidades funcionales y

que en algunos casos han evolucionado como nuevos genes con funciones diferentes (Bennetzen, 2005).

1.5 Mecanismos de activación de los ETs

Aunque no se conoce con exactitud los mecanismos que regulan la activación de los ETs, se ha observado que diversos estímulos como el estrés ambiental y el estrés genómico (por ejemplo cruzamientos intra e interespecíficos) pueden desencadenar la movilización de los ETs.

1.5.1 *Estrés ambiental*

Diversos agentes externos como la temperatura, los agentes químicos o las radiaciones pueden producir la movilización de los ETs en el genoma del hospedador. Si bien el efecto de estos factores ha sido bien demostrado en plantas, en el caso de la *Drosophila* los resultados son contradictorios. Por ejemplo en poblaciones Africanas y Europeas de *D. simulans* se han observado clinas latitudinales, correlacionadas con la temperatura, para el número de copias del elemento 412 (Vieira & Biémont, 1996) y la actividad del elemento *mariner* (Giraud & Capy, 1996). En otros experimentos, en los cuales se han sometido diferentes líneas de *Drosophila* a choques térmicos en laboratorio, han mostrado resultados discordantes. Por un lado se ha observado un incremento de la transposición (Arnault & Dufournel, 1994; Ratner *et al.*, 1992; Vasilyeva *et al.*, 1999) y por otro lado no se ha detectado incremento de la movilización (Arnault *et al.*, 1991; Arnault & Dufournel, 1994; Arnault *et al.*, 1997) lo cual podría indicar que hay un componente del genoma del hospedador que actúa como un mecanismo de defensa para impedir la movilización de los ETs.

1.5.2 *Estrés genómico*

Los eventos más relacionados, aunque no los únicos, con el desencadenamiento de estrés genómico son los cruzamientos, tanto los intraespecíficos como los interespecíficos. A continuación se describe las observaciones en cruzamientos de ambos tipos y su efecto sobre la actividad de los ETs y la estabilidad del genoma de la descendencia y los híbridos.

1.5.2.1 Cruzamientos intraespecíficos

Las primeras observaciones sobre los efectos de la movilización de los ETs se realizaron en cruzamientos intraespecíficos entre machos de *Drosophila melanogaster* de poblaciones naturales y hembras de cepas mantenidas mucho tiempo en el laboratorio. La descendencia de estos cruzamientos mostró un alto grado de anomalías como alta tasa de mutación, esterilidad, inviabilidad, recombinación en los machos, no disyunciones cromosómicas, y alteraciones a nivel fenotípico, por ejemplo atrofia de las gónadas, este conjunto de efectos se denominó disgénesis híbrida. La progenie del cruzamiento recíproco en cambio no mostró este síndrome (Kidwell & Kidwell, 1976). En posteriores estudios se determinó que la disgénesis era causada por la movilización del elemento P en la línea germinal. Cuando los machos que contiene el elemento P son cruzados con hembras que no lo portan se produce disgénesis por la activación del elemento. Este sistema es conocido como sistema P-M, adicionalmente es muy conocido el sistema I-M el cual también produce disgénesis híbrida por la movilización del elemento I, un retrotransposon sin LTR (Engels & Preston, 1979; Kidwell, 1983; Sved, 1979). Posteriormente, en cruzamientos de cepas de *D. virilis* se detectó la movilización de cuatro ETs: *Helena*, *Paris*, *Penelope*, *Ulysses* (Petrov et al., 1995; Vieira et al., 1998). En este último caso se ha detectado la movilización de uno o más ETs asociada a la disgénesis y se asume que la movilización de uno de ellos podría relajar los sistemas de represión permitiendo la movilización de los demás (Petrov et al., 1995).

1.5.2.2 Cruzamientos interespecíficos

Diversos estudios han demostrado que en los híbridos interespecíficos se produce un incremento de la actividad de algún ET. En plantas el número de casos es mayor, así en híbridos de *Arabidopsis* se ha observado la movilización del elemento ATHILA (Michalak, 2009), mientras que en híbridos intergenéricos del arroz (cultivo Matsumae y *Zaizania latifolia*) se observó la movilización de dos elementos del tipo MITE: wPing y Pong. Otro ejemplo lo observamos en el caso de las especies: *Helianthus anomalus*, *H. deserticola* y *H. paradoxus* que tienen origen híbrido (parentales *H. petiolaris* y *H. annuus*) (Ungerer et al., 2006; Shan et al., 2005) en donde se ha observado que tanto los híbridos como las especies parentales tienen el mismo número diploide de cromosomas, sin embargo los híbridos tienen un tamaño de genoma mayor (más del 50%). Este incremento en el tamaño del genoma se debe a la proliferación de los retrotransposones *Ty3/gypsy-like* y

Ty1/copia-like en los híbridos (Kawakami *et al.*, 2010; Ungerer *et al.*, 2006; Ungerer *et al.*, 2009)

En el reino animal también se han observado híbridos en cuyos genomas el incremento de la tasa de mutación estaba acompañada por un incremento de la actividad de los elementos móviles. Estudios basados en un híbrido de las especies *Wallabia bicolor* y *Macropus rufogriseus* mostraron un incremento de alrededor del 20 % en la expresión del retroelemento KERV-1 (kangaroo endogenous retroviral element- 1) y niveles muy bajos de metilación comparados con las especies parentales (O'Neill *et al.*, 1998). También en híbridos entre las especies *Macropus rufogriseus* x *Macropus agilis* se observó un incremento de la actividad del retroelemento KERV-1 que ha sido asociada a la inestabilidad en la región centromérica de los híbridos (Metcalf *et al.*, 2007).

Si nos referimos al género *Drosophila*, se ha detectado una alta tasa de mutaciones (Sturtevant, 1920), un aumento de rearrreglos cromosómicos (Naveira & Fontdevila, 1985) y la movilización del retrotransposon *Oswaldo* en los híbridos interespecíficos entre *D. buzzatii* x *D. koepferae*, sugiriendo que la transposición puede ser un mecanismo que influya en la presencia de incompatibilidades en el genoma de los híbridos (Labrador *et al.*, 1999).

1.5.3 Transposición espontánea y eventos poblacionales

En cepas de laboratorio de *Drosophila* se han observado explosiones de transposición espontánea de elementos como *Doc*, *copia* (Gerasimova *et al.*, 1990) ó P (Biémont *et al.*, 1990). Por otro lado, también se ha observado el incremento del número de copias del elemento 412 en poblaciones naturales de *D. simulans* en una población de Camberra (Vieira & Biémont, 1997). Las causas que producen estas explosiones de transposición son desconocidas. En el caso de las líneas de laboratorio no se ha comprobado si el efecto de la consanguinidad puede alterar la movilización de los ETs y en el caso de las poblaciones naturales se ha observado que después de estas explosiones se produce un período de estabilidad en el genoma el cual podría favorecer la adaptación de la población a los nuevos cambios producidos durante la transposición (García Guerreiro, 2011).

Por otro lado estudios comparativos entre poblaciones originales (Argentina) y poblaciones colonizadoras (España y Australia) de *D. buzzatii* han

mostrado que el elemento *Oswaldo* presenta baja ocupación por posición cromosómica, mientras las poblaciones colonizadoras presentan alta ocupación. Este incremento del número de copias por sitio en las poblaciones colonizadoras puede explicarse por deriva seguida de un efecto fundador o por un incremento de la tasa de transposición en determinadas posiciones (García Guerreiro & Fontdevila, 2011). El proceso de colonización, por tanto, puede ser un factor que actúe movilizando a los ETs en el genoma de las poblaciones colonizadoras como respuesta al estrés genómico y/o ambiental al que se enfrentan en el nuevo hábitat.

1.6 Mecanismos de control de los ETs: control epigenético

Los ETs tienen capacidad de moverse dentro del genoma hospedador y producir mutaciones que pueden alterar negativamente, en algunos casos, el desarrollo de los organismos. Frente a esta capacidad, el genoma hospedador ha desarrollado mecanismos epigenéticos capaces de controlar la proliferación de los ETs y mantener el equilibrio del genoma. Estos mecanismos epigenéticos, que incluyen la modificación de ADN y las histonas, la metilación y la producción de RNAs de interferencia (RNAi) específicos de los ETs, actúan a nivel transcripcional y/o postranscripcional.

1.6.1 Metilación del ADN y modificación de las histonas

La **metilación del ADN** supone la unión de un grupo metilo a las bases del ADN. En los eucariotas ésta se produce principalmente en las citosinas a través de una DNA metiltransferasa. Éste no es un mecanismo presente en todos los eucariotas, y en aquellos en que está presente, se ha observado diferentes niveles de metilación del ADN, existiendo incluso organismos en los cuales no se ha detectado metilación como *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Tribolium castaneum* y *Oikopleura dioica* (un tunicado). En el genoma de *Drosophila* tampoco se han detectado altos niveles de metilación del ADN. En plantas y mamíferos los residuos de citosina del ADN pueden estar metilados de forma simétrica (CpG) y esta metilación puede ser copiada a la nueva cadena de ADN lo cual lo convierte en un mecanismo que puede ser heredado para mantener los ETs silenciados (Zemach *et al.*, 2010).

Las observaciones de la actividad de tres transposones: *Activator* (*Ac*), *Suppressor-mutator* (*Spm*) y *Mutator* (*Mu*) en el genoma del maíz permitieron relacionar la inactivación de estos elementos con la metilación del ADN. Cuando *Ac* y *Spm* estaban activos el promotor presentaba hipometilación, mientras que *Mu* permanecía silenciado, debido a que su promotor estaba metilado. Posteriormente en *Arabidopsis* (Lister *et al.*, 2008), en humanos y en el ratón se ha observado que las regiones con secuencias repetitivas son las que mayores niveles de metilación presentan, lo mismo sucede en el genoma de las plantas (Zemach *et al.*, 2010) lo cual indicaría que los ETs se encuentran silenciados en estas regiones.

La **metilación de las histonas** a través de una histona-metiltransferasa, es otro mecanismo de control que mantiene silenciados los ETs ubicados en la heterocromatina pericentromérica. Los nucleosomas que están asociados con ETs tienen metilada la histona H3 en la lisina 9 (H3K9), estas modificaciones en el grupo amino terminal de las histonas impide la unión de los factores de transcripción lo cual reprime la transcripción e inactiva la cromatina. Mutaciones en los genes que actúan en la modificación de la H3K9 producen un incremento de la transcripción de los ETs. En *Arabidopsis* (Ebbs & Bender, 2006) y en el arroz (Ding *et al.*, 2007) se ha observado que mutaciones en los genes de la histona metiltransferasa reducen la metilación y producen la activación de ETs. De la misma forma, la desacetilación de las histonas participa como un sistema de silenciamiento de los ETs. Estas modificaciones tiene el objetivo de condensar la cromatina para evitar su transcripción.

1.6.2 Silenciamiento de los ETs a través de pequeños RNAs

Los pequeños RNA incluyen los RNAs de interferencia (RNAi), moléculas de RNA de longitud entre 21 y 35 nucleótidos que se encuentran presentes en el genoma de los eucariotas. El primer pequeño RNA observado, en *C. elegans*, fue un transcrito de 21 nucleótidos de una región no codificante del gen *lin-4* que reprimía el mRNA de *lin-14* al unirse, por complementariedad, al extremo 3' UTR (Lee *et al.*, 1993). Los pequeños RNAs mejor conocidos son: los pequeños RNA de interferencia (siRNA), los microRNA (miRNA) y los piwiRNA (piRNA), todos ellos interactúan con proteínas de la familia Argonauta formando un complejo inductor de silenciamiento RISC (RNA-induced silencing complex) para cumplir su función.

Las proteínas que interactúan con los pequeños RNA pertenecen a la familia Argonauta de la cual se conocen dos subfamilias: AGO y PIWI, estas presentan varios dominios entre los cuales hay uno con función de endonucleasa. En *Drosophila* se conocen dos proteínas de la familia AGO que se expresan en todos los tejidos: AGO1 y AGO2 y tres proteínas de la subfamilia PIWI que se expresan únicamente en células germinales: AGO3, Aubergine (Aub) y piwi (Malone *et al.*, 2009).

Los **miRNAs** presentan entre 20 y 22 nucleótidos, tienen origen endógeno y se originan a partir de RNAs de cadena simple que presentan complementariedad entre si produciendo moléculas de doble cadena procesados por las endonucleasas Dicer. Están presentes en plantas y animales y participan en el silenciamiento de algunos genes y ETs durante estrés ambiental.

Los **siRNAs** tienen de 24 a 27 nucleótidos, su secuencia corresponde a transposones u otras secuencias repetitivas que se encuentran presentes tanto en plantas como en animales. Participan en el silenciamiento transcripcional de los ETs y de algunos genes en células somáticas, dirigiendo a las metiltransferasas para que realicen la metilación del ADN y posteriormente la formación de la heterocromatina. La biogénesis de los siRNA requiere de la presencia de un RNA de cadena doble y de las proteínas Dicer que cortan el RNA de cadena doble, las cadenas sentido y antisentido cortadas se unen al complejo RISC para producir el silenciamiento. En *Drosophila* los siRNA se asocian a la proteína AGO2, y se encuentran presentes tanto en tejidos somáticos como en células germinales y en algunos casos parecerían ser controladores específicos de cierto tipo de elementos. Por ejemplo el elemento *Penelope* de *D. virilis* es fuertemente controlado por un siRNA en las gonadas aún a concentraciones piRNAs muy bajas.

Los **piRNAs** son los pequeños RNAs más largos (24-31 nucleótidos), tienen un mecanismo de biogénesis Dicer independiente conocido como ciclo "ping-pong" (figura 2), y se originan a partir de transcritos de DNA repetitivo o retrotransposones. En el ciclo ping-pong los piRNA asociados a AGO3 están formados por cadenas sentido, estos piRNA se unen a una cadena antisentido complementaria y la cortan dejando una U en el extremo 5' el cual es preferido para formar piRNA asociados con piwi ó Aub (Aubergine). A su vez, estos piRNA antisentido asociados a piwi ó Aub se unen a cadenas con sentido y las cortan

produciendo el extremo 5' en la cadena sentido al que se une AGO3. La función de los piRNAs está asociada al silenciamiento de DNA repetitivo (Saito *et al.*, 2006).

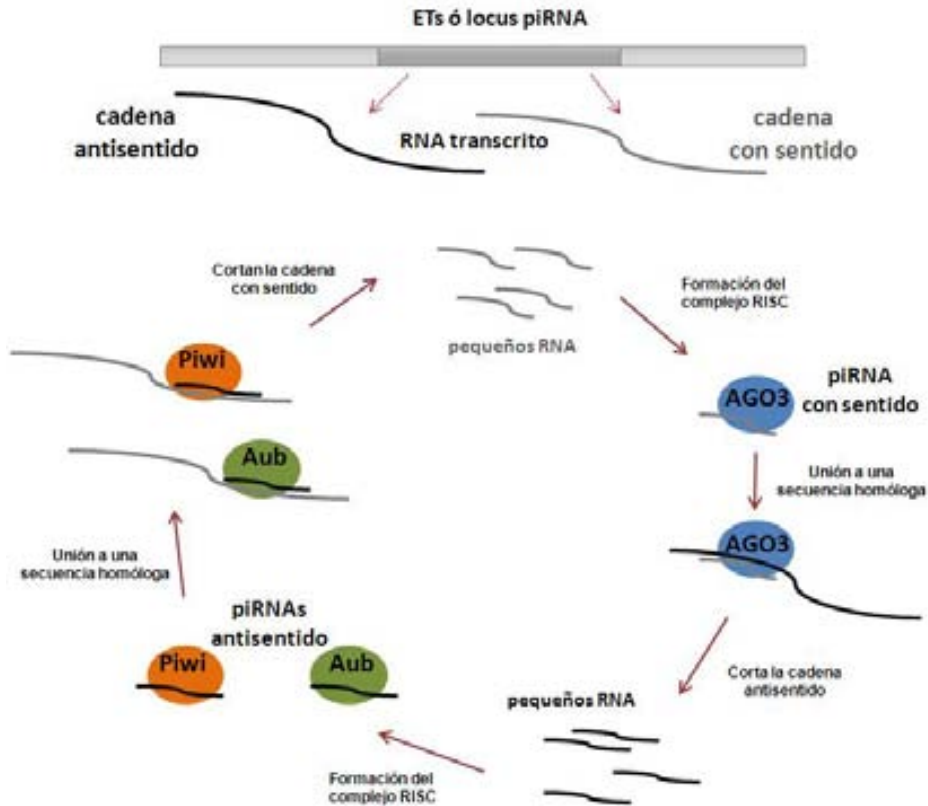


Figura 2. Ciclo "ping pong" de biogénesis de los piRNA

En *Drosophila* los piRNAs se expresan en células germinales y en el tejido somático correspondiente a las células foliculares que rodean los ovarios y son factores importantes en el mantenimiento de la integridad de la línea germinal y la fertilidad de hembras y machos (Lin & Spradling, 1997). Estudios con ratones, *Drosophila* y pez cebra indican que los piRNA son cruciales para el desarrollo de la línea germinal y que las proteínas asociadas a los piRNA también están implicadas en el control de la expresión de genes en células somáticas (Grimaud *et al.*, 2006; Pal-Bhadra *et al.*, 2002). Esto indica que los piRNA pueden tener un gran impacto en muchos procesos biológicos.

1.7 *D. buzzatii* y *D. koepferae* y sus híbridos interespecíficos

El género *Drosophila* es uno de los más diversos y mejor conocidos debido a su amplia distribución geográfica y a que muchas de las especies de este género son modelos de estudio en diversas áreas biológicas. Se agrupa en 15 subgéneros con más de 2000 especies (O'Grady & Markow, 2009) que se han reunido en grupos de especies clasificadas de acuerdo a sus características biológicas y ecológicas.

El grupo *repleta* (Wasserman, 1982) se compone de especies neotropicales y neárticas que en su gran mayoría están adaptadas a hábitats desérticos y semidesérticos con presencia de cactáceas pues su fuente de alimentación son sus frutos y tejidos en descomposición (Barker, 1981; Fontdevila & Wasserman, 1982). Dentro de este grupo se incluyen 6 subgrupos: *fasciola*, *hydei*, *mercatorum*, *mulleri*, *repleta* e *inca* (Diniz & Sene, 2004; Morán & Fontdevila, 2005; Rafael & Arcos, 1989; Vilela, 1983; Wasserman, 1982). El subgrupo *mulleri* (Patterson & Stone, 1952) comprende varios complejos entre los cuales está incluido el complejo *buzzatii*, que está dividido en 3 clusters: *stalker*, *martensis* y *buzzatii* (Fontdevila et al., 1988; Ruiz & Wasserman, 1993; Tidon-Sklorz, 1995). Las especies *D. buzzatii* y *D. koepferae*, consideradas en este trabajo, son dos especies sinmórficas que pertenecen al subgrupo *mulleri*, complejo *buzzatii* y cluster *buzzatii* del grupo *repleta* de *Drosophila*.

D. buzzatii es una especie originaria del Noroeste de Argentina y Bolivia que se ha expandido por el planeta colonizando la cuenca mediterránea de Europa, las Islas Canarias y Madeira, partes de la zona ecuatorial de Africa y Australia (Barker, 1981; Carson & Wasserman, 1965; Fontdevila & Wasserman, 1982; Fontdevila, 1982).

D. koepferae fue considerada como una raza cromosómica de *D. serido* pero posteriormente fue descrita como una especie del grupo *repleta* (Fontdevila et al., 1988) en base no solo a las diferencias observadas en su distribución geográfica (*D. koepferae* está distribuida en Bolivia y el norte de Argentina, mientras que *D. serido* se encuentra en Brasil), sino también a las diferencias en la morfología de la genitalia, el polimorfismo cromosómico, el polimorfismo de alozimas y el aislamiento reproductivo pre y postcigótico. Esto ha sido corroborado en posteriores análisis filogenéticos del cluster *buzzatii* que concuerdan con los

estudios anteriores señalando que existe divergencia significativa entre *D. koepferae* y *D. serido* (Rodríguez-Trelles et al., 2000). *D. buzzatii* emerge mayoritariamente de cactus del género *Opuntia*, y con menos frecuencia de cactus columnares del género *Cereus* y *Trichocereus*, lo opuesto ocurre con *D. koepferae* (Fanara et al., 1999; Fontdevila et al., 1988). Las dos especies comparten algunas áreas de distribución al noroeste de Argentina, donde se encuentran en simpatria (Carreira et al., 2008; Hasson et al., 1992). Este hecho ha conducido a que cada especie se adapte a explotar diferencialmente los recursos disponibles en el espacio y el tiempo (Fanara et al., 1999).

El contenido de ADN repetitivo presente en el genoma de *D. buzzatii* representa entre un 19 y un 26 % y en el genoma de *D. koepferae* entre el 27 y el 32% (Marin et al., 1992). En la base de datos de Drosophila, se han reportado 28 elementos transponibles presentes en el genoma de *D. buzzatii*: 412 (Cizeron et al., 1998) *Gypsy*, *Gandalf*, *R1*, *R2*, *micropia*, *Bari1*, *copia* (Biémont & Cizeron, 1999), *bilbo* (Blesa et al., 2001), *blanco* (García Guerreiro & Fontdevila, 2001) *Oswaldo* (Labrador & Fontdevila, 1994; Labrador et al., 1999), *ISBu2*, *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4*, *BuT5*, *BuT6*, *INE-1*, *Newton*, *Paris*, *Kepler*, *Galileo* (Cáceres et al., 2001), *Minos* (de Almeida & Carareto, 2005), *Isis* (García Guerreiro & Fontdevila, 2007) *ISBu3*, *ISBu4*, *ISBu5* (<http://flybase.org/reports>). En el genoma de *D. koepferae* en cambio se han reportado 6 elementos: *copia* (Francino & Cabre, 1993) *Gandalf*, *Gypsy* (Marin & Fontdevila, 1996), *Oswaldo* (Labrador & Fontdevila, 1994), *micropia* (de Almeida & Carareto, 2004), *Minos* (de Almeida & Carareto, 2005).

Estas dos especies sinmórficas tienen la capacidad de producir híbridos en condiciones experimentales cuando se cruzan hembras de *D. koepferae* con machos de *D. buzzatii*, sin embargo, el cruzamiento recíproco no produce descendencia. Los híbridos de la F1 se caracterizan por tener la fertilidad disminuida en el caso de las hembras y esterilidad total en el caso de los machos. En anteriores estudios los híbridos mostraron una alta tasa de rearrreglos cromosómicos lo que sugería inestabilidad en su genoma (Naveira & Fontdevila, 1985). Esta inestabilidad tenía cierto paralelismo con el modelo de disgénesis P-M de *D. melanogaster* por lo que se contempló la posibilidad de que los elementos transponibles fueran los causantes de dicha inestabilidad. Esta idea fue confirmada con las estimas de la tasa de transposición del elemento *Oswaldo* en híbridos de *D. buzzatii* x *D. koepferae*, que mostró un incremento claro de la tasa de

transposición en los híbridos (10^{-2}) con respecto a las especies parentales (10^{-3}). Además se observó que la movilización se producía por explosiones de transposición que ocurrían en determinados individuos híbridos y que su incremento no estaba afectado por la consanguinidad de las líneas parentales ni tampoco por el grado de introgresión cromosómica de *D. koepferae* en *D. buzzatii*. (Labrador & Fontdevila, 1994; Labrador *et al.*, 1999).

Los datos de los que disponemos, hasta el momento, sobre los híbridos interespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* y su genoma apoyan que la hibridación podría ser un mecanismo importante en promover la movilización de los ETs en *Drosophila*, lo cual incrementaría la inestabilidad en el genoma de los híbridos. Sin embargo estos estudios están limitados al elemento *Oswaldo* en el genoma de los híbridos y, por el momento, se desconoce el impacto de la hibridación en el conjunto total de ETs del genoma.

1.8 Características de los marcadores moleculares AFLP

La técnica de AFLPs (Amplified Fragment Length Polimorphisms) (Vos *et al.*, 1995) es una de las más ampliamente utilizadas en el estudio de la variabilidad genética en diferentes organismos. Esta técnica está basada en la digestión del ADN con enzimas de restricción; por lo que permite observar los cambios en el mapa de restricción a través de las diferencias en el patrón de tamaño y número de bandas por electroforesis. Estos diferentes patrones de restricción son el producto de las mutaciones: inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas en las dianas de restricción y también las inserciones o deleciones de fragmentos de ADN. La resolución del patrón de bandas depende principalmente de la complejidad del genoma analizado y su contenido de GC, y además del número de nucleótidos selectivos utilizados en la combinación de cebadores AFLP (Lin *et al.*, 1996).

Frente a otros marcadores moleculares, los AFLP presentan características que pueden ser ventajosas:

- Son marcadores dominantes
- Son altamente reproducibles
- No necesitan información previa del genoma analizado

-Requieren muy poco ADN de inicio.

-Permiten observar un alto nivel de variabilidad porque generan un gran número de marcadores.

-Presenta facilidades para su análisis, por ejemplo el uso de electroforesis por capilaridad.

Los marcadores AFLP han demostrado ser una herramienta potente en la caracterización del genoma completo de diversos organismos (Savelkoul *et al.*, 1999). En sus inicios se utilizaron principalmente en el estudio de plantas y más recientemente en el estudio de animales, hongos y bacterias (Bensch & Akesson, 2005; Bonin *et al.*, 2005; Stakenborg *et al.*, 2006). Estos marcadores son una herramienta de gran utilidad en diversas áreas como la Genética, la Evolución o la Ecología pues pueden ser aplicados para estimar diversos parámetros poblacionales como: diversidad genética, tasas de migración, distancias genéticas y para crear mapas de ligamiento (Chenuil, 2006; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Winter & Porter, 2010). También han sido utilizados para inferir relaciones filogenéticas entre especies o taxones emparentados (Despres *et al.*, 2003; Mendelson & Shaw, 2005; Mendelson & Shaw, 2005), para desvelar las diferencias genómicas entre los híbridos interespecíficos y las especies parentales (Divakaran *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007) y para la identificación de cepas y cultivos vegetales (Althoff *et al.*, 2007; Goldman *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2001).

Los marcadores AFLP se originan básicamente por dos procesos:

- Mutaciones puntuales que producen cambios en el sitio de restricción de la enzima, en un sitio adyacente, ó dentro de la banda/marcador. Esto produciría la creación o desaparición de un sitio de restricción y como consecuencia el incremento y/ó disminución del número de bandas amplificadas.
- La inserción/delección de fragmentos de ADN en una banda/marcador, que se traduciría en la formación de una nueva banda de tamaño diferente. Si ocurre una inserción, la nueva banda tendrá un tamaño más grande, mientras que si hay una delección la nueva banda será de menor tamaño que la banda original. En este caso las dianas de restricción permanecen inalteradas.

1.9 Objetivos

Hasta ahora existen datos contrastados de episodios de inestabilidad genómica centrados en determinados ETs, como es el caso de *Osvaldo* en *Drosophila*, pero carecemos de una visión global de la movilización genómica de todos los ETs. Debido a la importancia que la inestabilidad genómica híbrida está adquiriendo como mecanismo de reorganización del genoma que en algunos casos ha conducido a procesos evolutivos, se justifica el desarrollo de esta tesis. Se pretende iniciar un proceso experimental para conocer el perfil de episodios de inestabilidad a una escala genómica global, utilizando el caso contrastado de la inestabilidad genómica observada en híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepfereae*, y los AFLPs como marcadores genómicos. Además, se ha intentado cuantificar las tasas de transposición para un ET de cada clase (retrotransposones con y sin LTR y transposones de clase II). Nuestros resultados abren una ventana al genoma global visionando el comportamiento inestable de todos los ETs. La evaluación cualitativa y cuantitativa de los ETs descritos muestra su importancia relativa en los fenómenos de inestabilidad frente a otros posibles factores de naturaleza todavía no conocida.

1.9.1 Objetivos generales

- Determinar y comparar el nivel de inestabilidad genómica en los híbridos interespecíficos y las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepfereae* a través del estudio de los genomas usando marcadores moleculares AFLP.
- Estudiar los marcadores de transposición y la frecuencia relativa de las diferentes familias de elementos presentes. Este es un estudio cuantitativo y cualitativo a la vez.
- Cuantificar el nivel de transposición/reorganización genómica de una muestra representativa de elementos contenidos en los marcadores AFLP, en los genomas de los híbridos y las especies parentales.

1.9.2 *Objetivos específicos*

-Obtener híbridos interespecíficos entre las especies *D. buzzatii* y *D. koepferae* hasta la tercera generación de retrocruzamientos.

-Obtener progenie de cruzamientos intraespecíficos de las especies *D. buzzatii* y de *D. koepferae* como control.

-Observar los patrones de bandeo producido en 40 combinaciones de cebadores AFLP segregados en el genoma de los híbridos y de las especies parentales.

-Seleccionar los marcadores AFLP indicadores de inestabilidad en los genomas de los híbridos y en las especies parentales.

-Caracterizar por secuenciación y estudios bioinformáticos los marcadores AFLP de inestabilidad y determinar cuál es el porcentaje de inestabilidad originado por transposición.

-Cuantificar el número de inserciones de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* en los híbridos y especies parentales, a través de la técnica del transposon display.

-Cuantificar el nivel de transposición de los elementos *Oswaldo*, *Helena* (clase I) y *Galileo* (clase II) en los híbridos y especies parentales realizando una estima de las tasas de transposición/reorganización genómica.

Materiales y Métodos

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

En este estudio se utilizó la cepa BU28 de *D. buzzatii*, que se origina de la unión de las cepas LN 13, LN 19, LN 31 y LN33. Estas cepas fueron colectadas en la localidad de Los Negros, Bolivia en 1982 por miembros de nuestro grupo de investigación. La constitución cromosómica de esta especie es: Xabc 2abmnz⁷ 3b 4 5g 6.

Se utilizó la cepa KO2 de *D. koepferae* proveniente de una captura en la Sierra San Luis, Argentina en 1979. La información citológica disponible de esta cepa indica que tiene las inversiones: Xabc 2abmnz^{7j9} 3b 4 5 6 y además las inversiones polimórficas 2l⁹m⁹.

Las cepas fueron mantenidas a 25 °C, las cepas e información adicional de cada una se encuentran disponibles en el cepario del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

2.2 Cruzamientos

Se establecieron cruzamientos interespecíficos y posteriormente tres retrocruzamientos con el fin de obtener familias en las cuales se pudieran observar la descendencia durante tres generaciones. Cada familia está compuesta por los individuos parentales del cruzamiento interespecífico (P), los híbridos F1 (HF1), híbridos del retrocruzamiento 1 (HR1), del retrocruzamiento 2 (HR2) y del retrocruzamiento 3 (HR3).

Por otro lado, también se establecieron 10 cruzamientos intraespecíficos de cada una las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Estos servirán como control para establecer, en los diferentes experimentos, si los marcadores específicos de los patrones moleculares observados en los híbridos estaban presentes en las especies parentales y también para calcular las tasas de transposición de las especies originales.

En los cruzamientos intraespecíficos, interespecíficos y retrocruzamientos se siguió idéntica metodología que consistió en: seleccionar, aislar hembras y machos inmediatamente después de su eclosión y mantenerlos aislados por 3-4 días hasta

que alcanzaran la madurez sexual. Una vez establecido el cruzamiento se realizó el cambio de medio de cultivo cada 3 días, el noveno día del cruzamiento se aislaron los parentales en tubos y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser analizados.

2.2.1 Cruzamientos interespecíficos

De las cepas BU28 de *D. buzzatii* y KO2 de *D. koepferae* se aislaron machos y hembras vírgenes. Se establecieron 50 cruzamientos interespecíficos cruzando dos machos *D. buzzatii* con una hembra *D. koepferae*. Únicamente se realizaron cruzamientos en este sentido ya que los cruzamientos recíprocos no producen descendencia. Los cruzamientos fueron numerados del 1 al 50. Cada cruzamiento, que obtuvo descendencia, dio lugar a la formación de una familia que fue identificada con el número del cruzamiento interespecífico inicial: Familia 1, Familia 10, Familia 13, etc.

2.2.1.1 Retrocruzamiento 1 (R1)

Debido al escaso número de descendientes híbridos en la generación F1 (HF1) y para incrementar la probabilidad de fecundación de las hembras híbridas, el retrocruzamiento 1 se realizó de forma masal. Por lo tanto, dependiendo del número de hembras HF1 eclosionadas en cada familia, se retrocruzaron 1, 2 ó 3 hembras HF1 de la misma familia (el mismo cruzamiento interespecífico inicial) con igual número de machos *D. buzzatii* (1, 2 ó 3 machos).

2.2.1.2 Retrocruzamientos 2 y 3 (R2 y R3)

El retrocruzamiento 2 se hizo, cruzando individualmente cada una de las hembras híbridas HR1 obtenidas con un macho de *D. buzzatii*. Este retrocruce R2 produjo como descendencia hembras híbridas HR2 (que fueron aisladas para el siguiente retrocruzamiento) y machos HR2 que fueron guardados a -80°C

De la misma manera, en el retrocruzamiento R3 se hicieron cruzamientos individuales de cada una de las hembras híbridas HR2 con un macho de *D. buzzatii*. En este retrocruzamiento (R3) se retrocruzaron además los machos híbridos HR2 de forma individual con una hembra de *D. buzzatii*. Tanto los machos como las hembras HR3 obtenidas del retrocruzamiento R3 se guardaron a -80°C.

Para diferenciar los cruzamientos hermanos de cada familia, en cada generación, se los denominó conservando el número del cruzamiento inicial y en

cada generación se adicionó un número correspondiente al número de cruzamientos hermanos. Por ejemplo:

Cruzamiento interespecífico	10
Retrocruzamiento R1	10.1, 10.2, 10.3, etc...
Retrocruzamiento R2	101.1, 101.2, etc...
Retrocruzamiento R3	1011.1, 1011.2, etc...

El sistema de cruzamientos interespecíficos y retrocruzamientos R1, R2 y R3 se muestra en la figura 3.

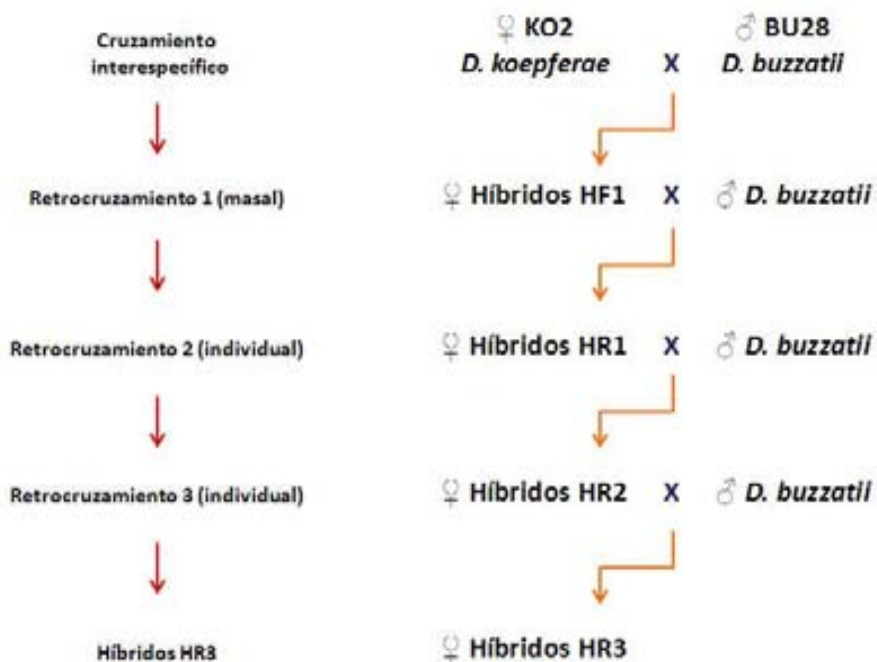


Figura 3. Sistema de retrocruzamientos interespecíficos

2.2.2 Híbridos segmentales e híbridos HR3 externos

Los híbridos segmentales son híbridos que se obtienen a partir de un cruzamiento interespecífico manteniendo por selección citológica la línea con el fragmento introgresado a través de retrocruzamientos individuales sucesivos en los cuales se cruzan las hembras híbridas con machos de *D. buzzatii*. En cada generación de retrocruzamientos se analizan los cromosomas politénicos de las larvas de tercer estadio con el fin de comprobar citológicamente la introgresión del fragmento de interés, en este caso el fragmento F3-F4 del cromosoma 4. La introgresión se determina por la observación de una asinapsis en la región cromosómica introgresada (figura 4). Para mantener la línea se seleccionan y se retrocruzan las hembras de aquellos cruzamientos en los cuales la introgresión se conservó sin alteraciones. Dado que en el laboratorio disponíamos de líneas de híbridos segmentales, obtenidas en experimentos anteriores (Morán, 2009), se analizó la línea F3-F4 del cromosoma 4, lo que significa que estos híbridos tienen la región cromosómica F3-F4 del cromosoma 4 de *D. koepferae* introgresada en el genoma de *D. buzzatii*.



Figura 4. Asinapsis en el cromosoma 4, región F3-F4, en híbridos segmentales.

Los híbridos denominados **híbridos HR3 externos**, provienen del mismo experimento que los híbridos segmentales y se han aprovechado para localizar los marcadores AFLP de inestabilidad. Estos marcadores fueron analizados junto con los marcadores de inestabilidad de los híbridos segmentales (en un experimento previo a los híbridos HR1, HR2 y HR3) para hacer una prospección del origen de los marcadores que segregaban solo en los híbridos (bandas H).

2.2.3 Cruzamientos intraespecíficos (controles)

Se establecieron 10 cruzamientos individuales intraespecíficos de cada una de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae* durante 4 generaciones. Los cruzamientos de *D. buzzatii* se nombraron B1, B2,... hasta B10. Los cruzamientos de *D. koepferae* se nombraron K1, K2,... hasta K10. La figura 5 esquematiza el sistema de estos cruzamientos.

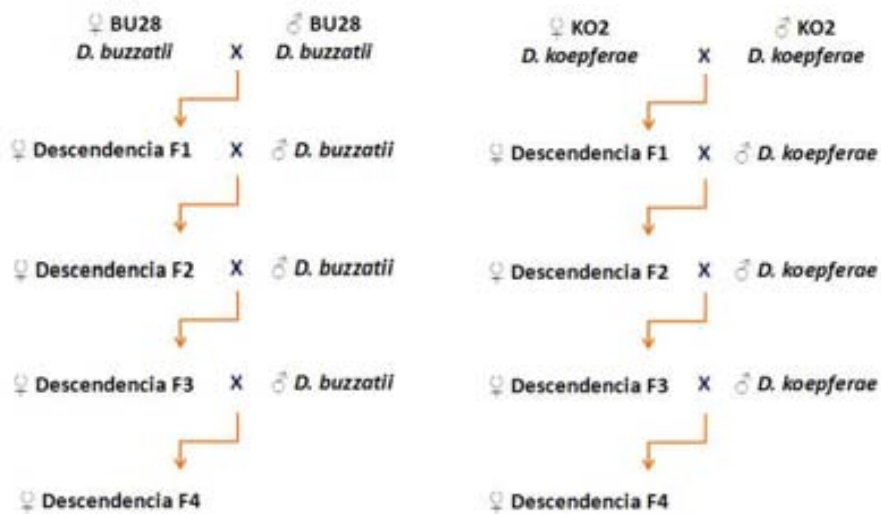


Figura 5. Sistema de cruzamientos intraespecíficos (controles)

2.3 Extracción de ADN individual

Las moscas se mantuvieron congeladas a -80°C hidratándolas 15 minutos antes de la extracción con Buffer A (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 0,5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5). El ADN fue extraído utilizando el método descrito por Piñol (Piñol *et al.*, 1988) a partir de cada uno de los individuos híbridos y parentales. Posteriormente se procedió al etiquetado según una numeración que adiciona un número (identificativo del cruzamiento) en cada generación para su posterior análisis.

2.4 Selección de híbridos para la obtención de marcadores AFLP

Para la obtención de los marcadores AFLP, en la generación R1, se tomaron en cuenta todos los cruzamientos interespecíficos en los cuales se obtuvo descendencia de híbridos HR1 (excepto la familia 4). Con el propósito de incluir también a los híbridos HF1 en el análisis, se juntó el ADN de los individuos procedentes de una misma familia y mismo retrocruce, analizando luego la mezcla como una sola muestra. Los híbridos HF1 y HR1 analizados se detallan en la tabla 1.

Para el seguimiento de los AFLP en las generaciones R2 y R3 se continuó con los híbridos de tres familias: familia 10, 13 y 40. De cada familia se seleccionaron 12 hembras híbridas HR2 (6 fértiles y 6 infértiles) y del retrocruzamiento R3 se analizaron 6 hembras HR3 y 6 machos HR3. Los híbridos analizados en cada familia fueron los numerados en la tabla 2.

En el caso de los híbridos segmentales, el experimento se basó en 14 híbridos segmentales de la región F3-F4 del cromosoma 4 numerados: 1, 2, 3,... hasta 14.

Los híbridos HR3 externos analizados fueron: 1. 1; 1.2; 1.3; 1.4 y 3.2 (el número entero identifica la familia y el decimal identifica al individuo).

Tabla 1. Híbridos HF1 y HR1 analizados par obtener los marcadores AFLP

Familias	Cruce interespecífico		Retrocruzamientos R1		Híbridos HR1
	Parentales		Parentales R1		
	♂♂ Db	♀ Dk	♂♂ Db	♀♀ HF1	
Familia 1	1	1	1.1A	1.1A	11.1
	1		1.1B	1.1B	
			1.1C	1.1C	
Familia 7	7	7	7.1A	7.1A	71.1
	7		7.1B	7.1B	
			7.1C	7.1C	
Familia 10	10	10	10.3A	10.3A	103.1
			10.3B	10.3B	
Familia 12	12	12	12.1A	12.1A	121.1
	12		12.1B	12.1B	121.2
Familia 13	13	13	13.1A	13.1A	131.1
			13.1B	13.1B	131.2
			13.1C	13.1C	131.3
			13.2A	13.2A	132.1
			13.2B	13.2B	132.2
				132.3	
Familia 23	23	23	23.1A	23.1A	231.1
			23.1B	23.1B	231.2
			23.1C	23.1C	231.3
					231.4
				231.5	
Familia 34	34	34	34.1	34.1	341.1
	34				
Familia 39	39	39	39.1A	39.1A	391.2
	39		39.1B	39.1B	
			39.1C	39.1C	
Familia 40	40	40	40.1A	40.1A	401.1
			40.1B	40.1B	401.2
			40.1C	40.1C	401.3
					401.4
			40.2A	40.2A	402.1
				40.2B	402.2
					402.3
		402.4			
Familia 46	46	46	46.2A	46.2A	462.1
	46		46.2B	46.2B	462.2
			46.2C	46.2C	
			46.3A	46.3A	463.1
			46.3B	46.3B	463.2
		46.3C	46.3C	463.3	

Tabla 2. Híbridos HR2 y HR3 analizados para la obtención de los marcadores AFLP

Familia 10			Familia 13			Familia 40		
♀ HR2	♀ HR3	♂ HR3	♀ HR2	♀ HR3	♂ HR3	♀ HR2	♀ HR3	♂ HR3
1031.3	10317.1	10317.8	1323.4	132321.2	132321.8	4013.1	401315.1	401315.8
1031.4	10317.2	10317.10	1323.6	132321.3	132321.9	4013.3	401315.2	401315.9
1031.5	10317.3	10317.11	1323.8	132321.4	132321.10	4013.4	401315.3	401315.10
1031.6	10317.4	10317.12	1323.9	132321.5	132321.11	4013.5	401315.4	401315.11
1031.7	10317.5	10317.13	1323.10	132321.6	132321.12	4013.6	401315.5	401315.12
1031.8	10317.6	10317.14	1323.13	132321.7	132321.13	4013.7	401315.7	401315.13
1031.11			1323.15			4013.8		
1031.12			1323.16			4013.9		
1031.13			1323.21			4013.11		
1031.14			1323.30			4013.12		
1031.15			1323.40			4013.13		
1031.18			1323.45			4013.15		

2.5 Selección de individuos de cruces intraespecíficos (controles) para obtener los marcadores AFLP

En ambas especies parentales se analizaron los híbridos de la generación F4, la cual corresponde a la generación de los híbridos analizados (R3). La identificación de los individuos analizados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Individuos de los cruces intraespecíficos (controles) analizados para obtener los AFLP

<i>D. buzzatii</i>		<i>D. koepferae</i>	
♀	♂	♀	♂
4.1	4.9	9.1	9.9
4.2	4.10	9.2	9.10
4.3	4.11	9.3	9.11
4.4	4.12	9.4	9.12
4.5	4.13	9.5	9.13
4.6	4.14	9.6	9.14
4.7	4.15	9.7	9.15
4.8		9.8	

2.6 Obtención de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism)

La técnica de los AFLPs (Vos *et al.*, 1995) se basa en la digestión del ADN con dos enzimas de restricción, la ligación de los fragmentos a adaptadores (oligonucleótidos) específicos para cada enzima. Luego se realizan dos amplificaciones utilizando cebadores complementarios a los adaptadores, a los cuales se añade nucleótidos en el extremo 3' para seleccionar los fragmentos amplificados. En este estudio fueron utilizadas 2 enzimas de restricción: *EcoRI* (una enzima de corte frecuente que reconoce la diana de restricción de 6 nucleótidos (G/AATTC)) y *MseI* (una enzima de corte bastante frecuente que reconoce una diana de restricción de 4 nucleótidos (T/TAA)).

La primera amplificación ó PCR preselectiva utiliza el producto de digestión-ligación diluido (1/20) como ADN molde y los cebadores tiene un nucleótido adicional en el extremo 3'. La segunda amplificación ó PCR selectiva es una amplificación anidada que utiliza el producto de la primera amplificación diluido (1/20) como ADN molde y los cebadores de *EcoRI* más dos nucleótidos adicionales y los cebadores de *MseI* más tres nucleótidos adicionales en el extremo 3' (figura 6).

Las enzimas de restricción fueron adquiridas a New England BioLabs y los adaptadores y cebadores fueron fabricados por Sigma-Aldrich. Se utilizaron las polimerasas *EcoTaq* DNA Polimerasa (Ecogen) y *KapaTap* DNA Polimerasa (Kapabiosystem) ambas de características similares. Para la amplificación se utilizaron los termocicladores modelo PTC-100 (MJ Research, Inc.).

2.6.1 Reacción de Digestión-Ligación

Para obtener los marcadores AFLPs se realizó la digestión del ADN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* y simultáneamente, en la misma reacción, se ligaron los adaptadores de cada enzima a los fragmentos de restricción obtenidos. La concentración de los reactivos se muestra a continuación:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (11 µl)
T4 Lig buffer/ATP 10x	1x	0.6 µl
NaCl 0,5 M	0.05 M	0.6 µl
BSA 100x	1x	0.06 µl
ATP 10 mM	0.1 mM	0.06 µl
EcoRI Adaptador 5 µM	0.5 µM	0.6 µl
MseI Adaptador 50 µM	5 µM	0.6 µl
Enzimas		
EcoRI 20 U/µl	5 U	0.25 µl
MseI 10 U/µl	1 U	0.1 µl
T4 DNA Ligasa 10 U/µl	1 U	0.1 µl
H ₂ O		2.19 µl
ADN	50-300 ng/µl	5 µl

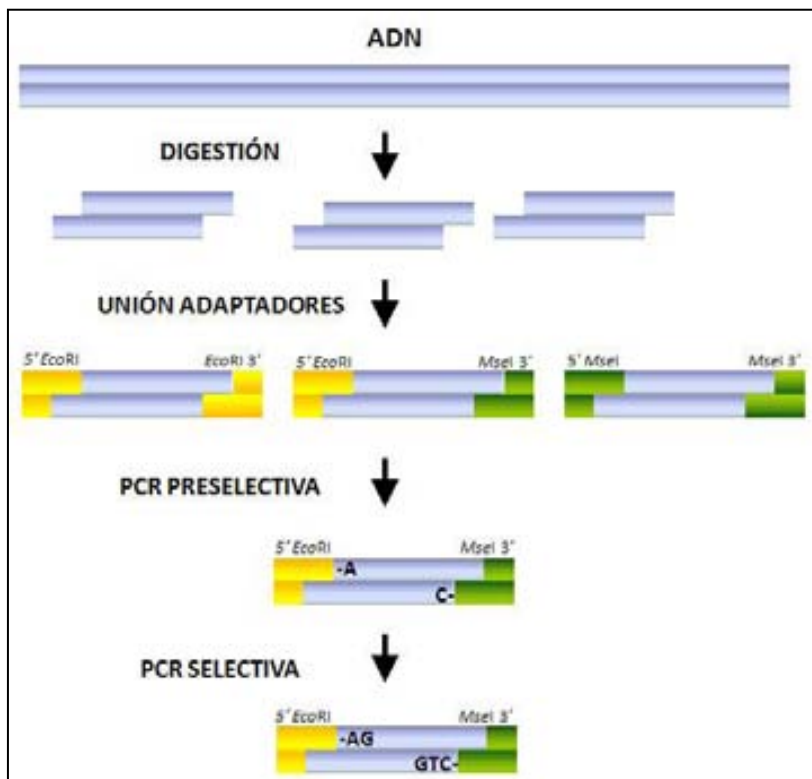


Figura 6. Esquema del desarrollo de la técnica AFLP para la obtención de marcadores moleculares de transposición

2.6.2 Preparación de los adaptadores

Adaptadores para la enzima *EcoRI* :

EcoRI adaptador A: 5' -CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3'

EcoRI adaptador B: 3' -CAT CTG ACG CAT GGT TAA- 5'

Adaptadores par la enzima *MseI*:

MseI adaptador A: 5' -GAC GAT GAG TCC TGA G- 3'

MseI adaptador B: 3' -CTA CTC AGG ACT CAT- 5'

Se realiza la mezcla de los adaptadores de cada enzima y se procede a su desnaturalización en el termociclador con el programa: 5 minutos a 95°C, 25 segundos 95°C y 1 minuto 20°C C. Se retiran las muestras del termociclador y se dejan en hielo, posteriormente se guardan a -20°C.

2.6.3 PCR preselectiva

Para la reacción de PCR preselectiva se diseñaron cebadores complementarios a los adaptadores de cada una de las enzimas, a los que se adicionó un nucleótido selectivo en el extremo 3'.

La reacción de PCR selectiva se muestra a continuación:

Reactivos	Concentración inal	Volumen final (20 µl)
H2O		6.2 µl
PCR buffer 10x	1x	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µM	0.6 µl
DNTPs 2 µM	0.2 µM	2 µl
Cebador <i>EcoRI</i> 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
Cebador <i>MseI</i> 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
DNA polimerasa 5U	1 U	0.2 µl
Producto digestión-ligación		5 µl

El programa del termociclador utilizado para esta reacción: 2 min 72°C; 20 ciclos de [20 seg 94°C, 30 seg 56 °C, 1 min 72 °C]; 20 seg 94 °C, 2 min 72 °C, 30 min 60 °C, 4 °C.

2.6.4 PCR selectiva

En la reacción de PCR selectiva se utilizaron cebadores que contenían 2 nucleótidos selectivos adicionales, en el caso de *EcoRI*, y 3 en el caso de *MseI*. La reacción se detalla a continuación:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (20 ul)
H ₂ O		6.2 µl
PCR buffer 10x	1x	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µM	0.6 µl
DNTPs 2 µM	0.2 µM	2 µl
Cebador <i>EcoRI</i> 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
Cebador <i>MseI</i> 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
DNA polimerasa 5U	1 U	0.2 µl
Producto PCR preselectiva		5 µl

El programa de amplificación selectiva fue: 2 min 94 °C, 20 seg 94 °C, 30 seg 66 °C, 1 min 72 °C; 9 ciclos de [20 seg 94 °C, 30 min 66 °C - 1 °C/ciclo, 1 min 72 °C]; 20 seg 94 °C; 20 ciclos de [20 seg 94 °C, 30 seg 56 °C, 1 min 72 °C]; 20 seg 94 °C, 30 min 60 °C, 4 °C.

2.7 Combinaciones de cebadores *EcoRI* y *MseI* utilizadas para obtener los AFLP

En los híbridos HR1, HR2 y HR3 se analizaron los AFLP de 40 combinaciones de cebadores *EcoRI* y *MseI*. Debido a que algunas de las combinaciones producían patrones de bandas muy complejos, fueron eliminadas en los análisis de las siguientes generaciones remplazándose por otras combinaciones nuevas. Las combinaciones de cebadores en las PCRs preselectiva y selectiva en cada generación de híbridos HR1, HR2 y HR3 se detallan en la tabla 4. En los híbridos segmentales se analizaron los AFLPs de 27 combinaciones de cebadores que se indican en la tabla 5.

El experimento del cual fueron seleccionados los híbridos HR3 externos, analizó los AFLP de 50 combinaciones de cebadores en cuatro familias de híbridos (Morán, 2009).

Tabla 4. Combinaciones de cebadores AFLP usados en las PCRs preselectiva y selectiva

PCR Preselectiva		PCR Selectiva		Híbridos		
Cebador EcoRI	Cebador Msel	Cebador EcoRI	Cebador Msel	HR1	HR2	HR3
T	G	TG	GCG	+	+	+
T	G	TG	GCC	+	+	+
T	G	TG	GCA	+	+	+
T	G	TG	GAT	+	+	+
T	G	TG	GGG	+	+	+
T	C	TG	CCC	+	+	+
T	C	TG	CGG	+	+	+
T	C	TG	CTC	+	+	+
T	A	TG	ATT	+	+	+
T	A	TG	AGT	-	+	+
T	A	TC	AGT	-	+	+
T	A	TT	ATT	-	-	+
T	A	TT	AGT	-	-	+
T	T	TG	TCG	+	+	+
T	T	TG	TAG	-	-	+
T	T	TG	TAC	-	+	+
T	T	TC	TCG	-	+	+
T	T	TT	TCG	-	+	+
T	T	TT	TAG	-	-	+
T	T	TT	TAC	-	-	+
C	G	CA	GCA	+	+	+
C	G	CA	GAT	+	+	+
C	G	CA	GCG	+	+	+
C	G	CA	GGG	+	-	+
C	G	CG	GCA	+	+	+
C	G	CG	GAT	+	+	+
C	G	CG	GCG	+	+	+
C	G	CG	GCC	+	-	+
C	G	CG	GGG	+	+	+
C	G	CC	GCA	+	+	+
C	G	CC	GAT	+	+	+
C	G	CC	GCG	+	+	+
C	G	CC	GCC	+	+	+
C	G	CC	GGG	+	-	+
G	G	GG	GGG	-	-	+
G	G	GG	GCC	-	+	+
G	G	GT	GCG	-	+	+
G	G	GT	GGG	-	+	+
G	G	GT	GCC	+	+	+
C	A	CG	AGT	+	-	+
G	C	GT	CTC	+	+	-
G	C	GT	CAT	+	-	-
G	C	GT	CGG	+	+	-
G	C	GG	CTC	+	+	-
G	C	GG	CAT	+	-	-
G	C	GG	CGG	+	+	-
G	A	GG	AGT	+	+	-
G	A	GG	ATT	+	+	-
G	A	GC	AGT	+	+	-
G	A	GC	ATT	+	+	-
C	C	CA	CTC	+	-	-
C	C	CA	CAT	+	-	-
C	C	CG	CCC	+	+	-
C	C	CC	CCC	+	+	-
Total combinaciones selectivas				40	40	40

+ combinación analizada, - combinación no analizada en cada generación de híbridos

Tabla 5. Combinaciones de cebadores AFLP analizadas en los híbridos segmentales F3-F4

PCR preselección		PCR selectiva	
Cebador <i>EcoRI</i>	Cebador <i>MseI</i>	Cebador <i>EcoRI</i>	Cebador <i>MseI</i>
A	T	AG	TCG
A	A	AG	AGT
A	A	AG	ATT
A	C	AG	CTC
A	C	AG	CAT
A	G	AG	GAT
T	T	TG	TCG
T	T	TG	TAT
T	A	TG	AGT
T	A	TG	ATT
T	C	TG	CTC
T	C	TG	CAT
T	G	TG	GCA
T	G	TG	GAT
C	T	CG	TCG
C	T	CG	TAT
C	T	CA	TCG
C	T	CA	TAT
C	A	CG	AGT
C	C	CG	CTC
C	C	CG	CAT
C	C	CA	CTC
C	C	CA	CAT
C	G	CA	GCA
C	G	CG	GCA
C	G	CA	GAT
C	G	CG	GAT

2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los fragmentos amplificados en la PCR selectiva, fueron separados mediante electroforesis vertical en geles no denaturalizantes o "natural PAGE" (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 8%. Las cantidades de cada reactivo para la preparación de un gel (120 ml) se describen a continuación:

Reactivos	Volumen (120 ml)
Acilamida-bisacilamida 30%	32 ml
Tampón TBE 10X pH 8.3	10 ml
APS 10% (Amonio persulfato)	1ml
TEMED	40 µl
H ₂ O	77 ml

La electroforesis se efectuó con el sistema PROTEAN II xi cell (BIORAD) utilizando TBE 1X (Tris Borato-EDTA) para separar las bandas y tiñendo los geles con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 40 minutos. El tiempo de electroforesis fue de 8 horas a 100 voltios utilizando el marcador de peso molecular TrackIt 50 bp DNA Ladder (Invitrogen), que permitió la discriminación de bandas de un rango entre 50 y 2000 pb.

2.9 Selección de marcadores AFLPs de inestabilidad en los híbridos

Los marcadores AFLP fueron seleccionados y analizados en los híbridos HR1, HR2 y HR3, híbridos HR3 externos, híbridos segmentales y en la descendencia F4 de los cruzamientos intraespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, usados como controles.

El patrón de bandas AFLP observadas en los geles, descritos en el apartado anterior, permitió la identificación de 4 tipos de bandas en los híbridos como se muestra en la figura 7:

- Bandas Db: bandas presentes en *D. buzzatii* y en los híbridos.
- Bandas Dk: bandas presentes en *D. koepferae* y en los híbridos.
- Bandas Db/Dk: bandas presentes en las dos especies parentales, *D. buzzatii* y *D. koepferae*, y en los híbridos.

- Bandas H: bandas presentes únicamente en los híbridos por ser producto de los cambios genéticos que generan inestabilidad en éstos.

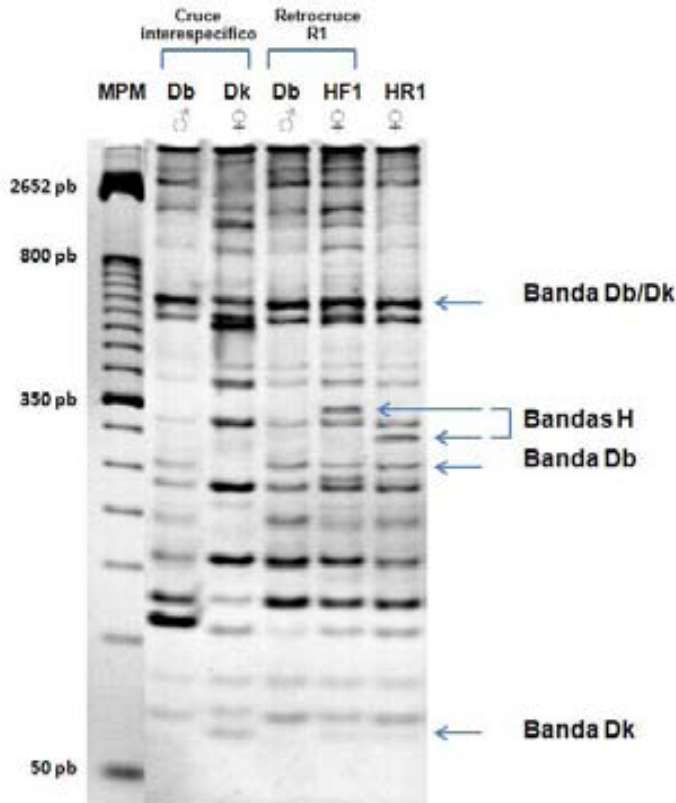


Figura 7. Tipos de bandas AFLP encontradas en el genoma de los híbridos

Del patrón de bandas totales observadas para cada combinación de cebadores AFLP, se localizaron y seleccionaron las bandas H de los híbridos. Estas bandas se denominaron marcadores de inestabilidad ya que nos muestran los cambios en el genoma experimentados en los híbridos cuando los comparamos con las especies parentales. Estas bandas fueron luego aisladas del gel para su clonación y posterior secuenciación

En la identificación de cada uno de los marcadores de inestabilidad utilizamos como nomenclatura la combinación de cebadores y un número

compuesto por dos dígitos. Por ejemplo el marcador CGATT21 sería uno de los marcadores obtenidos con la combinación de cebadores *EcoRI* CG y *MseI* ATT.

2.10 Clonación de marcadores AFLP de inestabilidad

Para clonar los marcadores AFLPs se utilizó el Kit comercial pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega Corporation). En la reacción de ligación se mezclaron los componentes del kit utilizando los volúmenes abajo señalados e incubando toda la noche a 4°C:

Reactivos	Volumen (10µl)
2x buffer T4 DNA Ligasa	5 µl
pGEM-T Easy vector	1 µl
T4 DNA Ligasa	1 µl
DNA	3 µl

El producto de la ligación (10 µl) se inocula a una alícuota (100 µl) de células de *E. coli* (cepa DH5α) competentes y se deja reposar 20 minutos en hielo. Posteriormente se realiza un choque térmico a 42°C durante un minuto y medio, se añade medio de cultivo 2xYT (500 µl) y se deja en crecimiento con agitación una hora. Después del período de crecimiento, las células DH5α fueron sembradas en placas LB-agar con Ampicilina y X-Gal a una concentración de 25 mg/ml cada una dejándolas en crecimiento a 37°C toda la noche. Como resultado, se obtendrán colonias de color azul (contienen únicamente plásmido) y otras de color blanco (contienen el plásmido con el inserto), que son las que nos interesan.

2.10.1 Selección de colonias positivas

Para cada marcador AFLP se seleccionaron al azar 50 colonias blancas, las cuales fueron picadas e inoculadas en medio LB líquido provisto de Ampicilina a una concentración de 25mg/ml. Posteriormente fueron puestas en crecimiento toda la noche a 37°C, sirviendo de suministro de ADN cebador para una posterior PCR. Así amplificaremos y comprobaremos el fragmento insertado en el plásmido mediante el uso de los mismos cebadores (la misma combinación de cebadores *EcoRI* y *MseI*) de la PCR selectiva del marcador AFLP. Por lo tanto hacemos 50 reacciones de PCR de colonias (1 por cada colonia) para cada marcador AFLP, utilizando el mismo programa de amplificación que para la amplificación selectiva.

A continuación se muestra la reacción de PCR de colonias:

PCR de colonias

Reactivos	Concentración final	Volumen final (20 µl)
H ₂ O		9.2 µl
PCR buffer 10x	1x	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µM	0.6 µl
DNTPs 2 µM	0.2 µM	2 µl
Cebador EcoRI 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
Cebador MseI 2.75 µM	0.275 µM	2 µl
DNA polimerasa 5U	1 U	0.2 µl
cultivo bacteriano		2 µl

Para la comprobación de esta PCR de colonias se cargan 2 µl del producto de cada PCR de colonias en gel de poliacrilamida, junto con una muestra de la PCR selectiva del híbrido (ó del individuo) del cual proviene el marcador AFLP. El patrón de bandas del híbrido sirve como referencia para identificar el marcador que estamos clonando y diferenciarlo de otras bandas que puedan tener tamaños similares. Las colonias que contienen el marcador AFLP buscado son seleccionadas para el aislamiento del plásmido mediante el Kit QIAprep®Spin Miniprep (QIAGEN). De estas colonias positivas se guarda paralelamente una alícuota en 15 % de glicerol a -70 °C.

2.11 Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación nucleotídica de los marcadores AFLP fue realizada a través del servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Corea) utilizando los siguientes cebadores universales:

T7 directo: 5` GTAATACGACTCACTATAGGGC 3`

M13/pUC reverso: 5` GAGCGGATAACAATTCACACAGG 3`

De cada marcador AFLP se secuenciaron cinco clones con el fin de descartar posibles bandas que mostraran polimorfismo en el tamaño del marcador. El primer análisis de estas secuencias nucleotídicas se realizó con la ayuda del programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>). Posteriormente, para

determinar el origen de los marcadores de inestabilidad, se realizaron alineamientos de dichos marcadores en diversas bases de datos buscando homologías con ADN de *Drosophila* y/o ADN repetitivo.

Las principales bases de datos y sistemas de búsqueda utilizados fueron:

-Flybase (<http://www.flybase.org>), es una base de datos específica que alberga el genoma de las 12 especies de *Drosophila* secuenciadas hasta el momento. En esta base se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para buscar homologías con el genoma de las especies de *Drosophila*, con énfasis en las especies *D. mojavensis* (genoma de referencia para la especie del grupo *repleta*), *D. melanogaster* (especie modelo cuyo genoma es el mejor descrito) y *D. virilis* (miembro del grupo *virilis*, filogenéticamente relacionado con el grupo *repleta*) (Throckmorton, 1975).

-UCSC (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>), es la base de datos del Genome Bioinformatics Group, University of de California Santa Cruz, en donde se utilizó la herramienta Blat para buscar similitud sobre el ensamble del genoma de *D. mojavensis*.

En el caso de la búsqueda sobre secuencias anotadas en el GenBank, utilizamos los algoritmos del Blastn y Blastx en los cuales la búsqueda se basó sobre similitudes nucleotídicas en el primer caso y similitudes en los productos de transcripción en el segundo caso.

Para la búsqueda de homología con ADN repetitivo se utilizó la base de datos Repbase del Genetics Information Research Institute (<http://www.girinst.org/>) a través de la herramienta CENSOR. Los alineamientos se realizaron contra ADN repetitivo y ETs del genoma de *Drosophila* específicamente, utilizando las diferentes opciones de alineamiento: productos transcritos, secuencias idénticas, repeticiones simples o pseudogenes enmascarados.

2.12 FISH (Fluorescent *In situ* Hybridization)

2.12.1 Preparación de cromosomas politénicos

Se realizaron preparaciones cromómicas de cromosomas politénicos de glándulas salivares mediante su disección a partir de larvas de tercer estadio en

una solución salina (NaCl 0,8%). Inmediatamente fueron trasladadas a una gota de ácido acético al 45% durante un minuto y posteriormente a una solución de fijación 1:2:3 (ácido láctico, H₂O, ácido acético) sobre un cubreobjetos durante 7 minutos. Con un portaobjetos se procede a recoger el cubreobjetos con las glándulas y a realizar el aplastado de los cromosomas mediante una prensa mecánica. Se deja a 4°C toda la noche retirando al cabo de 24h el cubreobjetos y sumergiendo la preparación en nitrógeno líquido unos segundos. A continuación se sumergen las preparaciones en etanol absoluto frío 2 horas y 30 minutos. Para finalizar el proceso, se retiran las preparaciones del etanol y se dejan secar a temperatura ambiente para ser luego conservadas a 4°C hasta el momento de su uso.

2.12.2 Prehibridación

Para eliminar las proteínas básicas se sumergen las preparaciones cromosómicas en una solución de 2xSSC a 65°C durante 30 minutos. La deshidratación de los cromosomas se realiza sumergiendo las preparaciones en una serie de etanoles durante 10 minutos en cada uno: etanol al 70%, a 65°C, al 70% a 35°C y al 95% a 35°C. Se dejan secar y se guardan a 4°C.

2.12.3 Hibridación

Para la hibridación se procede a una desnaturalización previa de los cromosomas sumergiendo las preparaciones en una solución 0.1 N de NaOH durante 90 segundos y luego lavando tres veces en 2xSSC durante 1 minuto cada vez. Se continúa con la deshidratación de los cromosomas sumergiendo las preparaciones en soluciones de etanol al 30%, 50%, 70 % y 95 % durante 5 minutos en cada una de ellas. Posteriormente se deja secar el exceso de etanol y se marca el área donde se encuentran los cromosomas para localizarlos con más facilidad.

2.12.4 Marcaje de la sonda con fluoresceína

El marcaje directo de la sonda con fluoresceína se realiza mediante una PCR para la que se utiliza el Alexa Fluor® 488 Signal Amplification kit for Fluorescein and Oregon Green® Dye Conjugated Probes (Roche Farma S.A.). Este kit permite la amplificación de la señal de hibridación a través de una reacción de inmunodetección del fluorocromo. La reacción de PCR debe realizarse evitando la exposición a la luz. Para el retrotransposon *Oswaldo* se utilizó una sonda de 6000 pb

que corresponde a la región interna del elemento, la sonda de *Helena* es de 440 pb que corresponden a la endo-exonucleasa de este y para *Galileo* la sonda tuvo un tamaño de 1150 pb de la transposasa. El programa de amplificación de esta PCR es: 4 min 95°C, 30 ciclos de [45 seg 95°C, 1 min 60°C, 2 min 72°C], 5 min 72°C, 4°C. Los reactivos y volúmenes utilizados son los siguientes:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (25 µl)
PCR buffer 10x	1x	2.5 µl
MgCl ₂ 25 mM	4mM	4 µl
PCR fluorescein labeling mix 2 mM	200µM dNTP	2.5 µl
Cebador EcoRI 2.75 µM	0.3 µM	2.5 µl
Cebador MseI 2.75 µM	0.3 µM	2.5 µl
Taq DNA Polymerase 5U	2U	0.4 µl
ADN	10 pg	1 µl
H ₂ O bidestilada		9.6 µl

2.12.5 *Desnaturalización y aplicación de la sonda*

La solución de hibridación se prepara minutos antes de ser utilizada con los compuestos descritos desnaturalizándola posteriormente a 72°C durante 2 horas y 30 minutos. A continuación se mantiene en hielo para evitar que se renaturalice. La preparación de la solución de hibridación, que contiene la sonda, se realiza de la siguiente manera:

Reactivos	Concentración final	Volumen (20 µl)
Formamida	50%	10 µl
SDS 10%	0.1 %	0.2 µl
20x SSC	5x SSC	5 µl
ADN (sonda marcada)	20 ng/preparación	-
Agua bidestilada		Hasta 20 µl

Para aplicar la sonda se depositan 20 µl de la solución de hibridación sobre un cubreobjetos recogiendo con el portaobjetos la preparación cromosómica de manera que la solución de hibridación cubra toda el área donde se encuentran los cromosomas y evitando que se formen burbujas. Posteriormente las preparaciones con la sonda se ponen en una cámara húmeda, que debe estar protegida de la

exposición a la luz, y se dejan incubando a 37°C toda la noche.

2.12.6 Posthibridación y Revelado

Todos los pasos que se mencionan a continuación, se realizan en un cuarto oscuro para evitar que la sonda pierda la fluorescencia. Primero se procede al retirado del cubreobjetos de las preparaciones y el lavado en una solución de 2x SSC a 37°C durante 5 minutos, luego dos veces a temperatura ambiente. A continuación se lavan las preparaciones dos veces en 1x PBS durante 5 minutos.

En el revelado de la hibridación se lavan las preparaciones dos veces en 4x SSC durante 3 minutos cada lavado. Las preparaciones se colocan en posición horizontal en una bandeja y se añade la solución del agente bloqueante al 0.5% en 4x SSC. Se incuban las preparaciones durante 30 minutos con agitación suave. Después se lavan en una solución de 4x SSC-Tween20 durante 5 minutos. Se escurre el exceso de líquido y se añaden los anticuerpos, primero el anticuerpo Alexa fluor 488 conejo antifluoresceína (solución al 1.25% de anticuerpo en 4x SSC) y se incuba 30 minutos, luego el anticuerpo Alexa fluor 488 cabra anti-conejo (solución al 0.7% de anticuerpo en 4x SSC) y se incuba otros 30 minutos a temperatura ambiente. De cada solución del anticuerpo se añaden 100 µl a cada preparación cubriendo el área de los cromosomas sin formar burbujas. Después de la incubación con cada anticuerpo, se realizan tres lavados con 4x SSC-Tween20 durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se realizan lavados con agitación, uno con 1x PBS durante 30 segundos y tres con etanoles al 70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno. Finalmente se montan las preparaciones utilizando 25 µl de la solución de montaje (DAPI 0.8% en antifade).

Notas sobre la hibridación FISH:

Los portaobjetos utilizados son sometidos previamente a un tratamiento en una solución SSC/Denhardt's a 65°C durante 2 horas y 30 minutos y seguidamente en una solución de etanol/acético 3:1 a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los cubreobjetos son tratados con una solución de Repel-Silane durante 10 segundos, lavados en H₂O y secados al aire.

2.13 Observación de las señales de hibridación

Las observaciones de las preparaciones hibridadas se realizaron en un microscopio Zeiss Axio Imager A1 (Jena, Germany) a 100x aumentos. Las fotografías fueron capturadas con una cámara Axio Cam MRc5 incorporada al microscopio y visualizadas y editadas con el software Axio Vision ACRel 4.5. Posteriormente se procedió a la localización de las señales de hibridación utilizando el mapa estandar de las especies del grupo *repleta* (Wharton, 1942).

2.14 Transposon display

La técnica del transposon display (Waugh *et al.*, 1997; Zampicini, 2004) se basa en la digestión del ADN con una enzima de restricción y la amplificación de un extremo del elemento utilizando cebadores específicos de esa región del elemento. Para desarrollar esta técnica hay detalles importantes a tener en cuenta. El primero es el análisis del mapa de restricción del elemento y la selección de una enzima que no corte el elemento en el extremo que será analizado. El segundo es el diseño de dos cebadores específicos, uno externo y otro interno, que permitan la amplificación del extremo del elemento. El **cebador externo** debe amplificar alrededor de 300 pb del extremo y el **cebador interno** debe amplificar no más de 200 pb, este tamaño puede variar en función de la posición de la primera diana de restricción de la enzima (Waugh *et al.*, 1997). En algunos casos puntuales el fragmento sobre el que se diseñan los cebadores puede ser menor de 150 pb. El tercer punto es el marcaje del cebador interno con un fluorocromo que permita la diferenciación de los fragmentos del elemento de aquellos que corresponden a ADN genómico de la especie (figura 8).

Una vez seleccionada la enzima, se realiza la digestión y a continuación la ligación de los fragmentos con adaptadores específicos de la enzima utilizada en la digestión. El producto de la reacción digestión-ligación se utiliza como ADN molde en la primera amplificación externa, en la cual se utiliza el cebador externo del elemento y un cebador complementario a los adaptadores de la enzima. El producto de la amplificación externa se diluye 1/20 veces para ser luego utilizado como ADN molde de la segunda amplificación interna en la cual se usa el cebador interno marcado con el fluorocromo y el cebador complementario a los adaptadores de la enzima. El producto de la amplificación interna se analiza mediante electroforesis por capilaridad.

En el caso del retrotransposon *Oswaldo* y el transposon *Galileo* hemos analizado el extremo 5' y el ADN fue digerido con la enzima *HpaII*, en el caso del retrotransposon *Helena*, debido a que este elemento presenta deleciones frecuentes en 5', analizamos el extremo 3' y en la digestión del ADN se utilizó la enzima *MseI*.

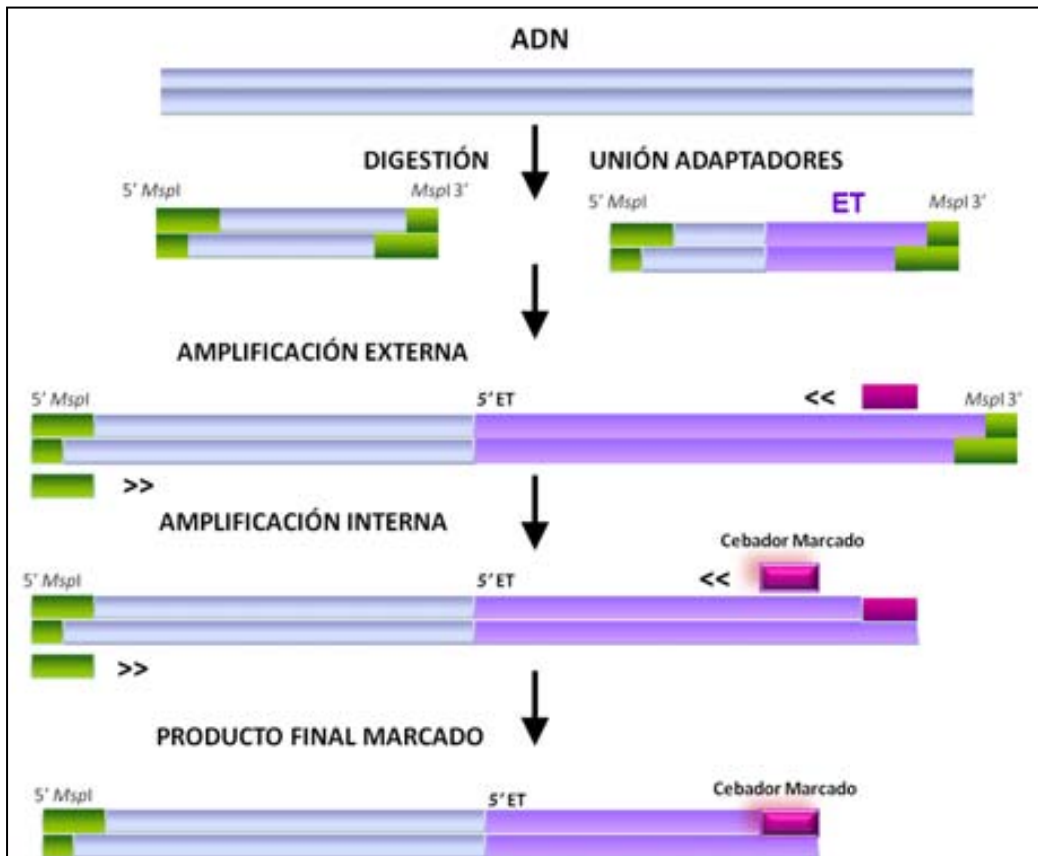


Figura 8. Esquema de la técnica del transposon display

2.14.1 Reacción de digestión del ADN

La técnica del transposon display utiliza una sola enzima para digerir el ADN. La reacción de digestión se muestra a continuación:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (20 µl)
Buffer Enzima 10x	1x	2 µl
Enzima 1U	1U	1 µl
H ₂ O		12 µl
DNA		5 µl

El tiempo de reacción de digestión con *HpaII* y *MseI* es entre una y 4 horas a 37°C.

2.14.2 Ligación de los adaptadores

Se prepara una mezcla de los adaptadores de la siguiente manera:

Adaptador	Volumen final
Adaptador+ 10 µM	10 µl
Adaptador- 10 µM	10 µl
H ₂ O	80 µl

Esta mezcla se somete a ebullición durante 10 minutos y a una renaturalización a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Los adaptadores ligados a los fragmentos de restricción de la enzima *HpaII* fueron:

AdaptadorHhal+ 5`AACAGCTGGACGATGAGTCCTGAGATACG 3`

AdaptadorHpaII- 5`CGCGTATCTCAGGAGTGTA 3`

Los adaptadores ligados a los fragmentos de restricción de la enzima *MseI* fueron:

AdaptadorMseI+ 5`AAAAGCTGGACGATGAGTCCTGAGA 3`

Adaptador MseI- 5`TATCTCAGGAGTGTA 3`

La reacción de ligación se detalla a continuación:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (42 µl)
Buffer Ligasa 5x	1x	8 µl
T4 DNA ligasa 1U	2.5 U	2.5 µl
Mix Adaptadores	0.2 µM	0.8 µl
H ₂ O		10.7 µl
Producto digestión		20 µl

Las reacciones de ligación tanto para *Hpa*II como para *Mse*I se incuban a 24°C una hora.

2.14.3 Amplificación externa

Para la amplificación externa, de cada elemento, se utilizaron los siguientes cebadores:

Elemento transponible	Cebador externo	Secuencia
<i>Oswaldo</i>	OsvExt200	5`AGCCCATTTGCTGACACTTTA3`
<i>Helena</i>	HelExt4333	5`TGTTGTTGTCATGGTGCTGA 3`
<i>Galileo</i>	GalExt240	5`CATGGGGCAGAAAGAGAAAG3`

La reacción de amplificación externa fue la siguiente:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (25 µl)
Buffer 10x	1x	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.2 µM	0.5 µl
Cebador <i>Mse</i> I 10 µM	0.4 µM	1 µl
Cebador EXTERNO 20 µM	2 µM	1 µl
DNA Polimerasa 5U	0.625 U	0.125 µl
H ₂ O		17.875 µl
Producto Digestión-Ligación		2 µl

Para la amplificación externa se programó el termociclador con el siguiente programa: 2 min 94°C, 25 ciclos de [1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C], 4 min 72°C. El producto de la amplificación externa se diluye 1/20 añadiendo H₂O mQ.

2.14.4 Amplificación interna

La amplificación interna es una reacción anidada que utiliza como ADN molde el producto de la amplificación externa diluido 1/20. Los cebadores internos para cada elemento fueron marcados con el fluorocromo 4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) y son los siguientes:

Elemento transponible	Cebador interno	Secuencia
<i>Oswaldo</i>	OsvNes152	5`CTCTCTGACCCTTCCAGTCG3`
<i>Helena</i>	HelNes4390	5`GAATTCAGCCCTCAGCTCAA3`
<i>Galileo</i>	GalNes186	5`TTTGGAAAATCGACCGTCAC3`

La reacción de amplificación interna es la siguiente:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (20 µl)
Buffer 10x	1X	2 µl
dNTPs 10 mM	0.2 uM	0.5 µl
Cebador Msel 10 uM	0.2 uM	0.4 µl
Cebador INTERNO 20 uM	0.25 uM	0.25 µl
DNA Polimerasa 5U	1.25 U	0.25 µl
H ₂ O		15.1 µl
Producto	amplificación	1.5 µl

El programa para la reacción de amplificación interna es: 1 min 94, 35 ciclos de [45 seg 94°C, 45 seg 58°C, 45 seg 72°C], 3 min 72°C.

El tamaño mínimo de los fragmentos amplificados en la amplificación interna es de 152 pb para *Oswaldo*, 107 pb para *Helena* y 186 pb para *Galileo*.

2.15 Selección de híbridos para el análisis del transposon display

En el experimento del transposon display se analizaron los híbridos HR1, HR2 y HR3 de las familias 10, 13 y 40 (las mismas analizadas con la técnica de los AFLP). Además de estas tres familias se incluyó una familia más, la familia 1 (obtenida de otro grupo de cruzamientos interespecíficos en las mismas condiciones que los de las familias 10, 13 y 40). Los híbridos de la familia 1 que fueron incluidos en el experimento del transposon display fueron los detallados en la tabla 6. Con la técnica del transposon display fueron analizadas un total de 263 moscas.

2.16 Selección de individuos de cruces intraespecíficos (controles) para el análisis del transposon display

En el experimento del transposon display fueron analizadas dos familias de cruzamientos intraespecíficos para *D. buzzatii*: B4 y B8. De la misma manera se analizaron dos familias de cruzamientos intraespecíficos de *D. koepferae*: K3 y K9. Las familias B4 de *D. buzzatii* y la familia K9 de *D. koepferae* fueron las previamente analizadas también con la técnica de AFLP. De cada una de estas familias se analizaron 7 ó 8 hembras y 7 machos (14 ó 15 individuos en total), excepto en la familia K3 en la cual se analizaron 4 machos y por lo tanto 11 individuos en total.

A continuación se muestran todos los individuos de los cruzamientos intraespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* analizados con la técnica del transposon display.

2.17 Secuenciación del ADN por electroforesis capilar

Los fragmentos producidos en la amplificación interna del transposon display fueron secuenciados por electroforesis capilar en el servicio de Secuenciación de Biofidal (<http://www.biofidal.com/>) en Lyon (Francia). Los resultados fueron devueltos en archivos con formato .fsa los cuales fueron visualizados utilizando el software Peak Scanner v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para el análisis de los resultados de la secuenciación se introdujeron en el software los siguientes parámetros de análisis:

Peak detection

- | | |
|------------------|----------------------|
| - Peak smoothing | Smoothing: None |
| - Range | Analyses: Full range |

- Peak characteristics: default
- Sizing calling method: local
- Baseline window size: 51
- Minimum peak heights: Green

Quality flags

- Sizing quality Pass range: from, 0.75 to 1.0

Tabla 6. Individuos de la familia 1 analizados en el experimento del transposon display

♀ Dk	♂ Db	♀ HF1	♀ HR1	♀ HR2	♀ HR3	♂ HR3
1	1	1.1A	11.1	111.1	1111.1	1111.22
		1.1B	11.2	111.2	1111.2	1111.23
			11.1	111.4	1111.4	1111.24
			11.2	111.5	1111.5	1111.25
			11.3	111.6	1111.6	1111.26
			11.4	111.7	1111.7	1111.27
			11.5	111.8	1111.8	1111.28
				111.9	1111.9	1111.29
				111.10	1111.10	1111.30
				111.11	1111.11	1111.31
				111.12	1111.12	1111.32
				111.13	1111.13	1111.33
				111.14	1111.14	1111.34
				111.15	1111.15	1111.35
				111.16	1111.16	1111.36
				111.17	1111.17	1111.37
				111.18	1111.18	1111.38
				111.19	1111.19	1111.39
					1111.20	1111.40
					1111.21	1111.41

HF1: híbridos F1, HR1, HR2 y HR3: híbridos de retrocruzamiento 1, 2 y 3 respectivamente

Tabla 7. Individuos de los cruces intraespecíficos (controles) analizados con la técnica del transposon display

<i>D. buzzatii</i>				<i>D. koepferae</i>			
Familia B4		Familia B8		Familia K3		Familia K9	
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
4.1	4.9	8.1	8.10	3.2	3.10	9.1	9.9
4.2	4.10	8.2	8.11	3.3	3.11	9.2	9.10
4.3	4.11	8.3	8.12	3.4	3.12	9.3	9.11
4.4	4.12	8.4	8.14	3.5	3.13	9.4	9.12
4.5	4.13	8.6	8.16	3.7		9.5	9.13
4.6	4.14	8.7	8.17	3.8		9.6	9.14
4.7	4.15	8.9	8.18	3.9		9.7	9.15
4.8						9.8	

La selección de los fragmentos amplificados se realiza individuo por individuo utilizando el electroferograma de los datos, que muestra en el eje de la X el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb) y en el eje de las Y la altitud de los picos de fluorescencia. Los fragmentos positivos presentan picos de fluorescencia definidos y no solapantes. Cuando 2 o más picos de fluorescencia se solapan es necesario observar los picos de todos los individuos analizados para determinar cual es el pico que indica el tamaño real del fragmento.

Los datos seleccionados a través del electroferograma (figura 9) se organizan en una matriz de datos en la cual el 1 indica presencia y el 0 ausencia del fragmento en cada individuo analizado. La matriz de datos permite visualizar y comparar con facilidad todos los individuos y los fragmentos que segregan en cada uno de ellos.

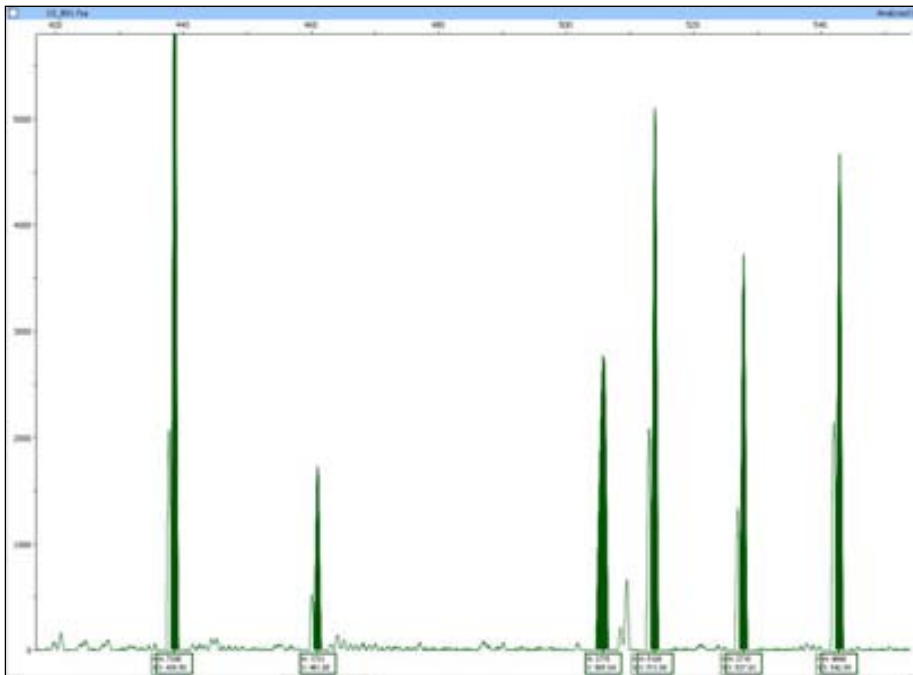


Figura 9. Visualización de un electroferograma en el programa Peak Scanner

2.18 Cálculo de las Tasas de Transposición

La tasa de transposición genómica ha sido calculada como el número de transposiciones nuevas por genoma, elemento y generación tomando como referencia los cálculos realizados por (Labrador *et al.*, 1999) para el elemento *Oswaldo*. Para el cálculo de las tasas de transposición de los elementos implicados en este estudio (*Oswaldo, Helena y Galileo*) se ha considerado que cada individuo analizado contiene dos genomas (uno de cada parental), el número de individuos analizados y el número de inserciones originales en los parentales. Por lo tanto la tasa de transposición será el cociente del número de copias de las nuevas inserciones dividido para el número de genomas parentales, por el número de inserciones originales, por el número de individuos analizados siguiendo la siguiente fórmula:

$$T = N_1 / 2 N.A$$

Donde:

T= Tasa de transposición

N_1 = Número de bandas nuevas

2 = Número de genomas

N= número de individuos analizados

A= Número de bandas originales.

El número de individuos analizados corresponde a los híbridos efectivos, es decir aquellos de los cuales se obtuvo resultados en la electroforesis capilar. Las inserciones originales corresponden al total de inserciones observadas en los parentales. Estas estimas de tasas de transposición/reorganización genómica fueron calculadas en los híbridos interespecíficos y las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*, para cada familia y cada generación.

2.19 Aislamiento de ARN y RT-PCR (Reverso transcriptasa PCR)

El ARN de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae* fue aislado usando el protocolo para extracción de RNA de tejido animal del RNeasy mini kit (Quiagen) y luego tratado con DNasa I del kit DNA free kit (Ambion) para descartar contaminación con ADN.

A partir del ARN aislado se sintetizó cDNA usando el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) como se indica en la reacción siguiente:

Reactivos	Concentración	Volumen final
5x Reverso transcriptasa buffer	1x	4 µl
Protector de RNasa inhibidor 40 U	20 U	0.5 µl
dNTPs Mix 10 mM	1 mM	2 µl
Transcriptor Reverso Transcriptasa 20 U	10 U/µl	0.5 µl
Cebadores Oligos (dT) ₁₈ 50pmol	2.5 µM	1 µl
RNA	1µg	X
H2O		Y

Para comprobar la expresión de los ARN mensajeros (mRNA) de los ETs: *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* se realizó la amplificación de regiones codificantes de cada uno de los elementos. Los cebadores utilizados fueron:

ETs	Región	Cebador	Secuencia
<i>Oswaldo</i>	Gen Pol	<i>Oswaldo</i> RT1	5`GAGGCACGAACTGGAGAAAT 3`
		<i>Oswaldo</i> RT3	5`ACTCCCATTTGACGCCCTTT 3`
<i>Helena</i>	Exoendonucleasa	<i>Helena</i> F1	5`CGACATACTCGCTTCCTGTG 3`
		<i>Helena</i> R1	5`CAATGCAAGAGGGAGTGTGA 3`
<i>Galileo</i>	Transposasa	GTransposasa 1F	5`TTGACACTCAACTCCGAACC 3`
		GTransposasa 3R	5`TTTCAAACCCCTGAATCTCG 3`

La reacción de PCR para amplificar el cDNA de los ETs fue:

Reactivos	Concentración final	Volumen final (25 µl)
PCR buffer 10x	1x	2.5 µl
MgCl ₂ 25 mM	0.8 mM	0.83 µl
dNTPs 2 mM	0.2 µM	2.5 µl
Cebador 1 10 µM	0.8 µM	2 µl
Cebador 2 10 µM	0.8 µM	2 µl
Taq DNA Polymerase 5U	1.2 U	0.24 µl
cDNA	10 pg	1 µl
H ₂ O bidestilada		13.9 µl

Resultados

3 RESULTADOS

3.1 Descendencia obtenida de los cruzamientos interespecíficos

De los 50 cruzamientos realizados obtuvimos descendencia de híbridos HF1 en 20 familias (familias 1, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 23, 32, 33, 34, 39, 40, 43, 45, 46), lo que representa el 40 % del total. De estas 20 familias, se obtuvo descendencia de híbridos HR1 en 10 familias (familias 1, 4, 7, 10, 12, 13, 23, 34, 39, 40). A partir de estas familias se obtuvo descendencia de híbridos HR2 en 4 familias (10, 13, 40, 46) y de éstas produjeron descendencia de híbridos HR3 únicamente 3: familia 3, 10 y 40. Un resumen del número de descendientes en cada familia y generación se muestra en la tabla 8.

Las familias analizadas para obtener los AFLP fueron las familias 10, 13 y 40. En el experimento del transposon display se añadió la familia 1 que procede de una serie de cruzamientos posteriores. La descendencia obtenida en estas cuatro familias se detalla en la tabla 9.

3.2 Descendencia obtenida de los cruzamientos intraespecíficos

Se realizaron cruzamientos intraespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* hasta la generación F4, los cuales fueron utilizados como controles. En los cruzamientos de *D. buzzatii* se obtuvo descendencia, hasta la generación F4, en cinco familias, y en *D. koepferae* en tres familias (tabla 10).

En el experimento de AFLPs se analizaron las familias B4 y K9, mientras que en el experimento del transposon display se analizaron las familias B4 y B8, como controles de *D. buzzatii*, y K3 y K9 como controles de *D. koepferae*.

Tabla 8. Moscas eclosionadas en los cruzamientos interespecíficos y retrocruzamientos efectivos

Familia	HF1		HR1		HR2		HR3	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
1	3	2	2	0	0	0	0	0
4	5		0	1	0	0	0	0
6	5	2	0	0	0	0	0	0
7	3	4	1	0	0	0	0	0
9	4	3	0	0	0	0	0	0
10	8	4	2	2	18	11	159	150
11	2		0	0	0	0	0	0
12	3	4	2	0	0	0	0	0
13	5	4	6	4	62	33	861	717
14	1	3	0	0	0	0	0	0
19	1	1	0	0	0	0	0	0
23	2	4	5	0	0	0	0	0
32	2	1	0	0	0	0	0	0
33	1	5	0	0	0	0	0	0
34	1		1	1	0	0	0	0
39	6	2	2	2	0	0	0	0
40	4	8	8	3	27	22	321	383
43	4		1	4	0	0	0	0
45	1	3	0	0	0	0	0	0
46	9	2	5	7	5	1	0	0

El análisis de los AFLPs están basado en los híbridos de las familias 10, 13 y 40, señalados en negrita

Tabla 9. Descendencia producida en cada generación de retrocruzamiento en las familias 1, 10, 13 y 40

Híbrido	Cruce efectivo	Familia 1		Cruce efectivo	Familia 10		Cruce efectivo	Familia 13		Cruce efectivo	Familia 40	
		♀	♂		♀	♂		♀	♂		♀	♂
HF1	1	3	3	1	8	4	1	5	4	1	4	8
HR1	2	5	4	2	2	2	2	6	4	2	8	3
HR2	2	15	4	1	18	11	2	62	33	5	27	22
HR3	15	65	61	12	159	150	45	861	717	15	321	383

Cruce efectivo: cruces que producen descendencia.

Tabla 10. Moscas eclosionadas en los cruzamientos intraespecíficos

Cruzamientos intraespecíficos de <i>D. buzzatii</i>								
Número de cruzamiento	F1		F2		F3		F4	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
B1	8	3	6	8	6	4	6	8
B2	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	8	10	9	12	9	7	8	7
B4	9	8	14	12	7	6	9	7
B5	7	7	9	7	8	8	10	8
B6	7	6	13	10	10	8	0	0
B7	8	9	9	9	6	14	0	0
B8	11	14	8	12	9	8	7	7
B9	5	6	9	8	4	11	0	0
B10	14	16	0	0	0	0	0	0
Cruzamientos intraespecíficos de <i>D. koepferae</i>								
K1	3	2	0	0	0	0	0	0
K2	2	0	4	7	6	6	0	0
K3	6	2	2	5	8	10	7	4
K4	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	8	6	5	7	3	0	0	0
K6	3	4	3	6	8	5	5	3
K7	5	4	4	9	4	6	0	0
K8	6	7	0	0	0	0	0	0
K9	3	4	6	3	7	8	8	7
K10	0	0	0	0	0	0	0	0

La descendencia de los cruzamientos B4, B8, K3 y K9 fue analizada con el transposon display

3.3 Marcadores AFLP de inestabilidad híbrida en los híbridos HR1, HR2 y HR3

De las 40 combinaciones de AFLP analizadas en los híbridos HR1, HR2 y HR3, solo algunas de ellas fueron combinaciones efectivas. Entendemos por combinación efectiva aquella que produce un patrón de bandas claro y además uno o varios híbridos presentan uno o más marcadores de inestabilidad (bandas H) (véase figura 6 y punto 2.9).

En los **híbridos HF1** se observaron 27 combinaciones AFLP efectivas de las cuales fueron contabilizados 57 marcadores de inestabilidad. Estos marcadores no fueron objeto de posteriores análisis debido a que gran parte de esta inestabilidad podría corresponder a cambios a nivel somático dado que no era observada posteriormente en los híbridos HR1. Sin embargo se presenta un resumen del

número de marcadores de inestabilidad observados en esta generación y las familias en las cuales fueron detectados en la tabla 11.

En los **híbridos HR1** se observaron 19 combinaciones AFLP efectivas y en éstas se detectaron 30 marcadores de inestabilidad (tabla 12). Cinco marcadores de inestabilidad presentaban homología tanto con ADN de *Drosophila* como con algún ET, 16 marcadores tenían homología únicamente con ADN de *D. mojavensis*, 7 de los cuales están identificados como genes que producen algún transcrito aunque se desconoce su función. Ocho marcadores tenían homología con ADN exógeno y un marcador no tenía homología significativa.

En la generación de **híbridos HR2** se observaron 14 combinaciones efectivas y 17 marcadores de inestabilidad (tabla 13), cinco de los cuales tienen homología con elementos transponibles, cuatro con ADN de *D. mojavensis*, 6 con ADN exógeno bacteriano y 2 son secuencias raras que no presentan homología con *Drosophila* ni con bacterias.

En la generación de **híbridos HR3** fueron 12 las combinaciones de AFLP efectivas, permitiendo detectar 25 marcadores de inestabilidad. Algunos de estos marcadores fueron observados como una sola banda en el gel, aunque en el análisis de los diferentes clones se detectó un polimorfismo de tamaño con una diferencia no mayor a 50 pb entre los marcadores, lo cual explica la dificultad de discriminación en geles de agarosa. Trece de estos marcadores tienen homología con elementos transponibles, cuatro de ellos presentan homología con más de un elemento transponible (tabla 14). Otros diez marcadores tienen homología con ADN de *Drosophila* y otros dos presentan homología con ADN exógeno relacionado con bacterias.

Tabla 11. Combinaciones de cebadores AFLP en las que se detectaron marcadores de inestabilidad en los híbridos HF1

Cebador <i>EcoRI</i>	Cebador <i>MseI</i>	Combinación AFLP	Número de marcadores de inestabilidad	Familia
CG	GCA	CGGCA	5	13, 23, 1, 7, 34
CG	GGG	CGGGG	2	40, 10, 39, 1, 7, 34
CG	GAT	CGGAT	2	10, 1, 7
CG	GCG	CGGCG	3	1, 7, 12, 13, 23,34, 39, 40, 46
CC	GAT	CCGAT	1	46
CC	GCA	CCGCA	1	1, 7, 10, 12, 13, 39, 40, 46
GG	GAT	GGGAT	2	13, 40
GT	CGG	GTCGG	3	7,13, 34, 39, 40
GG	CTC	GGCTC	3	7, 10, 23,34, 39, 46
GG	CGG	GGCGG	1	1, 39
CA	GCA	CAGCA	1	7
CA	GCG	CAGCG	3	7, 40, 46
CA	GGG	CAGGG	6	1, 10, 23, 40, 46
TG	GGG	TGGGG	2	7, 10
TG	GCA	TGGCA	1	13
TG	GCC	TGGCC	1	40
TG	GCG	TGGCG	1	40
TG	GAT	TGGAT	2	39, 40
GC	AGT	GCAGT	1	7
CG	CCC	CGCCC	3	1, 7, 10, 12, 13, 23, 34, 39, 40, 46
CC	CAT	CCCAT	2	40, 46
CG	CAT	CGCAT	3	7, 10, 39
CC	CCC	CCCCC	1	12
CG	CTC	CGCTC	2	13, 23, 39
CC	CTC	CCCTC	1	40
CG	CGG	CGCGG	1	46
TG	TCG	TGTCG	3	1, 10, 12, 13,34, 39, 40, 46

Tabla 12. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR1

Marcadores de inestabilidad que tienen homología con ADN repetitivo (inestabilidad por transposición)						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>	Elementos Transponibles
GGCTC21	647 bp	164	13	131.1	D. moj sc 6680	<i>MINI-ME</i>
CAGCA21	491 bp	236	34	341.1	D. moj sc 6540	<i>Gypsy1</i>
GGATT21	450 bp	138	13	132.1	D. moj sc 6540	<i>Bel_1</i>
CCCCC21	647 bp	162	40	402.1		<i>MINI-ME</i>
CCCCC22	540 bp	165	40	402.1	D. buzz inv 2j	<i>MINI-ME, Gypsy1</i>
Marcadores de inestabilidad que tienen homología con el genoma de <i>Drosophila</i>						
CGGCA21	544 bp	85	10	103.1	D. moj gen GI19666	
CGGGG21	165 bp	316, 318	40-39	402.1/391.1	D. moj gen GI21441	
GTCTC21	179 bp	33	23	231.1	D. moj gen GI17838	
GGCTC22	638 bp	149	10, 1	103.1/11.1	D. moj gen GI16412	
CAGCG21	519 bp	26	10	103.1	D. moj gen GI10323	
GCATT21	724 bp	127	7	71.1	D. moj gen GI15870	
CGCCC22	267 bp	152	40	402.1	D. moj gen GI12991	
CGGAT21	518 bp	36	7	71.1	D. moj sc 6482	
CGGCG21	261 bp	49	10	103.1	D. moj sc 6540	
GTCGG21	721 bp	130	13	131.1	D. moj sc 6540	
GGCGG21	148 bp	59	13	132.1	D. moj sc 6496	
GGAGT21	192 bp	296, 298, 299	23	231.1	D. moj sc 6496	
GCATT22	258 bp	41, 66	12	121.1	D. moj sc 6540	
GCAGT21	199 bp	6	40	402.1	D. moj sc 6500	

Tabla 12 continuación. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR1

Marcadores de inestabilidad que tienen homología con el genoma de <i>Drosophila</i>						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>	Elementos
CCCCC23	207 bp	142	10	103.1	D. moj sc 6496	
CCCCC22	520 bp	169, 170	39	391.1	D. moj sc 6482	
Marcadores de inestabilidad que tienen homología con ADN exógeno						
CGGCA22	447 bp	133, 138	10	103.1	<i>Burkholderia</i>	
CGGAT22	225 bp	214,219	7	71.1	<i>Staphylococcus</i>	
CAGAT21	444 bp	529	39	391.1	<i>Yersinia</i>	
TGGAT21	610 bp	252, 260, 266	39	391.1	<i>Salmonella</i>	
TGTCG25	253 bp	27	13	131.1	<i>Nitrosococcus</i>	
TGTCG26	196 bp	7	13	131.1	<i>Geobacter</i>	
CGCCC21	450 bp	10, 29	13	132.1	<i>Dinoroseobacter</i>	
CAGCG22	222 bp	210	40	402.1	<i>Solanum</i>	
GGCTC23	445 bp	13, 36	1, 10	103.1/11.1	no hay homología	

Tabla 13. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR2

Marcadores de inestabilidad por Transposición						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	DNA <i>Drosophila</i>	Elementos Transponibles
TGTCG27	441 pb	136, 146, 160, 174	40	4013.4		<i>Helena</i>
CAGCG23	447 pb	95	40, 13	1323.6/1323.13/4013.1		<i>LSU-rRNA_Hsa</i>
TGATT25	442 pb	106	13	1323.6/1323.13		<i>Homo6</i>
TCAGT21	347 pb	4, 23, 35	13	1323.21	D. moj sc 6500	<i>Homo6</i>
TCAGT22	306 pb	18	13	1323.21		<i>MINI-ME</i>
Marcadores de inestabilidad que tienen homología con el genoma de <i>Drosophila</i>						
CAGCG24	430 pb	97, 119	13	1323.6/1323.13	D. moj gen GI11106	
CGGAT23	440 pb	56, 78, 80	10	1031.6/1031.11/1031.5	D. moj sc 6473	
CGGCG22	166 pb	93, 99, 115, 116, 119	13	1323.13	D. moj sc 6500	
CGCCC24	181 pb	18	13	1323.6/1323.13	D. moj sc 6496	
Marcadores de inestabilidad que tienen homología con ADN exógeno						
TGGGG21	393 pb	70, 73,77, 80	40, 13	1323.13/4013.1		<i>Acetobacter</i>
TGGCG23	181 pb	96, 100, 111, 121	13	1323.4/1323.6/1323.8/1323.13		<i>Lactobacillus</i>
TGGCA22	215 pb	48, 72, 80, 86	10	1031.6/1031.13/1031.5		<i>Zebrafish</i>
TGGAT22	285 pb	5, 11, 25, 29, 33	10	1031.6/1031.11/1031.5		<i>Brassica</i>
TGCGG22	204 pb	139, 141, 160, 172, 176	13	1323.13		<i>Streptomyces</i>
CGCCC23	178 pb	140, 143, 146, 168	10	1031.11/1031.14/1031.4		<i>Dickeya</i>
TTTCG21	345 pb	2, 4, 30, 34, 35	13	1323.13	no hay homología	
GTGCC22	82 pb	48, 55, 61	13	1323.13	no hay homología	

Tabla 14. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR3

Marcadores de Inestabilidad por Transposición						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>	Elementos Transponibles
TGCGG21	145 pb	88	40	401315.4/401315.11	D. moj gen G115709	<i>Helitron-2</i>
TGATT21	554 pb	15	10	10317.18	D. moj sc 6540, D. buz inv 2j	<i>Gypsy-LTR</i>
TGATT24	530 pb	16	10	10317.18	D. moj sc 6498	<i>Oswaldo</i>
TGATT25	513 pb	17	10	10317.18	D. moj sc 6500	<i>UHU</i>
TGATT26	505 pb	22	10	10317.18	D. moj sc 6500	<i>Gypsy8</i>
TGATT22	408 pb	59	40A	4013A.12	D. moj sc 6540, D. buz inv 2j	<i>Galileo</i>
TGATT27	441 pb	75	40A	4013A.12	D. moj sc 6541	<i>Homo6, Galileo</i>
TCTCG21	218 pb	143	40A	4013A.9	D. moj sc 6500, gen G118285	<i>TART</i>
CGGGG22	172 pb	97	13	132321.11	D. moj sc 6500	<i>Galileo</i>
CCGAT21	309 pb	167	13	132321.7	D. moj sc 3062	<i>Penelope, Gypsy1, Homo6</i>
CCGAT22	264 pb	170	13	132321.7	D. moj sc 3695	<i>Helitron-1N1, Gypsy1, Homo6</i>
CCGAT23	303 pb	171	13	132321.7	D. moj sc 6491	<i>Gypsy1, Gypsy9, Homo6</i>
CCGAT24	320 pb	174	13	132321.7	D. moj sc 6344, D. buz inv 2j	<i>Homo6</i>
Marcadores de Inestabilidad que tienen homología con el genoma de <i>Drosophila</i>						
TGATT23	280 pb	95	40A	4013A.12	D. moj sc 6680	
TGATT28	238 pb	107	40A	4013A.12	D. moj sc 6680	
TTTCG21	452 pb	124	40, 40A	401315.11/4013A.13	D. moj sc 6540	
TTTCG22	366 pb	129	40, 40A	401315.11/4013A.13	D. moj sc 6680	
TGGCC21	166 pb	9	40A	4013A.5/4013A.12/4013A.13	D. moj sc 6540	
CAGAT21	643 pb	144	13	132321.6	D. moj sc 6680, gen G113155	

Tabla 15 continuación. Marcadores de inestabilidad en los híbridos HR3

Marcadores de Inestabilidad que tienen homología con el genoma de <i>Drosophila</i>						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>	Elementos Transponibles
CAGAT22	530 pb	168	13	132321.6	D. moj sc 6540, gen GI23020	
TGTAC21	67 pb	52	40	401315.1/401315.2/401315.3/ 401315.4/401315.5/401315.7	D. moj sc 6496	
GGGCG21	313 pb	24	10	10317.18	D. moj sc 6680	
GGGCG22	351 pb	29	10	10317.18	D. moj sc 6540	
Marcadores de Inestabilidad que tienen homología con ADN exógeno						
CGGGG21	348 pb	51	10	10317.18	<i>Acetobacter</i>	
GGGCC21	294 pb	180, 182	10	10317.18	<i>Rhodococcus</i>	

3.4 Marcadores de inestabilidad híbrida en los híbridos segmentales F3-F4 e híbridos HR3 externos

El análisis de los AFLP de los **híbridos segmentales F3-F4** se basó en 28 combinaciones de cebadores AFLP, de las cuales 7 fueron combinaciones efectivas. Se detectaron 11 marcadores de inestabilidad de los cuales 10 presentaban homología con ADN de *Drosophila* y con algún ET. Seis marcadores tienen homología con dos ETs y cuatro con un ET (tabla 15), además un marcador de inestabilidad presentó homología con ADN de *D. melanogaster*.

En el caso de los **híbridos HR3 externos**, se detectaron 10 marcadores de inestabilidad en 8 combinaciones efectivas (de 50 combinaciones analizadas)(Morán, 2009). Tres marcadores presentaron homología con un ET y otros tres con dos ETs. Tres marcadores presentaron homología con ADN exógeno y un marcador no presentó homología (tabla 15).

Tabla 16. Marcadores de inestabilidad en los híbridos segmentales F3-F4 y en los híbridos HR3 externos

Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>	Elementos Transponibles
TGTCG21	377 pb	70		F3-F4	D. mel cr 2R	<i>Baggins1, Gypsy8</i>
TGTCG22	443 pb	629, 631		F3-F4	D. moj sc 6680	<i>Helena, BS</i>
TGTCG23	415 pb	83		F3-F4	D. moj sc 6500, gen GA13976	<i>TRIM, DIVER-I, Gypsy10</i>
CACTC22	500 pb	272		F3-F4	D. moj sc 4316	<i>MAX, BATUMI</i>
CAGCA22	359 pb	37		F3-F4	D. moj sc 6473, gen GE15159	<i>Transib1</i>
CGAGT21	707 pb	107		F3-F4	D. moj sc 6496, gen SdhB	<i>Gypsy3</i>
CACAT21	153 pb	14		F3-F4	D. moj sc 6540	<i>Frogger</i>
CACTC21	529 pb	93		F3-F4	D. mel cr 3L	<i>Circe, HETA</i>
TGATT26	519 pb	29		F3-F4	D. moj sc 6540	<i>ZAM, Osvaldo</i>
CGGCA21	1231 pb	76		D5-F1	D. moj sc 6500	<i>Gypsy12</i>
CACTC23	600 pb	205		F3-F4	D. mel	
Marcadores de inestabilidad en los Híbridos HR3 externos						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Híbrido	ADN <i>Drosophila</i>/ADN exógeno	Elementos Transponibles
TGCCC21	94 pb	5	1	1.1	D. vir sc 12731	<i>R2B, Gypsy10</i>
TGCCC22	112 pb	51	1	1.3	D. moj sc 6540	<i>Transib1</i>
TGGCG21	159 pb	107	3	3.2	D. moj 6680	<i>HMSBEAGLE, Gypsy6</i>
TGGCG22	156 pb	119	3	3.2	D. moj sc 6500	<i>BATUMI</i>
GGGGG21	169 pb	10	1	1.1	no hay homología	<i>TART-B1, DIVER2</i>
GGGCC21	132 pb	31	1	1.1	D. moj sc 6500	<i>Helena</i>
TGCGG21	51 pb	51	1	1.2	no hay homología	
TGCTC21	359 pb	4	1	1.1	<i>Nitrosomonas</i>	
CGGCC21	55 pb	34	1	1.4	<i>Lactobacillus</i>	
GTGCC21	82 pb	64	1	1.4	<i>Aspergillus</i>	

3.5 Marcadores de inestabilidad en las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*

El análisis de los marcadores AFLP de la generación F4 de la familia B4 de *D. buzzatii* y familia K3 de *D. koepferae* permitió observar 6 marcadores de inestabilidad en la especie *D. buzzatii* y 4 marcadores en la especie *D. koepferae* (tabla 16).

Tabla 17. Marcadores de inestabilidad en las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*

Marcadores de inestabilidad en <i>D. buzzatii</i>						
Marcador	Tamaño	Clon	Familia	Individuo	ADN <i>Drosophila</i> /ADN	ETs
TTTCG41	360 pb	69	B4	4.6	D. moj gen G113169	
TTTCG42	140 pb	45, 47	B4	4.6	D. moj sc 6308	
TGGGG41	296 pb	48	B4	4.5	no hay homología	
TGCGG41	143 pb	126	B4	4.15	D. moj gen G118105	
TGTCG41	441 pb	134	B4	4.4	D. moj sc 6540	<i>Helena</i>
GTGGG41	150 pb		B4	4.4, 4.5	region no codificante	
Marcadores de inestabilidad en <i>D. koepferae</i>						
TCAGT51	315 pb	3	K9	9.2	D. moj sc 6541	
GGAGT51	273 pb	50	K9	9.7, 9.11	D. moj sc 6500	
GCAGT51	278 pb	13	K9	9.7	D. moj sc 6496, gen 21021	
GTGGG51	245 pb	29	K9	9.2	<i>Lactobacillus</i>	

ETs: elementos transponibles D. moj: *D. mojavensis*; sc: scaffold

Se contabilizaron un total de 1570 bandas AFLP que segregan en el genoma de híbridos y especies parentales. En la figura 10 se muestra su distribución en cada generación de híbridos y en las especies parentales, destacando las bandas ó marcadores de inestabilidad.

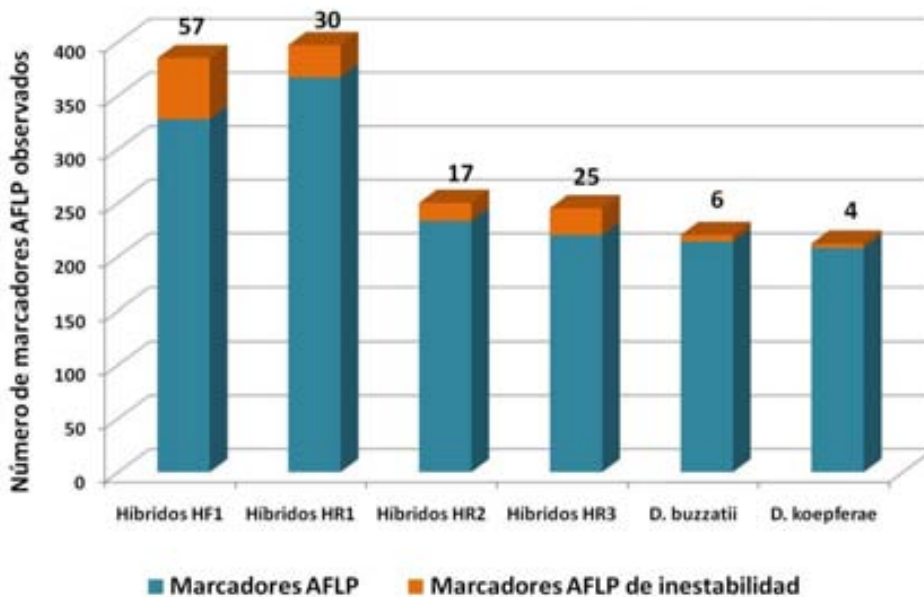


Figura 10. Cantidad de marcadores AFLP segregados en cada generación, se resalta aquellos que son marcadores de inestabilidad

3.6 Marcadores AFLP de inestabilidad por transposición y elementos transponibles detectados en híbridos interespecíficos y especies parentales

Una vez se conoció el número y la naturaleza de los marcadores de inestabilidad, que presentaban homología con ETs (**marcadores de transposición**), en los híbridos y las especies parentales, se procedió a la caracterización de éstos. Para ello se llevaron a cabo una serie de análisis bioinformáticos de las secuencias nucleotídicas y de los productos proteicos, buscando con mayor detalle la homología entre estos marcadores y ETs del genoma de *Drosophila*. Los resultados mostraron que los marcadores de transposición, además de tener homología con regiones codificantes de uno o varios ETs, mostraban homología con varias regiones del genoma de *Drosophila*. Esto podría ser un indicativo del carácter repetitivo de las secuencias del marcador y de la movilización de los ETs en el genoma de los híbridos. Se ha observado que hasta un 90% de la inestabilidad detectada en los híbridos corresponde a inestabilidad por transposición. La caracterización de los marcadores de transposición ha permitido detectar la presencia de 34 elementos transponibles de *Drosophila* en el genoma de los

híbridos e indirectamente en el genoma de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

La detección de los ETs se realizó con la ayuda de la herramienta de búsqueda CENSOR según se detalla en el apartado 2.11 de Material y Métodos. Los resultados aparecen en forma de gráfico además de los valores de varios parámetros que nos permiten valorar el grado de similitud entre la secuencia enmascarada del marcador y el ET. Estos parámetros son: la clasificación del ET; el inicio y final de la región enmascarada (tanto en la secuencia problema (marcador AFLP) como en el ET); la orientación (Dir) de la secuencia nucleotídica (d: directa, c: complementaria) del marcador AFLP; la similitud (Sim) entre las dos secuencias alineadas; la proporción de bases positivas (Pos) en el alineamiento, lo que indicaría la calidad de la proteína traducida; y el score que indica las bases positivas en el Blast. Estos datos han sido detallados para cada uno de los marcadores AFLP de transposición de los híbridos (tablas 17, 18 y 19) y las especies parentales (tabla 20) mostrándose los ETs con los cuales se ha detectado homología.

En cada generación de retrocruzamiento se identificaron 5, 5 y 13 marcadores de transposición en los híbridos HR1, HR2 y HR3 respectivamente (tabla 17 y figura 11) y un seudogén en los híbridos HR2. En la especie parental *D. buzzatii* se detectó un único ET.

3.6.1 Marcadores de transposición detectados en los híbridos HR1

En los híbridos HR1 se observaron 5 marcadores de transposición que además de tener homología con el DNA de *Drosophila* tienen homología con ETs (tablas 17 y 19). El análisis de estos marcadores ha permitido identificar los siguientes ETs: **MINI-ME**, **gypsy1**, **Bel_1**. El marcador CCCC22 presenta homología con MINI-ME en las primeras 380 pb desde el extremo 5' y la homología con *Gypsy1* a partir de base 350 hacia el extremo 3'. Estos 5 marcadores corresponden al 16 % de los 30 marcadores de inestabilidad.

3.6.2 Marcadores de transposición en los híbridos HR2

En los híbridos HR2 también se observaron 5 marcadores de transposición (tablas 17 y 19) cuyo análisis permitió identificar los ETs **Helena**, **Homo6**, **MINI-ME** y el seudogén **LSU-tRNA_Hsa** de eucariotas. Estos 5 marcadores de transposición constituyen el 29 % de los 17 marcadores de inestabilidad en los híbridos HR2.

3.6.3 Marcadores de Transposición en los híbridos HR3

En los híbridos HR3 observamos 13 marcadores de transposición, algunos de estos marcadores mostraron homología con más de un ETs entre los que se identificaron los ETs: ***Helitron-2***, ***Gypsy1***, ***Oswaldo***, ***UHU***, ***Gypsy8***, ***Galileo***, ***TART***, ***Penelope***, ***Helitron-1N1***, ***Gypsy9***, y ***Homo6*** (tablas 17 y 19). Estos trece marcadores son el 52 % del total de 25 marcadores de inestabilidad en los híbridos HR3.

Tabla 18. Caracterización de los marcadores de inestabilidad por transposición en los híbridos HR1, HR2 y HR3

Marcadores de inestabilidad por Transposición en los híbridos HR1											
Marcador	Tamaño	Clon	Inicio	Final	ETs	Inicio	Final	Dir	Sim	Pos	Score
GGCTC21	647 bp	164	60	278	MINI-ME	230	424	d	0.46	0.58	106
CAGCA21	491 bp	236	355	471	Gypsy1	8243	8398	c	0.70	0.83	108
GGATT21	450 bp	138	175	203	Bel_1	1755	1783	d	0.93	0.93	224
CCCCC21	647 bp	162	96, 163, 315	153, 245, 382	MINI-ME	346	427	d	0.71	0.71	280
CCCCC22	540 pb	165	355	413	Gypsy1	8332	8390	c	0.83	0.83	331
Marcadores de inestabilidad por Transposición en los híbridos HR2											
TGTCG27	441 pb	136, 146	3	437	Helena	1828	2261	d	0.76	0.80	560
CAGCG23	447 pb	95, 96, 99	162	443	LSU-rRNA_Hsa	2032	2331	d	0.31	0.42	86
TGATT25	442 pb	106	140	429	Homo6	409	713	d	0.50	0.62	183
TCAGT21	347 pb	4, 23, 35	118	166	Homo6	1057	1097	c	0.88	0.88	272
TCAGT22	306 pb	18	3	185	MINI-ME	204	392	c	0.62	0.71	181
Marcadores de inestabilidad por Transposición en los híbridos HR3											
TGCGG21	145 pb	88	17	97	Helitron-2	1426	1500	c	0.46	0.77	68
TGATT21	554 pb	15	325	519	Gypsy1	16	225	c	0.34	0.52	67
TGATT24	530 pb	16	1	81	Oswaldo	1174	1254	d	0.51	0.63	85
TGATT25	513 pb	17	27	512	UHU	615	1097	c	0.52	0.66	420
TGATT26	505 pb	22	89	191	Gypsy8	6584	6676	c	0.7	0.7	249
TGATT22	408 pb	59	384	405	Galileo	49	70	d	0.1	0.99	41
TGATT27	441 pb	75	165	429	Homo6	419	713	d	0.58	0.68	186
TGATT27	441 pb	75	204	415	Galileo	4902	4691	c	0.32	0.87	181
TCTCG21	218 pb	143	17	217	TART	11373	11573	d	0.29	0.55	79
CGGGG22	172 pb	97	5	170	Galileo	361	526	c	0.60	0.75	175
CCGAT21	309 pb	167	74	116	Penelope	132	173	c	0.13	0.91	57
CCGAT21	309 pb	167	112	238	Gypsy1	8241	8394	c	0.82	0.82	498
CCGAT21	309 pb	167	107	173	Homo6	1151	1217	c	0.81	0.89	87
CCGAT22	264 pb	170	48	75	Helitron-1N1	3	30	c	0.92	0.92	219
CCGAT22	264 pb	170	76	130	Homo6	1150	1204	c	0.94	0.94	458
CCGAT22	264 pb	170	157	192	Gypsy1	8242	8286	c	0.64	0.72	24
CCGAT23	303 pb	171	22	91	Gypsy1	8326	8395	c	0.80	0.90	98
CCGAT23	303 pb	171	134	283	Gypsy9	3479	3625	c	0.38	0.48	74
CCGAT23	303 pb	171	25	85	Homo6	1151	1211	c	0.91	0.91	469
CCGAT24	320 pb	174	25	79	Homo6	1150	1204	c	0.94	0.94	79

ETs: Elementos transponibles; Dir: orientación de la secuencia nucleotídica, d: directa, c: complementaria; Sim: similitud; Pos: proporción de bases positivas; Score: bases homólogas

3.6.4 *Marcadores de transposición en los híbridos segmentales F3-F4*

En los híbridos segmentales se detectaron 10 marcadores de transposición (Tablas 18 y 19) a través de los cuales se determinó la presencia de los ETs: **Baggins1, Gypsy8, Helena, Bs, TRIM, Diver, Gypsy10, TART, MAX, BATUMI, Transib1, Gypsy3, Frogger, CIRCE, HETA, ZAM, Osvaldo, Gypsy12, Helitron-2**. Estos diez marcadores corresponden al 90 % del total de 11 marcadores de inestabilidad en los híbridos segmentales.

3.6.5 *Marcadores de transposición en los híbridos HR3 externos*

El análisis de los híbridos HR3 externos permitió observar 6 marcadores de transposición (tabla 18 y 19) y determinar la presencia de los ETs: **R2B, Gypsy10, Transib1, HMSBEAGLE, Gypsy6, BATUMI, TART-B1, DIVER2, Helena**. Tres de estos marcadores (TGCCC21, TGGCG21, GGGGG21) presentan homología con dos ETs. Los seis marcadores de transposición observados corresponden al 60 % del total de 10 marcadores de inestabilidad.

3.6.6 *Marcadores de transposición en las especies parentales: D. buzzatii y D. koepferae*

En los cruzamientos intraespecíficos de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae* se observó un nivel menor de inestabilidad genética. Los marcadores de inestabilidad observados indican que tan solo el marcador TGTCG41 de *D. buzzatii* tiene homología con una región de la endonucleasa del elemento **Helena** de *D. simulans*. Los demás marcadores corresponden a ADN genómico de las especies parentales (tabla 20).

En la figura 11 se muestran gráficamente la distribución de los marcadores de inestabilidad e inestabilidad por transposición en cada una de las generaciones de híbridos y en las especies parentales.

Tabla 19. Caracterización de los marcadores de inestabilidad por transposición en los híbridos segmentales F3-F4 y los híbridos HR3 externos

Marcadores de inestabilidad por Transposición en los Híbridos Segmentales												
Marcador	Tamaño	Clon	Inicio	Final	ETs	Inicio	Final	Dir	Sim	Pos	Score	
TGTCG21	377 pb	70	57	227	<i>Baggins1</i>	3507	3653	d	0.38	0.52	60	
		70	67	351	<i>Gypsy8</i>	2819	3070	d	0.32	0.45	54	
TGTCG22	443 pb	629	2	441	<i>Helena</i>	2350	2788	d	0.62	0.76	493	
		631	2	402	<i>BS</i>	2807	3207	c	0.62	0.71	208	
TGTCG23	415 pb	83	26	97	<i>TRIM</i>	508	579	d	0.41	0.58	52	
		83	16	105	<i>DIVER</i>	1827	1916	c	0.33	0.63	50	
		83	340	380	<i>Gypsy10</i>	1638	1679	c	0.64	0.71	45	
		83	318	413	<i>TART</i>	11586	11675	c	0.41	0.55	52	
CACTC22	500 pb	272	12	413	<i>MAX</i>	2550	3116	d	0.50	0.66	252	
		272	257	497	<i>BATUMI</i>	2935	3174	d	0.60	0.60	312	
CAGCA22	359 pb	37	254	338	<i>Transib 1</i>	1980	2024	d	0.60	0.73	51	
CGAGT21	707 pb	107	16	306	<i>Gypsy3</i>	2781	3080	c	0.27	0.45	68	
CACAT21	153 pb	14	55	144	<i>Frogger</i>	240	338	d	0.41	0.61	55	
CACTC21	529 pb	93	12	95	<i>CIRCE</i>	4054	4137	c	0.55	0.62	71	
		93	245	406	<i>HETA</i>	1972	2130	d	0.31	0.41	63	
TGATT26	519 pb	29	369	503	<i>ZAM</i>	5430	5561	d	0.35	0.58	64	
		29	111	227	<i>Oswaldo</i>	5917	6054	c	0.46	0.56	67	
CGGCA21	1231 pb	76	3	1228	<i>Gypsy12</i>	3622	4860	d	0.47	0.60	864	
		47	819	1067	<i>Helitron-2</i>	16	231	c	0.51	0.62	153	
Marcadores de inestabilidad por Transposición en los Híbridos HR3 externos												
TGCCC21	94 pb	5	13	84	<i>R2B</i>	738	818	d	0.52	0.64	51	
		5	14	73	<i>Gypsy10</i>	3418	3477	c	0.45	0.55	44	
TGCCG22	112 pb	51	13	69	<i>Transib1</i>	1260	1316	d	0.47	0.68	48	
TGGCG21	159 pb	107	33	155	<i>HMSBEAGLE</i>	4370	4495	c	0.38	0.50	49	
		107	45	158	<i>Gypsy6</i>	4378	4491	d	0.36	0.53	49	
TGGCG22	156 pb	119	5	121	<i>BATUMI</i>	6291	6401	d	0.42	0.53	48	
GGGGG21	169 pb	10	34	162	<i>TART-B1</i>	6705	6818	d	0.40	0.53	47	
		10	83	169	<i>DIVER2</i>	626	709	d	0.37	0.62	51	
GGGCC21	132 pb	31	39	113	<i>Helena</i>	396	470	d	0.60	0.72	74	

ETs: Elementos transponibles; Dir: orientación de la secuencia nucleotídica, d: directa, c: complementaria; Sim: similitud; Pos: proporción de bases positivas; Score: bases homólogas

Tabla 20. Elementos transponibles detectados a través de los marcadores AFLP en el genoma de los híbridos

ETs	Especie	Clase	Familia	Marcador	Híbrido	Región homologa del ET
<i>Baggins1</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon sin LTR	Loa	TGTCG21	HS	reversotranscriptasa y RNAsa
<i>BATUMI</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	BEL	CACTC22	HS	poliproteína
<i>BATUMI</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	BEL	TGGCG22	HR3 EXT	región interna
<i>Bel_1</i>	<i>D. willistoni</i>	retrotransposon LTR	BEL	GGATT21	HR1	región interna
<i>BS</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	TGTCG22	HS	región interna
<i>CIRCE</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	CIRCE	CACTC21	HS	región interna
<i>DIVER</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	BEL	TGTCG23	HS	endonucleasa/integrasa
<i>DIVER2</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	BEL	GGGGG21	HR3 EXT	poliproteína/gag
<i>Frogger</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	Copia	CACAT21	HS	región interna
<i>Galileo</i>	<i>D. buzzatii</i>	transposon DNA	P	TGATT22	HR3	región interna
<i>Galileo</i>	<i>D. buzzatii</i>	transposon DNA	P	CGGGG22	HR3	región interna
<i>Gypsy1</i>	<i>D. mojavensis</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CAGCA21	HR1	región interna
<i>Gypsy1</i>	<i>D. mojavensis</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CCCCC22	HR1	región interna
<i>Gypsy1</i>	<i>D. mojavensis</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CCGAT22	HR3	región interna
<i>Gypsy1</i>	<i>D. mojavensis</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGATT21	HR3	LTR
<i>Gypsy3</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CGAGT21	HS	poliproteína
<i>Gypsy6</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGGCG21	HR3 EXT	poliproteína/env
<i>Gypsy8</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGTCG21	HS	región interna
<i>Gypsy8</i>	<i>D. pseudoobsura</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGATT26	HR3	poliproteína
<i>Gypsy9</i>	<i>D. pseudoobsura</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CCGAT23	HR3	región interna
<i>Gypsy10</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGTCG23	HS	región interna
<i>Gypsy10</i>	<i>D. willistoni</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGCCC21	HR3 EXT	región interna
<i>Gypsy12</i>	<i>D. willistoni</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	CGGCA21	HS	región interna
<i>Helena</i>	<i>D. simulans</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	TGTCG22	HS	ORF2/endonucleasa
<i>Helena</i>	<i>D. virilis</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	GGGCC21	HR3 EXT	reversotranscriptasa
<i>Helena</i>	<i>D. virilis</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	TGTCG27	HR2	reversotranscriptasa
<i>Helitron-2</i>	<i>D. virilis</i>	transposon DNA	Helitron	TGCGG21	HR3	región interna
<i>Helitron-1N1</i>	<i>D. virilis</i>	transposon DNA	Helitron	CCGAT22	HR3	región interna
<i>Helitron-2</i>	<i>D. virilis</i>	transposon DNA	Helitron	CGGCA21	HS	extremo 5'
<i>HETA</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	CACTC21	HS	región interna
<i>HMSBEAGLE</i>	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	<i>Gypsy</i>	TGGCG21	HR3 EXT	poliproteína/pol

HR1: Híbrido de retrocruzamiento 1, HR2: híbrido de retrocruzamiento 2; HR3: híbrido de retrocruzamiento 3; HS: híbrido segmental; HR3 EXT: híbrido de retrocruzamiento 3 del experimento externo.

Tabla 19 continuación. Elementos Transponibles detectados a través de los marcadores AFLP en los híbridos

ETs	Especie	Clase	Familia	Marcador	Híbrido	Región homóloga del ET
Homo6	<i>D. mojavensis</i>	transposon DNA	hAT	TGATT25	HR2	región interna
Homo6	<i>D. mojavensis</i>	transposon DNA	hAT	TCAGT21	HR2	región interna
Homo6	<i>D. mojavensis</i>	transposon DNA	hAT	TGATT27	HR3	región interna
Homo6	<i>D. mojavensis</i>	transposon DNA	hAT	CCGAT22	HR3	región interna
LSU-rRNA_Hsa	<i>Metazoa/Eucariota</i>	Pseudogen	rRNA	CAGCG23	HR2	Locus HSU13369
MAX	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	BEL-PAO	CACTC22	HS	poliproteína
MINI-ME	<i>D. nigrodonni</i>	retroposon	Mini-me	GGCTC21	HR1	región interna
MINI-ME	<i>D. nigrodonni</i>	retroposon	Mini-me	CCCCC21	HR1	región interna
MINI-ME	<i>D. nigrodonni</i>	retroposon	Mini-me	TCAGT21	HR2	región interna
Osvaldo	<i>D. buzzatii</i>	retrotransposon LTR	Gypsy	TGATT24	HR3	región interna
Osvaldo	<i>D. buzzatii</i>	retrotransposon LTR	Gypsy	TGATT26	HS	región interna
Penelope	grupo <i>virilis</i>	retrotransposon sin LTR	R2	CCGAT21	HR3	región interna
R2B	<i>D. mercatorum</i>	retrotransposon sin LTR	R2	TGCCC21	HR3 EXT	región interna
TART	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	TGTCG23	HS	poliproteína
TART	<i>D. virilis</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	TCTCG21	HR3	poliproteína
TART-B1	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon sin LTR	Jockey	GGGGG21	HR3 RXT	región interna
Transib1	<i>D. melanogaster</i>	transposon DNA	Transib	TGCCC22	HR3 EXT	transposasa
Transib1	<i>D. pseudoobscura</i>	transposon DNA	Transib	CAGCA22	HS	transposasa
TRIM	<i>D. miranda</i>	retrotransposon sin LTR	TRIM	TGTCG23	HS	región interna
UHU	<i>D. heteroneura</i>	transposon DNA	Mariner	TGATT25	HR3	región interna
ZAM	<i>D. melanogaster</i>	retrotransposon LTR	Gypsy	TGATT26	HS	región interna

HR1: Híbrido de retrocruzamiento 1, HR2: híbrido de retrocruzamiento 2; HR3: híbrido de retrocruzamiento 3; HS: híbrido segmental; HR3 EXT: híbrido de retrocruzamiento 3 del experimento externo.

Tabla 21. Marcador de inestabilidad por transposición en *D. buzzatii*

Marcador	Tamaño	Clon	Inicio	Final	ETs	Inicio	Final	Dir	Sim	Pos	Score	Región homóloga del ET
TGTCG41	441 pb	134	1	439	<i>Helena</i> -Ds	2350	2788	c	0.67	0.78	510	ORF2/endonucleasa

ETs: Elementos transponibles; Dir: orientación de la secuencia nucleotídica, d: directa, c: complementaria; Sim: similitud; Pos: radio positivo; Score: bases homólogas

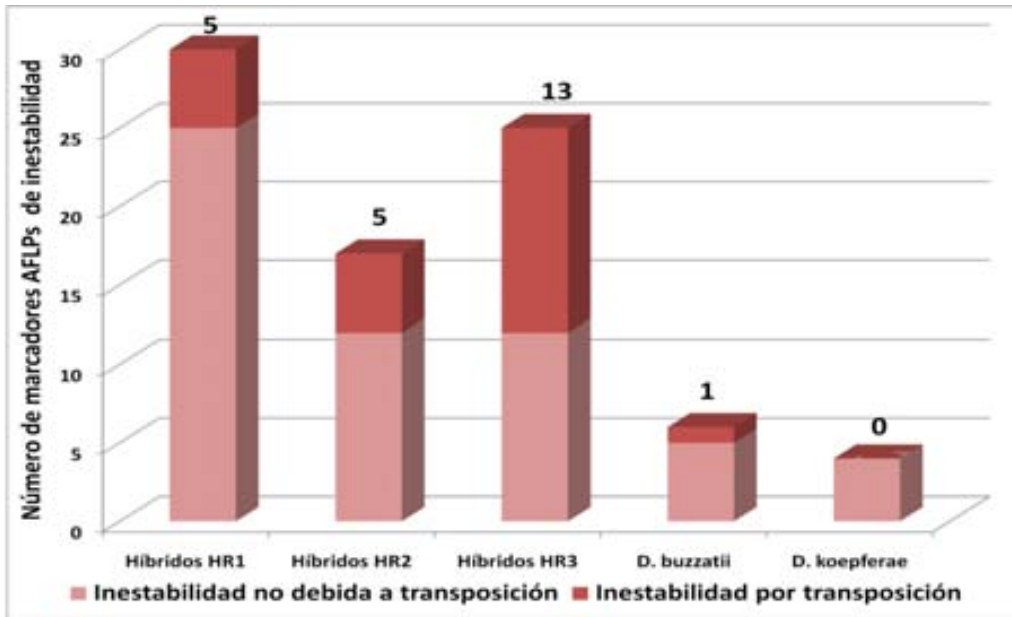


Figura 11. Marcadores AFLP de inestabilidad por transposición

3.7 Prueba de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para la inestabilidad

La prueba de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis son pruebas no paramétricas, la primera permite comparar dos grupos y la segunda tres o más. Para determinar si el número de marcadores de inestabilidad observado era diferente entre híbridos y especies parentales realizamos la prueba de Mann-Whitney. La comparación se basó en el total de híbridos frente las especies parentales y cada familia de híbridos frente a las especies parentales. Los grupos comparados están constituidos así:

- Híbridos: conformado por todos los híbridos interespecíficos de las tres familias analizadas en la generación HR3.
- Familias: híbridos HR3 de cada familia analizada.
- Parentales (control): formado por la descendencia F4 de los cruces intraespecíficos de las dos especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Las observaciones de las dos especies fue analizada como un solo grupo.

La H_0 supone que no existen diferencias entre los grupos analizados por tanto la inestabilidad sería homogénea en ambos grupos. Los resultados de la prueba Mann-Whitney entre los híbridos HR3 y los parentales muestra un valor de $P = 0,045$ lo que indica que existen diferencias significativas entre híbridos y especies parentales, por tanto podemos asumir que el nivel de inestabilidad por transposición en los híbridos HR3 es mayor que en las especies parentales. La comparación entre cada familia de híbridos y las especies parentales en cambio señala que solo la familia 40 es significativamente diferente ($P = 0,035$) a los parentales (tabla 21).

Tabla 22. Prueba de Mann-Whitney para comparar la inestabilidad inducida por transposición en los híbridos y las especies parentales

Inestabilidad por transposición	N		Mann-Whitney		
	Híbridos	Parentales	U	Z	P exacta
Híbridos HR3 vs. Parentales	40	30	513,500	-1,859	0,045*
Familia 10 vs. Parentales	12	30	170,500	-0,717	0,286
Familia 13 vs. Parentales	12	30	155,500	-0,150	0,134
Familia 40 vs. Parentales	16	30	187,500	-2,240	0.035*

N: tamaño de la muestra, U: valor estadístico, Z: aproximación a la media, P exacta: probabilidad exacta,* $P < 0,05$

Para determinar si existen diferencias entre las familias de híbridos HR3 en cuanto a la inestabilidad total y la inestabilidad inducida por transposición realizamos la prueba de Kruskal-Wallis. La H_0 supone que no existen diferencias en la inestabilidad observada entre las tres familias. La comparación de la inestabilidad total muestra que entre las tres familias existen diferencias altamente significativas ($P = 0,010$), sin embargo al comparar la inestabilidad debida únicamente a transposición no detecta diferencias entre las familias analizadas (tabla 22).

Tabla 23. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar la inestabilidad entre las familias de híbridos

Inestabilidad entre familias híbridos HR3	N			Kruskal - Wallis		
	Familia 10	Familia 13	Familia 40	χ^2	gl	P exacta
	12	12	16			
Inestabilidad total				8,761	2	0,010**
Inestabilidad por transposición				0,97	2	0,653

N: tamaño de la muestra, χ^2 : chi cuadrado, gl: grados de libertad, P exacta: probabilidad exacta, ** P< 0,01

3.8 La transposición/reorganización genómica de *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* estudiada mediante transposon display

Mediante la técnica del transposon display se hizo una estima cuantitativa de las tasas de transposición/reorganización genómica de tres ETs (*Oswaldo*, *Helena* y *Galileo*). Esta técnica nos permite la identificación del número de inserciones de cada elemento en el genoma y compararlos en los diferentes cruces. Así pues, dos inserciones se consideraran idénticas si equivalen a una banda de igual tamaño en diferentes individuos. Dado que las diferentes inserciones del genoma tendrán un ADN flanqueante diferente, el corte con enzimas de restricción nos dará un patrón distinto. Con esta técnica se analizaron los híbridos interespecíficos HR1, HR2 y HR3 de 4 familias: 1, 10, 13 y 40 estudiando las inserciones nuevas que segregaban en cada una de las generaciones. Paralelamente se analizaron dos familias de los cruzamientos intraespecíficos (controles) de cada especie parental, las familias B4 y B8 de *D. buzzatii* y las familias K3 y K9 de *D. koepferae*. En este último caso se analizaron los descendientes de la generación F4 contabilizando las nuevas inserciones observadas en esa generación.

En ambos casos se asume que las nuevas inserciones observadas en los híbridos HR3 y en los individuos F4 se han producido a partir del cruzamiento inicial y han sido acumuladas ó fijadas a lo largo de las generaciones.

3.8.1 Resultados del transposon display del retrotransposon *Oswaldo*

Mediante el transposon display se han visualizado inserciones del elemento *Oswaldo* que varían en un rango de 171 a 1171 pb en las cuales se incluye el tamaño mínimo del extremo del elemento (152 pb para *Oswaldo*) más la región flanqueante. El número total de inserciones del retrotransposon *Oswaldo* en los híbridos varía en las familias analizadas en un rango que va desde 34, en la generación R1 de la familia 40, hasta un máximo de 54 inserciones, en la generación R3 de la familia 10. Se observa una tendencia a segregar un mayor número de inserciones en la generación R3, en la cual se ha observado el mayor número de inserciones nuevas (tabla 23). El número de nuevas inserciones también oscila entre generaciones: 0 copias, en la generación R1 de la familia 40, hasta 11 en la generación R3 de las familias 13 y 40.

En las especies parentales, el número total de inserciones de *Oswaldo* es menor que en los híbridos (tabla 23) observándose tan solo una nueva inserción del retrotransposon *Oswaldo* en la familia B8 de *D. buzzatii*. Las matrices de datos de la cual se extrajeron estas puntualizaciones se encuentran adjuntas en los anexos 2 a 13.

3.8.2 Resultados del transposon display del elemento *Helena*

En el caso del elemento *Helena*, analizamos el extremo 3' ya que se conoce que el extremo 5' de este elemento se encuentra a menudo deletado en *D. simulans*. El transposon display muestra inserciones de tamaños que van desde 110 hasta 630 pb, siendo 107 pb el tamaño mínimo esperado en la amplificación del elemento. El número total de inserciones observadas del elemento *Helena* en los híbridos interespecíficos va desde 15, en la generación R1, hasta 25 en la generación R3 (tabla 22). Al igual que para *Oswaldo* hay una tendencia, aunque más sutil, a incrementar el número de inserciones en la generación R3. Además cabe señalar que en todas las familias se ha observado al menos una nueva inserción en alguna de las generaciones.

En las especies parentales solo se ha observado actividad del elemento *Helena* en la familia B4 de *D. buzzatii* en la cual se observó una nueva inserción (tabla 24). Las matrices de datos del transposon display para *Helena* están adjuntas en los anexos 14 a 25.

3.8.3 Resultados del transposon display del transposon Galileo

El tamaño de las inserciones del elemento *Galileo* amplificadas en el transposon display van desde 191 hasta 866 pb. La cantidad de inserciones totales del elemento *Galileo* en los híbridos interespecíficos es también muy variable entre familias, oscilando entre 25, en la generación R1 de la familia 1 y 56 inserciones, en la generación R3 de la familia 40. En cuanto a las nuevas inserciones se observa un número en general bajo que oscila entre 0 y 10. Cabe destacar la familia 10 que no presenta inserciones nuevas de este elemento en ninguna de las generaciones estudiadas (tabla 25).

En el caso de las especies parentales se observa un promedio de 41 inserciones en *D. buzzatii* y 44 en *D. koepferae*, no observándose ninguna inserción nueva al cabo de las 4 generaciones en estudio. Las matrices de datos del transposon display para *Galileo* están adjuntas en los anexos 26 a 37.

Tabla 24. Inserciones del elemento *Oswaldo* en los híbridos interespecíficos y las especies parentales

Generación	R1				R2				R3			
	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción
Familia 1	37	3	581	5	39	3	296	3	46	7	382	1
			666	2			989	2			408	1
			1131	2			1056	2			527	9
											638	2
											756	10
										848	16	
										1155	14	
Familia 10	38	1	930	1	48	9	256	3	54	10	339	10
							307	2			428	9
							385	7			468	8
							494	1			494	8
							646	6			539	5
							694	1			630	2
							734	7			694	4
							838	2			830	1
							942	1			883	1
										942	3	
Familia 13	38	1	175	1	38	1	302	2	48	11	360	4
											365	1
											371	4
											412	2
											445	1
											564	1
											608	1
											702	1
											741	1
											997	2
										1071	4	

Tabla 23 continuación. Inserciones del elemento *Oswaldo* en los híbridos interespecíficos y las especies parentales

Generación	R1				R2				R3			
	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción
Familias												
Familia 40	34	0			37	5	185	2	50	11	201	2
							309	1			369	6
							334	2			444	14
							428	2			510	4
							797	3			750	2
											857	6
											938	2
											966	5
											1003	1
											1090	3
											1129	1
Generación	F4											
<i>D. buzzatii</i>												
Familia B4									40	0	0	
Familia B8									35	1	376	3
<i>D. koepferae</i>												
Familia K3									39	0	0	
Familia K9									34	0	0	

Tabla 25. Inserciones del elemento *Helena* en los híbridos interespecíficos y las especies parentales

Generación	R1				R2				R3						
	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción			
Familia 1	18	0			23	3	257 340 406	6 4 1	22	2	315 480	4 10			
Familia 10	15	0			21	2	571 549	2 3	25	1	302	4			
Familia 13	15	1	489	1	22	0			24	1	505	6			
Familia 40	21	0			24	1	388	2	25	1	322	3			
Generación												F4			
<i>D. buzzatii</i>															
Familia B4												27	1	360	6
Familia B8												28	0	0	0
<i>D. koepferae</i>															
Familia K3												25	0		0
Familia K9												22	0		0

Tabla 26. Inserciones del elemento *Galileo* en los híbridos interespecíficos y especies parentales

Generación	R1				R2				R3			
	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción	Número total de inserciones	Número de inserciones nuevas	Tamaño Inserción (pb)	Número de copias por inserción
Familia 1	25	1	215	5	30	0			32	2	309 465	2 23
Familia 10	35				39	0			40	0		
Familia 13	48				47	0			49	1	556	4
Familia 40	52	2	740 838	5	55	2	447 701	5 12	56	0		
Generación										F4		
<i>D. buzzatii</i>												
Familia B4										40	0	0
Familia B8										43	0	0
<i>D. koepferae</i>												
Familia K3										42	0	0
Familia K9										45	0	0

3.9 Tasas de transposición

Se han calculado las tasas de transposición/reorganización genómica de los 3 elementos, citados en el apartado anterior. Cada uno de los cuales pertenece a una clase diferente: *Oswaldo* es un retrotransposon, *Helena* un retroposon y *Galileo* un transposon. Para cada uno de ellos se ha calculado la tasa de transposición tanto en los híbridos interespecíficos como en las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*. La tasa de transposición de los híbridos se realizó a cada generación, para las familias 1, 10, 13 y 40, dado que a nivel práctico esto facilitaba el cálculo. En el caso de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*, las tasas de transposición se basaron en los individuos obtenidos en la generación F4 de los cruzamientos intraespecíficos B4 y B8 de *D. buzzatii* y, K3 y K9 de *D. koepferae*.

3.9.1 Tasas de transposición del elemento *Oswaldo*

La tasa de transposición del retransposon *Oswaldo* estimada para los híbridos HR1, HR2 y HR3 y las especies parentales indica que en los híbridos hay un incremento de la transposición de un orden de magnitud (10^{-2}) frente a las especies parentales (10^{-3}). Este incremento es de un orden de magnitud y similar en todas las familias analizadas. La tasa de transposición basal de *Oswaldo* en *D. buzzatii* es de 10^{-3} mientras que en *D. koepferae* es 0 ($<10^{-3}$) debido a que no se observaron nuevas inserciones en esta última especie (tabla 24). En las tres generaciones de híbridos el elemento *Oswaldo* mantiene alta su transposición y algunas de las nuevas inserciones permanecen en el genoma de la siguiente generación (tabla 26).

3.9.2 Tasas de transposición del elemento *Helena*

Las estimas de la tasa de transposición del elemento *Helena* en los híbridos en la generación R3 y en las especies parentales en la generación F4 son del orden de 10^{-3} por lo tanto no hay un incremento en la transposición en esta generación, sin embargo, en la generación R1 y R2 hay dos familias en las que la tasa de transposición se incrementa hasta 10^{-2} (tabla 27). Los mecanismos que controlan a este elemento parece que se restablecen rápidamente después del estrés genómico.

3.9.3 Tasas de transposición del elemento Galileo

Los datos obtenidos para el elemento *Galileo* muestran grandes variaciones en las tasas de transposición dentro de las familias de híbridos analizadas. En la familia 10 no se observó movilización del elemento, mientras que en la generación R1 en las familias 1 y 40 se observa un incremento de un orden de 10^{-2} y en la generación R3 hay una disminución de la transposición, en la familia 1 la tasa de transposición es de 10^{-4} y en la familia 13 es de 10^{-3} . La tasa de transposición basal de *D. buzzatii* y *D. koepferae* es 0 ($<10^{-3}$) (tabla 28).

3.9.4 Prueba de Mann-Whitney para las tasas de transposición

Con el fin de determinar si en los híbridos se produce un incremento significativo de la transposición, hemos realizado la prueba de Mann-Whitney para comparar las tasas de transposición estimadas en las familias de híbridos y especies parentales. Para el retrotransposon *Oswaldo* el valor de $P = 0,014$ a un nivel de significación del 0,05 permite rechazar H_0 lo cual indica que hay diferencias significativas entre la transposición observada en los híbridos y las especies parentales, siendo los híbridos quienes presentan un incremento estadísticamente significativo de la tasa de transposición de *Oswaldo*.

En el caso del retroposon *Helena* ($P = 0,157$) y el transposon *Galileo* ($P = 0,214$) la prueba estadística indica que no hay diferencias significativas entre la transposición de los híbridos y las especies parentales en ambos casos (tabla 29).

Las comparaciones de las tasas de transposición están basadas en la transposición observada en la generación HR3 de las familias de híbridos interespecíficos y en la generación F4 de las familias de cruces intraespecíficos de las especies parentales.

Tabla 27. Cálculo de las tasas de transposición de *Oswaldo* en los híbridos y en las especies parentales

Generación	R1					R2					R3					
	<i>Oswaldo</i>	Ni	2	N	A	TT R1	Ni	2	N	A	TT R2	Ni	2	N	A	TT R3
Híbridos																
Familia 1	12	2	7	35	$2,45 \times 10^{-2}$	7	2	18	37	$5,2 \times 10^{-3}$	53	2	40	41	$1,6 \times 10^{-2}$	
Familia 10	1	2	2	37	$6,76 \times 10^{-3}$	30	2	18	39	$2,1 \times 10^{-2}$	60	2	25	49	$2,4 \times 10^{-2}$	
Familia 13	1	2	2	36	$6,94 \times 10^{-3}$	2	2	15	37	$1,8 \times 10^{-3}$	22	2	36	37	$8,2 \times 10^{-3}$	
Familia 40	0	2	5	34	0	10	2	14	35	$1,2 \times 10^{-2}$	46	2	18	40	$3,1 \times 10^{-2}$	
<i>D. buzzatii</i>																
Familia B4											0	2	15	40	0	
Familia B8											3	2	13	34	$3,3 \times 10^{-3}$	
<i>D. koepferae</i>																
Familia K3											0	2	11	39	0	
Familia K9											0	2	13	34	0	

N1: nuevas inserciones; N: individuos analizados; A: inserciones originales; TT: Tasas de transposición

Tabla 28. Cálculo de las tasas de transposición de *Helena* en los híbridos y en las especies parentales

Generación	R1					R2					R3					
	<i>Helena</i>	Ni	2	N	A	TT R1	Ni	2	N	A	TT R2	Ni	2	N	A	TT R3
Híbridos																
Familia 1		0	2	7	18	0	11	2	17	20	$1,6 \times 10^{-2}$	14	2	40	20	$8,7 \times 10^{-3}$
Familia 10		2	2	2	15	$3,33 \times 10^{-2}$	5	2	19	20	$6,5 \times 10^{-3}$	4	2	33	24	$2,5 \times 10^{-3}$
Familia 13		2	2	3	15	$2,22 \times 10^{-2}$	0	2	16	22	0	6	2	38	23	$3,4 \times 10^{-3}$
Familia 40		0	2	5	21	0	2	2	13	23	$3,3 \times 10^{-3}$	3	2	16	24	$3,9 \times 10^{-3}$
<i>D. buzzatii</i>																
Familia B4												6	2	14	26	$8,2 \times 10^{-3}$
Familia B8												0	2	14	28	0
<i>D. koepferae</i>																
Familia K3												0	2	5	25	0
Familia K9												0	2	14	22	0

N1: nuevas inserciones; N: individuos analizados; A: inserciones originales; TT: Tasas de transposición

Tabla 29. Cálculo de las tasas de transposición de *Galileo* en los híbridos y las especies parentales

Generación	R1					R2					R3					
<i>Galileo</i>	Ni	2	N	A	TT R1	Ni	2	N	A	TT R2	Ni	2	N	A	TT R3	
Híbridos																
Familia 1	5	2	7	24	$1,49 \times 10^{-2}$	0	2	18	30	0	2	2	40	31	$8,06 \times 10^{-4}$	
Familia 10	0	2	2	35	0	0	2	17	39	0	0	2	30	40	0	
Familia 13	0	2	3	48	0	0	2	11	47	0	4	2	32	48	$1,3 \times 10^{-3}$	
Familia 40	7	2	5	52	$1,35 \times 10^{-2}$	5	2	14	55	$3,1 \times 10^{-3}$	0	2	24	56	0	
<i>D. buzzatii</i>																
Familia B4											0	2	15	40	0	
Familia B8											0	2	11	43	0	
<i>D. koepferae</i>																
Familia K3											0	2	11	42	0	
Familia K9											0	2	13	45	0	

N1: nuevas inserciones; N: individuos analizados; A: inserciones originales; TT: Tasas de transposición

Tabla 30. Prueba de Mann-Whitney para las tasas de transposición de híbridos y parentales

Tasas de Transposición	N		Mann-Whitney		
	Híbridos	Parentales	U	Z	P exacta
Oswaldo	4	4	0,0	-2,360	0,014*
Helena	4	4	3,5	-1,340	0,157
Galileo	4	4	4,0	-1,510	0,214

N: tamaño de la muestra, U: valor estadístico, Z: aproximación a la media, P exacta: probabilidad exacta, * significativo al 0,05

3.10 Localización cromosómica de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* en la cepas parentales mediante FISH (fluorescent *in situ* hybridization)

Mediante la técnica de FISH fueron mapeadas las inserciones eucromáticas de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* en los cromosomas politénicos de las especies parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*. En la figura 12 se ilustra a modo de ejemplo los resultados de la hibridación del elemento *Helena* en el cromosoma 5 de los híbridos segmentales y las especies parentales. En los híbridos se observan 3 posiciones eucromáticas (2E3, 3F4, 5G1) que solo están presentes sus cromosomas. En la tabla 30 se resumen las inserciones observaciones para los tres elementos.

Tabla 31. Inserciones de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* en los cromosomas politénicos de *D. buzzatii* y *D. koepferae*

Elemento/Especie	Cromosomas					Total señales
	X	2	3	4	5	
Oswaldo						
<i>D. buzzatii</i>	G2, H	E4, D4	D1, H	H	H	4
<i>D. koepferae</i>	H	H	H	H	H	0
Helena						
<i>D. buzzatii</i>	A2	E2	G1, H	T	A5, D2	5
<i>D. koepferae</i>	A2, F3, G2	B2, E2, F1		D4, G2	C4, C4, C5, F2	12
Híbridos segmentales	A2, H	E2, E3	F4, H		A5, D2, G1	7
Galileo						
<i>D. buzzatii</i>				E3		1
<i>D. koepferae</i>					G1	1

H: hibridación centromérica; T: hibridación telomérica

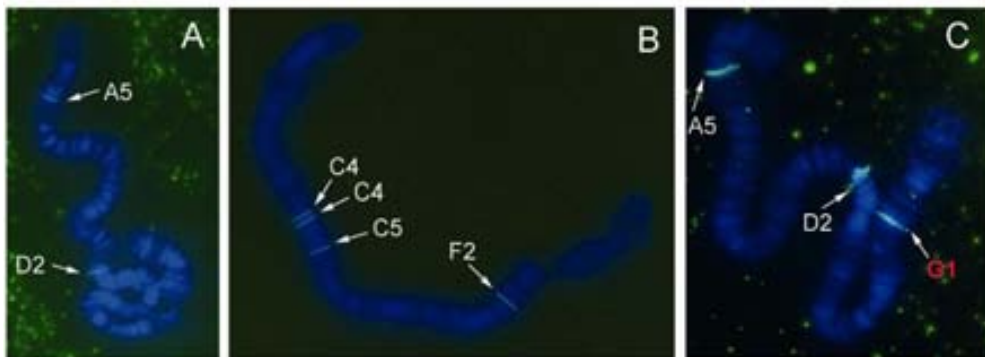


Figura 12. Hibridación FISH del elemento *Helena* en el cromosoma 5 de A: *D. buzzatii*, B: *D. koepferae* y C: los híbridos segmentales, G1: nueva inserción

3.11 Expresión de los Elementos *Oswaldo Helena* y *Galileo*

Con el fin de determinar el nivel de actividad autónoma de los elementos estudiados y poder interpretar los resultados obtenidos, se realizó un estudio de la actividad de cada elemento a través del análisis de su expresión en las especies parentales. Este análisis se realizó por amplificación, por RT-PCR, de las regiones de la reverso transcriptasa, endonucleasa y transposasa de *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* respectivamente siguiendo las pautas detalladas en la sección 2.19 de material y métodos. Los resultados mostraron la expresión de los elementos *Oswaldo* y *Helena* (figura 13) tanto en *D. buzzatii* como en *D. koepferae*. Sin embargo el elemento *Galileo* no se expresa en ninguna de las dos especies parentales.

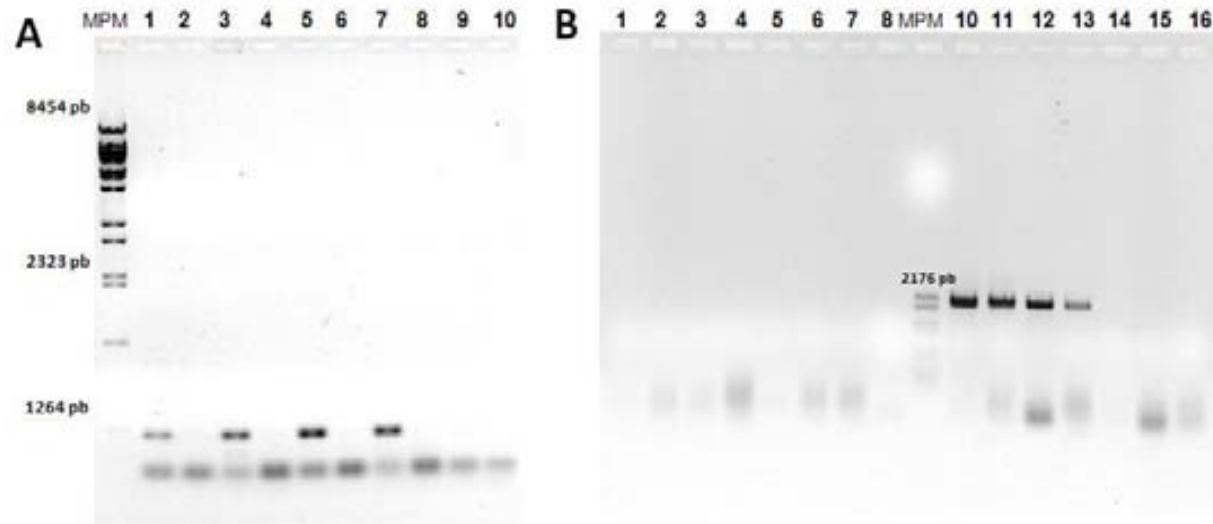


Figura 13. Amplificación por RT-PCR de los elementos *Osvaldo Helena* y *Galileo* en las especies parentales

A: 1-4: Expresión de *Helena* en *D. buzzatii*, 1: ♂ línea somática, 3: ♂ línea germinal; 2 y 4 controles; 5-8: *D. koepferae*, 5: ♀ línea somática; 7: ♀ línea germinal; 6 y 8 controles, 9: ADN genómico; 10: control negativo de *Helena*

B: 1-4: Expresión de *Galileo* en *D. buzzatii*: 1: ♂ línea somática, 2: ♂ línea germinal, 3: ♀ línea somática, 4: ♀ línea germinal, 5, 6, 7, 8: controles negativos de *Galileo*, 9: MPM VI, 10- 13: Expresión de *Osvaldo* en *D. buzzatii*, 10: ♂ línea somática, 11: ♂ línea germinal, 12: ♀ línea somática, 13: ♀ línea germinal, 14, 15, 16: controles negativos de *Osvaldo*

Discusión

4 DISCUSIÓN

4.1 La inestabilidad híbrida detectada por AFLPs

La técnica de los AFLP, en sus inicios, fue implementada principalmente para el estudio del genoma de plantas y posteriormente se ha convertido en una excelente herramienta en el estudio genético de vertebrados e invertebrados. En este trabajo hemos aprovechado las características de estos marcadores para obtener un genotipado uniforme y aleatorio de todo el genoma de las especies parentales y los híbridos. Esta técnica nos ha permitido obtener patrones de bandeo claros, con bandas fácilmente discriminables (con excepciones puntuales), gracias a la variedad de nucleótidos selectivos para cada enzima. La poca cantidad de ADN extraído de algunas muestras no fue un factor limitante ya que para obtener los AFLP no se requiere de gran cantidad de ADN. Uno de los puntos clave para la clonación, secuenciación y análisis de los marcadores de inestabilidad fue el alto grado de reproductibilidad de los AFLP, una gran ventaja frente a otros marcadores moleculares, por ejemplo los RFLP cuyos patrones no son repetibles. Además la gran cantidad de información obtenida a partir de los marcadores AFLP ha permitido que sean utilizados y que su eficacia haya sido ratificada en diversos estudios evolutivos, ecológicos, medioambientales, etc. (Savelkoul *et al.*, 1999; Winter & Porter, 2010; Zeid *et al.*, 2004).

En la mayoría de estudios con híbridos interespecíficos, en los cuales se han analizado los genomas con marcadores AFLP, se ha observado que una parte de la inestabilidad genómica está generada por marcadores especie-específicos lo cual indicaría que dichos marcadores proceden de alguna de las especies parentales (Divakaran *et al.*, 2006; Jones, 1995; Teo *et al.*, 2002). Estos marcadores especie-específicos han demostrado ser altamente resolutivos para identificar la especie de la cual proceden. Además de los marcadores especie-específicos mencionados, encontramos marcadores AFLP originados *de novo* en el genoma de los híbridos (específicos del genoma híbrido), los cuales serían indicadores de inestabilidad genómica que se produce en el genoma de los híbridos y por lo tanto no están presentes en las especies parentales. Estos marcadores AFLP originados *de novo* en el genoma de los híbridos han sido denominados: **marcadores AFLP de inestabilidad híbrida**.

Conocemos que la inestabilidad genética producida en los híbridos, por la interacción de los genomas parentales, se presenta en forma de rearrreglos cromosómicos y rearrreglos genómicos (Hegarty *et al.*, 2009; Johnson, 2010; Michalak & Noor, 2003). En los híbridos interespecíficos de *D. koepferae* y *D. buzzatii*, se han observado con anterioridad altos niveles de rearrreglos cromosómicos e incremento de las mutaciones (Naveira & Fontdevila, 1985). Acorde con estas observaciones, el análisis de los AFLP en los híbridos y especies parentales ha permitido visualizar un número mayor de marcadores de inestabilidad genómica en los híbridos. La potencia resolutive de estos marcadores ha sido aprovechada en este estudio para seleccionar marcadores AFLP de inestabilidad híbrida, para cuantificar la inestabilidad en el genoma de las especies *D. buzzatii* y *D. koepferae* y los híbridos interespecíficos de éstas, y para determinar el origen de los marcadores observados y por tanto de la inestabilidad observada en cada genoma.

El genotipado de las especies parentales y los híbridos con 40 combinaciones de AFLP permitió observar un alto número de marcadores de inestabilidad en el genoma de los híbridos (72 marcadores de inestabilidad) frente a las especies parentales (4 marcadores en *D. koepferae* y 6 en *D. buzzatii*). Estos datos se basan en las observaciones de los híbridos HR1, HR2 y HR3. Debido a que este estudio se enfoca en la inestabilidad producida en las células germinales y que por tanto podría ser observada en las siguientes generaciones, se omitió el análisis de los marcadores en los híbridos HF1, ya que gran de estos marcadores segregaron en familias que no produjeron híbridos HR1 y existía la probabilidad de que esta inestabilidad fuera generada en las células somáticas, por tanto no permitían su seguimiento.

El origen de los marcadores AFLP se debe a mutaciones puntuales en las dianas de restricción, recombinación y a inserciones o deleciones de fragmentos de ADN como se ha explicado anteriormente. Entre los marcadores AFLP de inestabilidad híbrida identificamos alguno que mostraron homología únicamente con ADN de *D. mojavensis*, otros con ADN repetitivo y un pequeño número con ADN exógeno, especialmente ADN bacteriano.

Aquellos marcadores de inestabilidad que tuvieron homología con ADN de *Drosophila*, son fragmento de ADN que proceden de las especies parentales, probablemente se originaron por una mutación puntual que añadió o suprimió una

diana de restricción en el genoma de los híbridos. Estos marcadores tienen homología con regiones de genes ó regiones de scaffolds del genoma de *Drosophila*, específicamente de la especie *D. mojavensis*, con una excepción en la cual la referencia es *D. melanogaster*. La gran mayoría de genes detectados a través de estos marcadores de inestabilidad producen algún transcrito, sin embargo se desconoce la función de la mayoría de ellos. En el caso de los scaffolds, estos no han sido asignados a ningún cromosoma de *D. mojavensis* por lo tanto se desconoce su localización cromosómica. En los híbridos HR1, HR2 y HR3 se observaron 40 marcadores (de un total de 72 marcadores de inestabilidad) que tienen homología con ADN de *Drosophila*. Sin embargo en los híbridos segmentales e híbridos HR3 externos se observó un marcador y ninguno respectivamente. En las especies parentales, en cambio, la mayor parte de marcadores de inestabilidad tuvieron homología con ADN de *Drosophila*, por ejemplo en *D. buzzatii* 4 marcadores (de un total de 6) y en *D. koepferae* 3 marcadores (de un total de 4).

La presencia de marcadores de inestabilidad que tuvieron homología con ETs se explica por la capacidad de movilización de los ETs, lo cual les permite dar origen a nuevas bandas o patrones de bandeo de AFLP ya sea por inserción o escisión. Cuando un ET se moviliza, la nueva inserción puede originar una nueva banda de mayor tamaño, si en cambio se produce una excisión del elemento, el tamaño de la banda será menor y en ambos casos los sitios de restricción se mantendrían intactos. Del total de marcadores de inestabilidad (72 marcadores), el 32% corresponde a marcadores de transposición en las tres generaciones de híbridos, mientras que en los híbridos segmentales y los híbridos HR3 externos representan el 90% y 60% respectivamente. Este alto porcentaje de inestabilidad asociada a ETs observada en los híbridos contrasta con lo observado en las especies parentales, en las cuales tan solo un 16% estaría asociada a ETs en *D. buzzatii*, mientras que *D. koepferae* no presentó marcadores de inestabilidad asociados a ETs. Los altos porcentajes de inestabilidad asociada a ETs en los híbridos, frente a la baja presencia de estos marcadores en las especies parentales sugieren que en el genoma de los híbridos la movilización de los ETs genera una reorganización de estos genomas.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio sobre la inestabilidad de los híbridos naturales del género *Amaranthus* usando AFLPs, en dicho estudio también se detectaron marcadores AFLP únicos del genoma de los

híbridos y ausentes en los parentales. Al igual que en el presente estudio, los marcadores específicos de los híbridos de *Amaranthus* presentaron homología con ETs y la inestabilidad generada en los híbridos ha sido asignada a la movilización de ADN repetitivo (Steinau *et al.*, 2003).

La posibilidad de detectar nuevas inserciones a través de los marcadores AFLP convierte a esta técnica en una herramienta eficaz para comparar los genomas y detectar eventos de transposición, esta característica de los AFLP ha sido comprobada y explotada en este estudio. Los resultados sobre la aplicación de los AFLPs en la detección de eventos de transposición y en la identificación de ETs fue objeto de una publicación científica (anexo 50)(Vela *et al.*, 2011).

Por otro lado, cabe mencionar un estudio previo realizado por Morán (Morán, 2009) con marcadores AFLP en híbridos interespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* el cual tenía como objetivo localizar factores genéticos que estuvieran relacionados con la fertilidad. Este estudio se centró en el análisis de los marcadores especie-específicos de *D. koepferae* introgresados en el genoma híbrido. Demostró que ningún marcador procedente del genoma de *D. koepferae* (32 marcadores) tuvo homología con secuencias de ADN repetitivo. Este hecho da mayor relevancia a los resultados de esta tesis, pues confirman que los ETs están asociados específicamente con la inestabilidad originada *de novo* (bandas H) en el genoma de los híbridos y es una característica del genoma híbrido

La comparación de la inestabilidad inducida por transposición entre los híbridos y en las especies parentales. evidencia que existen diferencias significativas entre ambos grupos, por tanto el alto número de marcadores AFLP de inestabilidad por transposición observados en el genoma de los híbridos indicaría que hay un incremento de la inestabilidad por efecto de la movilización de los ET en el genoma híbridos y que este incremento es estadísticamente significativo ($P = 0,045$). Sin embargo parecería que la inestabilidad se incrementa de forma más evidente en unas familias más que en otras, siendo la familia 40 la que presenta diferencias significativas respecto a las especies parentales. Este incremento diferencial de la inestabilidad por transposición en las familias puede deberse a que los marcadores de inestabilidad segregan en determinados híbridos y no están distribuidos uniformemente lo cual puede ser comparable a lo observado en las explosiones de transposición, las cuales ocurren solo en determinados individuos, como se ha observado anteriormente con el elemento *Oswaldo* en el genoma de los

híbridos interespecíficos de estas mismas especies (Labrador *et al.*, 1999). Todo esto indica que el incremento de la inestabilidad en los híbridos podría generar una reorganización del genoma en algunos híbridos por efecto de la movilización de los ETs.

4.2 Inestabilidad híbrida inducida por transposición

El estudio de los híbridos, sobretodo en plantas, pero también en algunos insectos y mamíferos ha producido mucha información en la que se asocia la actividad de los ETs a la inestabilidad generada en los híbridos apoyando la idea de que los ETs tienen un papel fundamental en los procesos biológicos. Sin embargo algunos estudios han cuestionado esta relevancia de los ETs debido a los resultados negativos de diversos experimentos (Coyne, 1986; Coyne, 1989) en los que no se observó la movilización de los ETs en el genoma de los híbridos. Sin embargo, evidencia indirecta de la activación de los ETs ha sido revelada en diversos estudios con poliploides, en los que se han mostrado alteraciones en la metilación, incremento de la transcripción de algunos ETs, silenciamiento de genes y activación de ETs por efecto de la desmetilación (Fontdevila, 2011). Los primeros indicios que asociaban la inestabilidad de los híbridos con la actividad de los ETs se reportaron en híbridos de *Chironomus*, los cuales presentaron un fenómeno similar a la disgénesis híbrida (Engels & Preston, 1979; Sved, 1979) causada por elementos *Cla* (Schmidt, 1984). Sin embargo, el primer estudio que aportó datos cuantitativos sobre el incremento de la transposición en los híbridos se realizó con híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* en los que la tasa de transposición del retrotransposón *Oswaldo* (10^{-2}) fue un grado de magnitud más alta en los híbridos que en las especies parentales (Labrador *et al.*, 1999).

A estos datos se han añadido paulatinamente observaciones con híbridos sintéticos (Madlung *et al.*, 2005) e híbridos naturales (Salmon *et al.*, 2005), las cuales corroboran que en el genoma de los híbridos se produce movilización de los ETs. En el presente estudio de inestabilidad genómica de los híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* se muestra que un porcentaje representativo de los marcadores de inestabilidad en los híbridos (un 16 % en los híbridos HR1 y hasta 90 % en los híbridos segmentales) está asociada a ETs, observándose un mayor incremento en la tercera generación y en los híbridos segmentales. En las especies parentales, en cambio apenas un solo marcador fue asociado al elemento *Helena*. Un total de 39 marcadores de inestabilidad híbrida (tabla 19) permitió la

identificación de 34 ETs que se movilizan generando inestabilidad en el genoma de los híbridos. Estos elementos son representantes de 14 familias o superfamilias de ETs tanto de clase I como de clase II. Los ETs de clase I pertenecen a 9 familias o superfamilias: *LOA*, *BEL-PAO*, *jockey*, *circe*, *copia*, *gypsy*, *Mini-me*, *R2* y *TRIM*. Entre los seis ETs de clase II identificamos miembros de 5 familias: *P*, *helitron*, *hAT*, *Transib* y *mariner*.

La inestabilidad inducida por ETs en los híbridos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* sugiere que hay una movilización de los ETs en las generaciones tempranas, lo que concuerda con las observaciones en *Arabidopsis* (Madlung *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que en la primera generación de retrocruzamiento (HR1) el choque y la introgresión de los genomas parentales genera el nivel más alto de inestabilidad en los híbridos. En los siguientes retrocruzamientos (HR2 y HR3) se introduce gradualmente genoma de *D. buzzatii* a través del macho parental, produciendo una disminución de la introgresión y probablemente de la inestabilidad generada en la línea somática. Esta purga de marcadores de inestabilidad de la línea somática permite visualizar en la generación HR3 la inestabilidad producida por la movilización de ETs (13 marcadores de inestabilidad por transposición) en la línea germinal, la cual probablemente ha sido fijada en el genoma de los híbridos.

Las cepas BU28 de *D. buzzatii* y KO2 de *D. koepferae*, son cepas que han sido mantenidas durante años en las mismas condiciones de crecimiento (humedad, temperatura, fotoperíodo y alimentación), no han sido expuestas a estímulos de estrés externos o ambientales, además son cepas homocigóticas y por tanto presentan homogeneidad genética. La consanguinidad de las cepas no tiene efecto sobre la movilización de ETs, como se ha comprobado en anteriores estudios con el retrotransposon *Oswaldo* (Labrador & Fontdevila, 1994; Labrador *et al.*, 1999). Una vez descartados todos los estímulos que pudieran alterar la estabilidad genómica en los híbridos, los resultados observados con los marcadores de inestabilidad indican que la inestabilidad híbrida es desencadenada como consecuencia del estrés genómico en los cruzamientos interespecíficos, es decir como consecuencia de la hibridación.

La inestabilidad cromosómica observada anteriormente junto con la inestabilidad genómica observada en este estudio, muestran una visión general de la inestabilidad que se genera en el genoma híbrido debida a la hibridación y

confirman que uno de los factores productores de la inestabilidad observada es la movilización ETs. A diferencia de los estudios anteriores, en los cuales la inestabilidad híbrida fue asociada a un elemento transponible, los resultados del presente estudio sacan a la luz 34 ETs que se movilizan en el genoma híbrido debido al estrés genómico. Es probable que la cifra de elementos que se movilizan sea mayor, sin embargo la cantidad de elementos que se han identificado en este estudio podrían constituir una muestra importante (14 familias) de los elementos que estarían integrando el genoma de *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

4.3 Transposición de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* en los híbridos interespecíficos

La técnica de hibridación *in situ*, usada tradicionalmente en el estudio de las tasas de transposición (Labrador & Fontdevila, 1994; Vieira & Biémont, 1997) permite localizar precisamente copias eucromáticas en los brazos de los cromosomas politénicos de *Drosophila* y además no permite distinguir copias insertas a nivel de la misma banda cromosómica. Sin embargo, el estudio de la transposición a través de la técnica del transposon display presenta la ventaja de permitir cuantificar las inserciones presentes en todo el genoma, tanto eucromáticas como heterocromáticas así como la discriminación de inserciones localizadas dentro de la misma región cromosómica. Por tanto, las tasas de transposición de los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo*, estimadas con el transposon display son más precisas porque permiten cuantificar la movilización en el conjunto de las regiones del genoma.

Ya que los ETs pueden crear nuevas inserciones por transposición y por recombinación ectópica, es posible que alguna de las nuevas inserciones sea originada por este último mecanismo que también genera inestabilidad en el genoma de *Drosophila*. El efecto de la recombinación ectópica ha sido puesto de manifiesto en experimentos de laboratorio de *D. melanogaster* que presentan el cromosoma X inestable, donde la recombinación ectópica del elemento *hobo* producía rearrreglos cromosómicos y gran cantidad de mutaciones recurrentes (Sheen *et al.*, 1993). En la especie *D. buzzatii* se determinó que algunas inversiones naturales se habían formado tras la recombinación ectópica del elemento *Galileo* (Casals *et al.*, 2003; Cáceres *et al.*, 1999). En el presente estudio hemos asumido que las nuevas inserciones observadas por el transposon display obedecen a nuevas copias originadas por la movilización de cada uno de los elementos

analizados (*Oswaldo*, *Helena* y *Galileo*). Si el efecto de la recombinación ectópica fuese importante deberíamos observar sus efectos también en las especies parentales. Sin embargo, en estas especies observamos que el patrón de bandas es bastante constante. Además *D. koepferae* no presenta copias del elemento *Oswaldo* en los brazos cromosómicos mediante hibridación *in situ* y sin embargo parece ser el elemento que más se moviliza en los híbridos. Sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que alguna de las nuevas inserciones sea originada por recombinación y no por transposición. Por otro lado, la comparación de los datos obtenidos por FISH y por el transposon display, permitieron deducir que la mayor parte de las inserciones de *Oswaldo* *Helena* y *Galileo* se encuentran en la heterocromatina, región en la que hay baja frecuencia de recombinación ectópica. Por tanto las posibilidades de que las nuevas inserciones ocurran por este mecanismo son menores.

El incremento de las tasas de transposición en los híbridos es un indicio más de que el estrés genómico induce a la movilización de los ETs, nuestras observaciones indican que los tres ETs se movilizan a una tasa de transposición de 10^{-2} en la primera generación y va decreciendo en las siguientes generaciones (excepto en *Oswaldo*) a medida que los mecanismos de control del hospedero son activados para mantener silenciados a los ETs, una vez pasado el shock genómico de la hibridación. En este estudio observamos que algunas familias de híbridos alcanzan tasas de transposición de 10^{-2} , mientras que en *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan tasas de transposición de 10^{-3} y cero respectivamente. En otros experimentos con poblaciones naturales, las tasas de transposición espontánea estimadas para varios ETs de *Drosophila* están en el rango de 10^{-4} (Suh *et al.*, 1995) y las tasas de inserción y escisión están en un rango de 10^{-3} y 10^{-5} respectivamente. Por tanto, las tasas de transposición observadas en este estudio son anormalmente altas, corroborando que hay incremento de la movilización de los ETs, lo cual sería una causa directa del incremento de la inestabilidad observada en el genoma de los híbridos.

4.3.1 Transposición del retrotransposon *Oswaldo*

Estudios previos realizados mediante hibridación *in situ* del elemento *Oswaldo*, reportaron en *D. buzzatii* ocho inserciones eucromáticas y cuatro en *D. koepferae*, así como señales de hibridación centroméricas en ambas especies (Labrador & Fontdevila, 1994). Nuestros resultados de hibridación FISH muestran la

presencia de cuatro inserciones eucromáticas en la cepa Bu28 de *D. buzzatii* y ninguna en la cepa KO2 de *D. koepferae*. En el genoma de los híbridos la movilización de *Oswaldo* ha sido observada tanto a través de los marcadores AFLP como por el transposon display. Los resultados del transposon display indican, la presencia de 35 a 40 inserciones de este elemento en *D. buzzatii* y de 34 a 39 inserciones en *D. koepferae*. En las familias de híbridos interespecíficos las inserciones de *Oswaldo* visualizadas oscilan entre 37 y 49, dependiendo de la familia. El alto número de inserciones observadas por el transposon display en ambas especies parentales contrasta con las pocas inserciones eucromáticas observadas en los brazos de los cromosomas politénicos, de ello se deduce que la mayor parte de las inserciones de *Oswaldo* se encuentran en la heterocromatina.

La tasa de transposición de *Oswaldo* estimadas para cada una de las familias de híbridos en la generación HR3 muestran un incremento de un grado de magnitud respecto a las especies parentales, este incremento es estadísticamente significativo lo que indica que el retrotransposon *Oswaldo* se moviliza más en el genoma de los híbridos que en el genoma de las especies parentales. Estos datos coinciden con las estimas realizadas anteriormente, en ambos casos en los híbridos se produce un incremento (10^{-2}) de la transposición de *Oswaldo*, mientras que en las especies parentales se mantienen los niveles bajos de transposición (10^{-3}).

En todas las familias de híbridos interespecíficos, se observa que el incremento de la transposición en las tres generaciones es de 10^{-2} , excepto en la familia 13, que es de 10^{-3} , a pesar de ello, en esta familia la tasa de transposición es muy superior a la de *D. buzzatii*. Debido a que los eventos de transposición y reorganización del genoma ocurren en determinados híbridos, la descendencia de estos tiene mayor probabilidad de heredar estos cambios y pasarlos a la siguiente generación, esto explicaría que tres familias de híbridos incrementaran su tasa de transposición en las tres generaciones, mientras que la familia 3 mantiene la estabilidad genómica inicial, probablemente en el primer cruzamiento la transposición fue muy baja y así se ha mantenido en las siguientes generaciones.

4.3.2 Transposición del retroposon Helena

Mediante hibridación FISH de una región de la endonucleasa de *Helena* en los cromosomas politénicos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* se determinó la presencia de 5 y 12 copias respectivamente en los brazos de los cromosomas politénicos.

Adicionalmente la hibridación FISH en cromosomas politénicos de los híbridos segmentales F3-F4 mostró la presencia de 7 inserciones del retroposon *Helena*, de las cuales tres (2E3, 3F4, 5G1) pertenecían exclusivamente a los híbridos segmentales. Debido a que los híbridos segmentales se originan de un cruzamiento interespecífico, las observaciones del elemento *Helena* ponen de manifiesto que eventos de transposición pueden haber ocurrido como producto del cruzamiento interespecífico y que posteriormente estas nuevas inserciones fueron fijadas en estos híbridos durante los retrocruzamientos.

En el caso del elemento *Helena* las tasas de transposición en la generación de híbridos HR3 son del mismo orden de magnitud (10^{-3}) en todas las familias al igual que en *D. buzzatii*. Sin embargo en la generación R1 hay dos familias (10 y 13) y en la generación R2 una familia (1) que presentan un incremento de la tasa de transposición de un orden de magnitud (10^{-2}) respecto a *D. buzzatii*. Esta observación podría sugerir que en el caso de este elemento pueden existir mecanismos epigenéticos que lo controlan los cuales se relajan en los híbridos permitiendo la proliferación del elemento en las generaciones tempranas, pero son activados paulatinamente debido a la introducción de genoma de *D. buzzatii* hasta que el elemento es controlado tal y como se observa en la generación R3 donde se produce una disminución de la transposición.

Estudios del retroposon *Helena* en el genoma de las 12 especies de *Drosophila* han permitido observar que en la mayoría de especies este elemento presenta el extremo 5' inestable y numerosas deleciones internas, esta es la razón por la que analizamos el extremo 3' en el experimento con la técnica del transposon display. Algo interesante es que únicamente en dos especies *D. simulans* y *D. mojavensis* se ha observado transcripción de *Helena* por lo tanto se considera que está activo (Granzoto et al., 2009). Acorde con estas observaciones, nuestros resultados obtenidos tanto con los marcadores AFLP, las inserciones observadas mediante FISH, las estimas de las tasas de transposición y las amplificaciones por RT-PCR indican que en *D. buzzatii* y *D. koepferae* el elemento *Helena* está activo y tiene la capacidad para movilizarse creando nuevas inserciones como se ha observado en el genoma de los híbridos.

4.3.3 Transposición del transposon Galileo

Para el transposon *Galileo* existen reportes de observaciones basadas en varias cepas de *D. buzzatii*, en las que por southern blot se observó un promedio de 26.7 inserciones (Casals *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran tan solo 2 inserciones por FISH y con el transposon display se han observado de 40 a 43 inserciones en *D. buzzatii* y de 42 a 45 en *D. koepferae*, mientras en los híbridos interespecíficos el rango es más amplio contabilizándose de 32 a 56 inserciones de este elemento. Las diferencias en el número de inserciones reportadas anteriormente y las observaciones del presente estudio probablemente se deben a que en cada estudio se utilizaron cepas diferentes y además el gran número de inserciones que hemos visualizados se encuentran en la heterocromatina.

Las tasas de transposición estimadas para el transposon *Galileo* son del orden de 10^{-4} y 10^{-3} en la generación R3 de híbridos, mientras que en las especies parentales no se observaron nuevas inserciones. Únicamente en la generación R1, dos familias (1 y 40) presentan tasas de transposición de 10^{-2} . Este incremento de la transposición en la generación R1 y las inserciones nuevas de *Galileo* observadas en todas las generaciones pueden tener varias explicaciones.

Primero, *Galileo* es un transposon del tipo foldback, el cual presenta TIRs largas que flanquean la región interna que codifica para una transposasa (Marzo *et al.*, 2008). La presencia de TIRs largas podría conferirle a este tipo de elementos mayor capacidad de recombinar con copias no alelicas, por tanto hay una posibilidad de que las nuevas inserciones observadas se originen por recombinación ectópica de las TIRs de *Galileo*.

Segundo, al igual que en el marcador TGATT27 (HR3), en varios scaffolds del genoma de *D. mojavensis*, *Galileo* se encuentran con frecuencia junto a otros ETs. Adicionalmente, alrededor del 90% de fragmentos amplificados en el transposon display de *Galileo* son secuencias genómicas que contienen una región de *Galileo* y otra de otro ET (datos no incluidos en este estudio). Esto sugiere que fragmentos de *Galileo* pueden estar insertados dentro de otros elementos de diferente familia y/o clase, por tanto *Galileo* ó fragmentos de éste elemento podrían movilizarse de forma pasiva ya sea utilizando la maquinaria de transposición de los elementos cercanos ó por la movilización de los elementos en los cuales se encuentra inserto.

Tercero, podemos casi descartar la posibilidad de que *Galileo* se movilice de forma autónoma, además debido a que no se han detectado transcritos de la transposasa de este elemento en las cepas parentales *D. buzzatii* y *D. koepferae*, se podría decir que es un elemento con una actividad pasiva y por tanto no transpone de forma autónoma en el genoma de *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, pensamos que las nuevas inserciones de *Galileo* y el incremento de la tasa de transposición en R1 se debe a la movilización indirecta de *Galileo* a través de otros elementos en los cuales *Galileo* se encuentra inserto, por tanto el incremento de la transposición obedecería a la transposición de todos aquellos elementos que incluyan *Galileo*, aunque no podemos determinar cuáles ni cuántos son.

4.4 Reorganización del genoma en los híbridos

La gran cantidad de las copias de *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* que hemos observado por el transposon display indican que hay una acumulación de inserciones de los ETs en la heterocromatina, hecho que también ha sido observado en *D. melanogaster* (Bergman et al., 2006) y en *D. buzzatii* (Casals et al., 2006) especies en las cuales la densidad de ETs es más alta en regiones de baja frecuencia de recombinación como la heterocromatina y donde los ETs se encuentran controlados por mecanismos como la metilación de las histonas. Algunos investigadores (Biémont, 2010; Finnegan, 2011; Pimpinelli et al., 1995) creen que la alta concentración de ETs en la heterocromatina convierte a esta región en una fuente del genoma con potencial para generar cambios a nivel genómico que en algunos casos pueden crear barreras de aislamiento promoviendo la divergencia evolutiva y la especiación.

En algunos casos la variabilidad genómica generada por la movilización de los ETs puede alterar las funciones génicas con efectos negativos para el hospedador. Por ello el organismo hospedador mantiene activados mecanismos de silenciamiento o control de los ETs, los cuales se relajan en situaciones de estrés como los cruzamientos. La supresión momentánea de estos mecanismos de control, permite que los ETs se movilicen y se integren en nuevas posiciones del genoma. Este escenario ha sido recreado en el genoma de los híbridos interespecíficos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en los cuales hemos observado inestabilidad genómica y explosiones de transposición en determinados híbridos.

La manera en la que operan los mecanismos de control epigenético es un área que está aún en proceso de descubrimiento. Dilucidar estos mecanismos en el genoma de los híbridos es aún más complicado, sin embargo es probable que en los híbridos interespecíficos ocurra algo comparable a lo que sucede en los cruces disgénicos, donde la progenie de los cruzamientos de machos que portan un ET y hembras que no lo portan presentan esterilidad asociada a la movilización de ETs, mientras que en el cruzamiento recíproco la progenie es normal. La activación de los ETs en estos cruzamientos se ha asociado a la falta de piRNAs de herencia materna. Esto podría explicar la movilización de algunos de los 34 ETs en el genoma de los híbridos. Aunque se ha observado que cada familia de ETs tiene diferentes mecanismos de control, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes (Petrov *et al.*, 2003) lo que podría indicar que los piRNAs de elementos de la misma familia pueden controlar la actividad de varios elementos como se ha observado para *gypsy*, *zam* e *Idefix* (Mevel-Ninio *et al.*, 2007). Esta observación nos permite suponer que en los híbridos, aunque inicialmente un ET podría mobilizarse por falta de un piRNA específico, después del shock genómico puede ser controlado por un piRNA de otro elemento de la familia, esto ocurriría si los piRNAs presentes tienen secuencias homólogas al nuevo ET, al que se unirían para cortarlo. La dinámica de la transposición de *Helena* en las tres generaciones de híbridos podría estar dirigida por un mecanismo similar al descrito, de ahí que la transposición de *Helena* en HR1 sea alta (10^{-2}) y en la generación HR3 disminuya significativamente (10^{-3}). En el caso de *Osvaldo* la tasa de transposición es alta en las tres generaciones, aunque no en todas las familias. Aunque *Osvaldo* y *Helena* son elementos de clase I y ambos son elementos activos, los mecanismos que controlan la actividad de cada uno, al parecer son muy diferentes y podrían estar relacionados con las características estructurales y la actividad transcripcional del elemento.

La movilización de una gran cantidad de ETs observada en el genoma de los híbridos es una muestra de la reestructuración que sufre el genoma híbrido, lo cual es comparable con las observaciones en híbridos marsupiales (Metcalf *et al.*, 2007; O'Neill *et al.*, 1998) en los cuales la inestabilidad híbrida incluye cambios en la estructura de la cromatina, rearrreglos cromosómicos y amplificación de ETs lo cual podría ser explicado por la falta de compatibilidad entre los RNAi o por la hipometilación del ADN en los híbridos, estado que permitiría la movilización de ETs. Mecanismos similares como la metilación H3K9 y los RNAi controlan en *Drosophila* la estabilidad de las regiones asociadas con ADN repetitivo (Peng &

Karpen, 2008), por tanto la metilación de las histonas parecería ser otro mecanismo que controla a nivel transcripcional a los ETs y que se relaja en los híbridos, permitiendo la movilización de los ETs.

Por otro lado, es probable que el alto número de ETs movilizado en los híbridos sea una señal de que ocurren explosiones de transposición en el genoma híbrido, como se ha observado en otros estudios y donde se menciona que las explosiones de transposición de ETs puede conducir a una macroevolución (véase Rebollo *et al.*, 2010). Estas explosiones de transposición llevan a una rápida reestructuración genómica que puede producir aislamiento reproductivo (Fontdevila, 2005). En determinados híbridos de las familias analizadas se observaron estas explosiones de transposición por la acumulación de nuevas inserciones, sin embargo cada uno de los elementos analizados presentó estas explosiones de transposición en una generación diferente, así *Oswaldo* produce explosiones de transposición en las tres generaciones, mientras que *Helena* y *Galileo* únicamente en la primera generación de retrocruzamiento.

La idea de que los ETs pueden ser conductores de procesos biológicos y de especiación fue planteada desde su descubrimiento, incluso se ha desarrollado un modelo matemático de especiación por transposición (Lev, 1984) y diversas son las especies, especialmente de plantas, a las que se ha asignado un origen híbrido (Borgen *et al.*, 2003). Sin embargo, los procesos que podrían haber generado esta divergencia son desconocidos y uno de los factores a los que probablemente se ha dado poca importancia son los ET. Los resultados del presente trabajo en donde se ha mostrado un alto porcentaje de inestabilidad generada por la movilización de varios ETs y la evidente reorganización del genoma híbrido, refuerzan el papel que tienen los ETs como generadores de variabilidad genómica y su importancia dentro de los mecanismos de aislamiento y divergencia.

5 CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares AFLP han demostrado ser una herramienta confiable en el estudio del genoma híbrido. En el presente caso han permitido identificar la inestabilidad genómica a través de marcadores que segregan *de novo* en el genoma de los híbridos, estos marcadores han sido denominados marcadores de inestabilidad híbrida.

El estrés genómico producido en los híbridos genera un incremento de la inestabilidad respecto a las especies parentales cuyas diferencias son estadísticamente significativas.

El estudio de la inestabilidad híbrida ha demostrado que hasta un 90% de ésta, puede estar asociada a la movilización de los elementos transponibles, por tanto los elementos transponibles serían uno de los principales factores en la génesis de la inestabilidad híbrida.

Por primera vez se asocia de forma directa la inestabilidad del genoma de los híbridos con la presencia y movilización de, al menos, 34 elementos transponibles pertenecientes a 14 familias tanto de clase I como de clase II. Esta inestabilidad no es observada en las especies parentales, en una de las cuales (*D. buzzatii*) se moviliza solo un elemento y en la otra (*D. koepferae*) no hay movilización.

El aumento de la inestabilidad híbrida inducida por transposición también es estadísticamente significativo siendo, de un orden de magnitud superior en los híbridos respecto a las especies parentales.

Los elementos *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* tienen una dinámica de transposición diferente en el genoma híbrido, lo que nos hace pensar que los mecanismos de control para cada uno de ellos son diferentes. Mientras *Oswaldo* incrementa su movilización en las tres generaciones de híbridos, *Helena* y *Galileo* se movilizan preferentemente en la primera generación de retrocruce.

La presencia en el genoma de copias activas de elementos autónomos incrementaría la probabilidad de que otros elementos no autónomos puedan movilizarse. Este puede ser el caso del transposon *Galileo* el cual no transcribe su transposasa y por tanto no podría movilizarse de forma autónoma.

La cantidad de inserciones eucromáticas y heterocromáticas observadas por FISH y por transposon display, revelan una acumulación de inserciones en la heterocromatina. Esta región podría albergar copias activas de los elementos que hemos observado movilizarse.

El estrés genómico que sufre el genoma híbrido debido al choque de los genomas parentales podría relajar los mecanismos epigenéticos que controlan los elementos transponibles permitiendo la movilización de éstos en el genoma de los híbridos.

El análisis cualitativo a través de marcadores AFLP con el cual se ha observado la movilización de 34 elementos transponibles y el análisis cuantitativo de las tasas de transposición de *Oswaldo*, *Helena* y *Galileo* muestran con claridad la inestabilidad del genoma híbrido inducida por la transposición. Esto indica que en el genoma híbrido los elementos transponibles pueden generar una reorganización genómica que en algunos casos podría incrementar la aptitud biológica de determinados híbridos promoviendo la creación de barreras de aislamiento reproductivo. Este escenario podría ser propicio para el inicio de un proceso de divergencia en el cual los elementos transponibles jueguen un papel crucial, como ha sido propuesto tantas veces.

Bibliografía

- Althoff, D., Gitzendanner, M., & Segraves, K. (2007). The Utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in Phylogenetics: A Comparison of Homology within and between Genome. *Systematic Biology*, *56*(3), 477-484.
- Arnault, C., Heizmann, A., Loevenbruck, C., & Biémont, C. (1991). Environmental stresses and mobilization of transposable elements in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, *248*, 51-60.
- Arnault, C., & Dufournel, I. (1994). Genome and stresses: reactions against aggressions, behavior of transposable elements. *Genetica*, *93*(1-3), 149-160.
- Arnault, C., Loevenbruck, C., & Biémont, C. (1997). Transposable element mobilization is not induced by heat shocks in *Drosophila melanogaster*. *Naturwissenschaften*, *84*(9), 410-414.
- Arnold, M. (2006). *Evolution through genetic exchange*. Oxford University Press, 252p.
- Arnold, M. L. (2004). Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: Were Anderson and Stebbins right? *The Plant Cell*, *16*, 562-570.
- Arnold, M., & Hodges, S. (2007). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology & Evolution*, *10*(2), 67-71.
- Barbash, D. (2010). Ninety Years of *Drosophila melanogaster* Hybrids. *Genetics*, *186*(1), 1-8.
- Barker, J. (1981). *Selection at allozyme loci in cactophilic Drosophila*. Genetic Studies of *Drosophila* Populations. Proceedings of the 1979 Kiola Conference, 161-184.
- Bennetzen, J. (2005). Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Current Opinion in Genetics & Development*. *Genomes and evolution*, *15*(6), 621-627.

- Bensch, S., & Akesson, M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, *14*(10), 2899-2914.
- Bergman, C., Quesneville, H., Anxolabehere, D., & Ashburner, M. (2006). Recurrent insertion and duplication generate networks of transposable element sequences in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biology*, *7*(11), R112.
- Biémont, C., Ronsseray, S., Anxolabehere, D., Izabel, H., & Gautier, C. (1990). Localization of P-elements, copy number regulation, and cytotype determination in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, *56*, 3-14.
- Biémont, C. (2010). From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us? *Heredity*, *105*(1), 1-3.
- Biémont, C., & Cizeron, G. (1999). Distribution of transposable elements in *Drosophila* specie. *Genetica*, *105*(1), 43-62.
- Biémont, C., & Vieira, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, *443*(7111), 521-524.
- Blesa, D., Gandia, M., & Martinez-Sebastian, M. J. (2001). Distribution of the bilbo Non-LTR Retrotransposon in Drosophilidae and its Evolution in the *Drosophila obscura* Species Group. *Mol. Biol. Evol.*, *18*(4), 585-592.
- Bonin, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2005). Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. *Methods in Enzymology*, *395*, 145-161.
- Borgen, L., Leitch, I., & Santos-Guerra, A. (2003). Genome organization in diploid hybrid species of *Argyranthemum* (Asteraceae) in the Canary Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *141*(4), 491-501.
- Bowen, N., & Jordan, K. (2002). Transposable Elements and Eukaryotic Complexity. *Curr. Issues Mol. Biol.*, *4*, 65-76.

- Burke, J. M., & Arnold, M. L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics*, *35*, 31-52.
- Cáceres, M., Puig, M., & Ruiz, A. (2001). Molecular Characterization of Two Natural Hotspots in the *Drosophila buzzatii* Genome Induced by Transposon Insertions. *Genome Res.* *11*(8), 1353-1364.
- Cáceres, M., Ranz, J. M., Barbadilla, A., Long, M., & Ruiz, A. (1999). Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science*, *285*(5426), 415-418.
- Carreira, V., Soto, I., Fanara, J., & Hasson, E. (2008). A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica*, *133*, 1-11.
- Carson, H. L., Nair, P. S., & Sene, F. M. (1975). *Drosophila* hybrids in nature: proof of gene exchange between sympatric species *Science* (New York, N.Y.), *189*(4205), 806-807.
- Carson, H., & Wasserman, M. (1965). A widespread chromosomal polymorphism in a widespread species, *Drosophila buzzatii*. *Am. Natur.*, *XCIX*, 111-115.
- Casals, F., Cáceres, M., & Ruiz, A. (2003). The Foldback-like Transposon Galileo Is Involved in the Generation of Two Different Natural Chromosomal Inversions of *Drosophila buzzatii*. *Mol Biol Evol*, *20*(5), 674-685.
- Casals, F., González, J., & Ruiz, A. (2006). Abundance and chromosomal distribution of six *Drosophila buzzatii* transposons: BuT1, BuT2, BuT3, BuT4, BuT5, and BuT6. *Chromosoma*,
- Casals, F., Cáceres, M., Manfrin, M. H., González, J., & Ruiz, A. (2005). Molecular characterization and chromosomal distribution of *Galileo*, *Kepler* and *Newton*, three foldback transposable elements of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Genetics*, *169*(4), 2047-2059.

- Casteleyn, G., Adams, N. G., Vanormelingen, P., Debeer, A. E., Sabbe, K., & Vyverman, W. (2009). Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence *Protist*, *160*(2), 343-354.
- Chenuil, A. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, *127*(1-3), 101-120.
- Cizeron, G., Lemeunier, F., Loevenbruck, C., Brehm, A., & Biemont, C. (1998). Distribution of the retrotransposable element *412* in *Drosophila* species. *Mol. Biol. Evol.*, *15*(2), 1589-1599.
- Clark, A., Eisen, M., Douglas R. Smith, D., Bergman, C., Oliver, B., Markow, T., *et al.* (2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, *450*, 203-218.
- Coyne, J. (1989). Mutation rates in hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Heredity*, *63*, 155-162.
- Coyne, J. A. (1986). Meiotic segregation and male recombination in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Genetics*, *114*, 485-494.
- Davis, R. L. (1996). Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol. Rev.*, *76*, 299-317.
- de Almeida, L. M., & Carareto, C. M. A. (2004). Identification of two subfamilies of *micropia* transposable element in species of the *repleta* group of *Drosophila*. *Genetica*, *121*(2), 155-164.
- de Almeida, L. M., & Carareto, C. M. (2005). Multiple events of horizontal transfer of the Minos transposable element between *Drosophila* species *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *35*(3), 583-594.

- Despres, L., Gielly, L., Redoutet, B., & Taberlet, P. (2003). Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *27*(2), 185-196.
- Ding, Y., Wang, X., Su, L., JiXian Zhai, J., Cao, S., Zhang, D., *et al.* (2007). SDG714, a Histone H3K9 Methyltransferase, Is Involved in *Tos17* DNA Methylation and Transposition in Rice. *Plant Cell*, *19*(1), 9-22.
- Diniz, N., & Sene, F. (2004). Chromosomal phylogeny of the *Drosophila fasciola* species subgroup revisited (Diptera, Drosophilidae). *Genet. Mol. Biol*, *27*, 561-566.
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2006). Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, *108*(4), 414-422.
- Dobzhansky, T. (1936). Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics*, *21*, 113-135.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Doolittle, F., & Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, *284*, 601-603.
- Ebbs, M., & Bender, J. (2006). Locus-Specific Control of DNA Methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 Histone Methyltransferase. *The Plant Cell*, *18*, 1166-1176.
- Engels, W. R., & Preston, C. R. (1979). Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the biology of female and male sterility. *Genetics*, *92*(1), 161-174.
- Evgen'ev, M. B. (2007). Mobile elements and genome evolution *Molecular Biology*, *41*(2), 203-213.

- Fanara, J., Fontdevila, A., & Hasson, E. (1999). Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evolutionary Ecology*, *13*, 173-190.
- Finnegan, D. (2011). Oogenesis: Active Heterochromatin. *Current Biology*, *21*(16), 30-32.
- Fontdevila, A. (1982). Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. II How much has chromosomal polymorphism changed in colonization? *Evolution*, *36*(4), 843-851.
- Fontdevila, A. (2011). *The dynamic genome. A darwinian approach*. Oxford University Press, 203p.
- Fontdevila, A., Pla, C., Hasson, E., & Wasserman, M. (1988). *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera:Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, *81*, 380-385.
- Fontdevila, A., & Wasserman, M. (1982). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetic relationships between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics*, *101*, 503-518.
- Fontdevila, A. (2005). Hybrid genome evolution by transposition. *Cytogenetic and Genome Research*, *110*(1-4), 49-55.
- Francino, O., & Cabre, O. (1993). Characterization of copia element from *Drosophila koepferae*. *Int. Congr. Genet.*, *17* 194.
- García Guerreiro, M. P., & Fontdevila, A. (2007). Molecular characterization and genomic distribution of *Isis*: a new retrotransposon of *Drosophila buzzatii*. *Mol Genet Genomics*, *277*(1), 83-95.
- García Guerreiro, M. P. (2011). What make transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity*, 1-8.

- García Guerreiro, M. P., & Fontdevila, A. (2001). Chromosomal distribution of the transposable elements *Oswaldo* and *blanco* in original and colonizer populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet. Res.*, *77*(3), 227-238.
- García Guerreiro, M. P., & Fontdevila, A. (2011). *Oswaldo* and *Isis* retrotransposons as markers of the *Drosophila buzzatii* colonization in Australia. *BMC Evolutionary Biology*, *11*, 111.
- Gerasimova, T. I., Obolenkova, L. A., Kiselev, S. L., & Churikov, N. A. (1990). Uchastie novykh mobil'nykh elementov v transpozitsionnykh vzryvakh u *Drosophila melanogaster*. [Participation of new mobile elements in transposition bursts in *Drosophila melanogaster*.]. *Dokl. Akad. Nauk.*, *311*(2), 474-476.
- Gilbert, W. (1987). The exon theory of genes. . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, *52*, 901-905.
- Giraud, T., & Capy, P. (1996). Somatic activity of the mariner transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. *Proc.Biol.Sci.*, *263*(1376), 1481-1486.
- Goldman, D. H., Jansen, R. K., van den Berg, C., Leitch, I. J., Fay, M. F., & Chase, M. W. (2004). Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation *American Journal of Botany*, *91*(5), 707-723.
- Granzotto, A., Lopes, F., Lerat, E., Vieira, C., Carareto, C. (2009). The evolutionary dynamics of the *Helena* retrotransposon revealed by sequenced *Drosophila* genomes. *BMC Evolutionary Biology*, *9*:174
- Gregory, R., & DeSalle, R. (2005). *Comparative genomics in prokaryotes*. *The Evolution of the Genome*(10), 585-675.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U., & Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell*, *124*, 957-971.

- Hasson, E., Naveira, H., & Fontdevila, A. (1992). The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Rev.Chil. Hist. Nat.*, *65*, 319-326.
- Hegarty, M. J., Barker, G. L., Brennan, A. C., Edwards, K. J., Abbott, R. J., & Hiscock, S. J. (2009). Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Mol Ecol*, *18*(5), 877-889.
- Hegarty, M. J., Barker, G. L., Wilson, I. D., Abbott, R. J., Edwards, K. J., & Hiscock, S. J. (2006). Transcriptome shock after interspecific hybridization in senecio is ameliorated by genome duplication. *Current Biology*, *16*(16), 1652-1659.
- Hickey, D. (1982). Selfish DNA: A sexually-transmitted nuclear parasite. *Genetics*, *101*, 519-531.
- Ivics, Z., & Izsvák, Z. (2010). Repetitive elements and genome instability. *Seminars in Cancer Biology, Repetitive Elements and Genome Instability* *20*(4), 197-199.
- Jiggins, C. D., Salazar, C., Linares, M., & Mavarez, J. (2008). Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *363*(1506), 3047-3054.
- Johnson, N. A. (2010). Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? *Trends in Genetics : TIG*, *26*(7), 317-325.
- Jones, T. R. (1995). Ancestry of an isolated subspecies of salamander, *Ambystoma tigrinum stebbinsi* Lowe: the evolutionary significance of hybridization. *Mol Phylogenet Evol.*, *4*(2), 194-202.
- Kaminker, J. S., Bergman, C. M., Kronmiller, B., Carlson, J., Svirskas, R., Patel, S., *et al.* (2002). The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology*, *3*(12), 1-20.
- Kaneshiro, K. Y. (1990). Natural hybridization in *Drosophila*, with special reference to species from Hawaii. *Canadian Journal of Zoology, Canadian Journal of Zoology* *68*(8), 1800-1805.

- Kawakami, T., Strakosh, S. C., Zhen, Y., & Ungerer, M. C. (2010). Different scales of *Ty1/copia*-like retrotransposon proliferation in the genomes of three diploid hybrid sunflower species. *Heredity*, *104*, 341-350.
- Kidwell, M., & Kidwell, J. (1976). Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *84*, 333-351.
- Kidwell, M. G. (1983). Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(6), 1655-1659.
- Labrador, M., Farre, M., Utzet, F., & Fontdevila, A. (1999). Interspecific hybridization increases transposition rates of *Oswaldo*. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(7), 931-937.
- Labrador, M., & Fontdevila, A. (1994). High transposition rates of *Oswaldo*, a new *Drosophila buzzatii* retrotransposon. *Molecular & General Genetics* : MGG, *245*(6), 661-674.
- Larsen, P. A., Marchán-Rivadeneira, M. R., & Baker, R. J. (2010). Natural hybridization generates mammalian lineage with species characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(25), 11447-11452.
- Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*, 843-854.
- Lev, G. (1984). On the theory of speciation induced by transposable elements. *Genetics Society of America*, *107*, 331-341.
- Lin, H., & Spradling, A. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, *124*, 2463-2476.
- Lin, J., Kuo, J., & Ma, J. (1996). Effect of different primer combinations on the resolution of AFLP™ in plants with small genomes. *Focus*, *18*, 98-99.

- Lister, R., O'Malley, R., Tonti-Filippini, J., Gregory, B., Berry, C., Millar, A., *et al.* (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, *133*(3), 523-536.
- Liu, H., Yan, G., Finnegan, P. M., & Sedgley, R. (2007). Development of DNA markers for hybrid identification in *Leucadendron* (proteaceae). *Scientia Horticulturae*, *113*(4), 376-382.
- Long, M., Rosenberg, C., & Gilbert, W. (1995). Intron phase correlations and the evolution of intron/exon structure of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 12495-12499.
- Lynch, M., & Force, A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, *154*, 459-473.
- Madlung, A., Tyagi, A., Watson, B., Jiang, H., Kagochi, T., Rebecca, W., *et al.* (2005). Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *The Plant Journal*, *41*, 221-230.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, Special issue: Invasions, guest edited by Michael E. Hochberg and Nicholas J. Gotelli *20*(5), 229-237.
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R., *et al.* (2009). Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* Ovary. *Cell*, *137*(3), 522-535.
- Marin, I., & Fontdevila, A. (1996). Evolutionary conservation and molecular characteristics of repetitive sequences of *Drosophila koepferae*. *Heredity*, *76*(4), 355-366.
- Marin, I., Labrador, M., & Fontdevila, A. (1992). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXIII. High content of nonsatellite repetitive DNA in *D. buzzatii* and in its sibling *D. koepferae*. *Genome*, *35*, 967-974.

- Marzo, M., Puig, M., & Ruiz, A. (2008). The Foldback-like element Galileo belongs to the P superfamily of DNA transposons and is widespread within the *Drosophila* genus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 2957-2962.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*.
- McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, *226*(4676), 792-801.
- McDonald, J. (1993). Evolution and consequences of transposable elements. *Current Opinion in Genetics & Development*, *3*(6), 855-864.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development, Genomes and evolution**15*(6), 589-594.
- Mendelson, T. C., & Shaw, K. L. (2005). Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology*, *395*, 161-177.
- Metcalf, C. J., Bulazel, K. V., Ferreri, G. C., Schroeder-Reiter, E., Wanner, G., Rens, W., *et al.* (2007). Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. *Genetics*, *177*(4), 2507-2517.
- Mevel-Ninio, M., Pelisson, A., Kinder, J., Campos, A. R., & Bucheton, A. (2007). The flamenco locus controls the gypsy and ZAM retroviruses and is required for. *Genetics*, *175*(4), 1615-1624.
- Michalak, P. (2009). Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity*, *102*(1), 45-50.
- Michalak, P., & Noor, M. A. (2003). Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(7), 1070-1076.

- Morán, T. (2009). Arquitectura genética del aislamiento reproductivo por esterilidad híbrida entre *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Morán, T., & Fontdevila, A. (2005). Phylogeny and molecular evolution of the *Drosophila hydei* subgroup (*Drosophila repleta* group) inferred from the *Xanthine dehydrogenase* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *36*, 695-705.
- Mueller, U. G., & Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting *Trends in Ecology & Evolution (Personal Edition)*, *14*(10), 389-394.
- Naveira, H., & Fontdevila, A. (1985). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* IX. High frequencies of new chromosome rearrangements induced by introgressive hybridization. *Chromosoma*, *91*, 87-94.
- Nene, V., & et al. (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, *316*(5832), 1718-1723.
- O'Neill, R., O'Neill, M., & Graves, J. (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature*, (393), 68-72.
- O'Grady, P. M., & Markow, T. A. (2009). Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. *Fly*, *3*(1), 10-14.
- O'Neill, R., O'Neill, M., & Graves, J. A. (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature*, *393*(6680), 68-72.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., & Birchler, J. (2002). Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol.Cell*, *9*(2), 315-327.
- Parisod, C., Salmon, A., Zerjal, T., Tenailon, M., Grandbastien, M. A., & Ainouche, M. (2009). Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable

elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* The New Phytologist, *184*(4), 1003-1015.

Parisod, C., Alix, K., Just, J., Petit, M., Sarilar, V., Mhiri, C., *et al.* (2010). Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist*, *186*(1), 37-45.

Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., *et al.* (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*, *35*(1), 32-40.

Patterson, J., & Stone, W. (1952). *Evolution in the genus Drosophila*. McMillan, 610p.

Paulsen, I., Banerjee, L., Myers, G., Nelson, K., Seshadri, R., Read, T., *et al.* (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, *299*(5615), 2071-2074.

Peng, J. C., & Karpen, G. H. (2008). Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Current Opinion in Genetics & Development, Chromosomes and expression mechanisms**18*(2), 204-211.

Petrov, D., Aminetzach, Y., Davis, J., Bensasson, D., & Hirsh, A. (2003). Size matters: non-LTR retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*, *20*, 880-892.

Petrov, D. A., Schutzman, J. L., Hartl, D. L., & Lozovskaya, E. R. (1995). Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *92*(17), 8050-8054.

Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., Marchetti, E., *et al.* (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 3804-3808.

- Piñol, J., Francino, O., Fontdevila, A., & Cabré, O. (1988). Rapid isolation of *Drosophila* high molecular weight DNA to obtain genomic libraries. *Nucleic Acids Research*, *16*(6), 2736.
- Pires, J., Zhao, J., Schranz, M., Leon, E., Quijada, P., Lukens, L., *et al.* (2004). Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassicapolyploids* (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *82*, 675-688.
- Pollock, H. (1988). A morphometric analysis of a *pseudopanax* hybrid swarm. University of Auckland.
- Post, R. J. (1984). Natural interspecific hybridisation of *Simulium sanctipauli* s.l. with *Simulium squamosum* and *Simulium yahense* (diptera: Simuliidae). Retrieved 9/6/2011, 1984, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6710602>
- Putnam, A., Scriber, J., & Andolfatto, P. (2007). Discordant divergence times among Z chromosome region between two ecological distinct swallowtail butterfly species. *Evolution*, *61*(4), 912-927.
- Rafael, V., & Arcos, L. (1989). Subgrupo inca, un nuevo subgrupo del grupo repleta, con descripción de *Drosophila huancavilcae* n. sp. (Diptera, Drosophilidae). *Evolución Biológica*, *3*, 233-243.
- Rahman, S. M., & Uehara, T. (2004). Interspecific and intraspecific variations in sibling species of sea urchin *Echinometra*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *139*(4), 469-478.
- Ratner, V., Zabanov, S., Koleniskova, O., & Vasilyeva, L. (1992). Induction of the mobile element Dm-412 transposition in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*, 5650-5654.
- Rebollo, R., Horard, B., Hubert, B., & Vieira, C. (2010). Jumping genes and epigenetics: Towards new species. *Gene*, *454*(1-2), 1-7.

- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., *et al.* (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, *301*(5637), 1211-1216.
- Rieseberg, L. H., Sinervo, B., Linder, C. R., Ungerer, M. C., & Arias, D. M. (1996). Role of Gene Interactions in Hybrid Speciation: Evidence from Ancient and Experimental Hybrids *Science* (New York, N.Y.), *272*(5262), 741-745.
- Rockey, S., Hainze, J., & Scriber, J. (1987). Evidence of a sex-linked diapause response in *Papilio glaucus* subspecies and their hybrids. *Physiol. Entomol.*, *12*, 181-184.
- Rodríguez-Trelles, F., Alarcón, L., & Fontdevila, A. (2000). Molecular Evolution and Phylogeny of the *buzzatii* Complex (*Drosophila* repleta Group): A Maximum-Likelihood Approach. *Mol Biol Evol*, *17*(7), 1112-1122.
- Rogers, S. M., Campbell, D., Baird, S. J., Danzmann, R. G., & Bernatchez, L. (2001). Combining the analyses of introgressive hybridisation and linkage mapping to investigate the genetic architecture of population divergence in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill) *Genetica*, *111*(1-3), 25-41.
- Ruiz, A., & Wasserman, M. (1993). Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* complex. *Heredity*, *70*, 582-596.
- Saito, K., Nishida, K., Mori, T., Kawamura, Y., Keita Miyoshi, K., Nagami, T., *et al.* (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.*, *20*(16), 2214-2222.
- Salmon, A., Ainouche, M. L., & Wendel, J. F. (2005). Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol*, *14*(4), 1163-1175.

- Santagata, S., E. Besmer, E., Villa, A., Bozzi, F., Allingham, J., Sobacchi, C., *et al.* (1999). The RAG1/RAG2 complex constitutes a 3' flap endonuclease: implications for junctional diversity in V(D)J and transpositional recombination. *Mol.Cell*, 4, 935-947.
- Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., *et al.* (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3083-3091.
- Schmidt, E. R. (1984). Clustered and interspersed repetitive DNA sequence family in *Chironomus*. *Journal of Molecular Biology*, 178, 1-15.
- Shan, X., Liu, Z., Dong, Z., Wang, Y., Chen, Y., Lin, X., *et al.* (2005). Mobilization of the active MITE transposons mPing and Pong in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Mol Biol Evol*, 22(4), 976-990.
- Sheen, F., Lim, J., & Simmons, M. (1993). Genetic Instability in *Drosophila melanogaster* Mediated by *hobo* Transposable Elements. *Genetics*, 133, 315-334.
- Siguier, P., Filée, J., & Chandler, M. (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials/Genomics* 9(5), 526-531.
- Stakenborg, T., Vicca, J., Maes, D., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., *et al.* (2006). Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 263-275.
- Steinau, A., Skinner, D., & Steinau, M. (2003). Mechanism of extreme genetic recombination in weedy *Amaranthus* hybrids. *Weed Science*, 51(5), 696-701.
- Sturtevant, A. H.,. (1920). Genetic studies of *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*.. *Genetics*, 5, 488-500.

- Suh, D., Choi, E., Yamazaki, T., & Harada, K. (1995). Suh, D.S., Choi, E.H., Yamazaki, T., Harada, K. (1995). Studies on the transposition rates of mobile genetic elements in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, *12*(748), 758.
- Sved, J. A. (1979). The "Hybrid Dysgenesis" Syndrome in *Drosophila melanogaster*. *Bioscience*, *29*(11), pp. 659-664.
- Teo, L., Kiew, R., Set, O., Lee, S., & Gan, Y. (2002). Hybrid status of *kuwini*, *Mangifera odorata* Griff (Anacardiaceae) verified by amplified fragment length polymorphism. *Mol Ecol*, *11*(8), 1465-1469.
- Thornburg, B. G., Gotea, V., & Makałowski, W. (2006). Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. *Gene, Genome and RNA: Expression and Functions Papers presented at a Symposium in Puntarenas, Costa Rica, 26 February-2 March 2005*365(0), 104-110.
- Throckmorton, L. H. (1975). *The phylogeny, ecology and geography of drosophila. A Manual of Invertebrates of Genetic Interest*, (17), 421-469.
- Tidon-Sklorz, R. (1995). Evolution of the *buzzatii* clusters (*Drosophila repleta* species group) in middle South America. *Evolución Biológica*, *8-9*, 71-85.
- Torre, A. d. (1997). Selective introgression of paracentric inversions between two sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Genetics*, *146*(1), 239-244.
- Turelli, M., Barton, N. H., & Coyne, J. A. (2001). Theory and speciation *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(7), 330-343.
- Ungerer, M., Baird, S., Pan, J., & Rieseberg, L. (1998). Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *PNAS*, *95*(20), 11757-11762.
- Ungerer, M. C., Strakosh, S. C., & Stimpson, K. M. (2009). Proliferation of *Ty3/gypsy*-like retrotransposons in hybrid sunflower taxa inferred from phylogenetic data. *BMC Biol*, *7*, 40.

- Ungerer, M. C., Strakosh, S. C., & Zhen, Y. (2006). Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation. *Curr Biol*, *16*(20), R872-873.
- Vasilyeva, L., Bubenshchikova, E., & Ratner, V. (1999). Heavy heat shock induced transposon transposition in *Drosophila*. *Genet. Res.*, *74*, 111-119.
- Vela, D., García Guerreiro, M. P., & Fontdevila, A. (2011). Adaptation of the AFLP technique as a new tool to detect genetic instability and transposition in interspecific hybrids *BioTechniques*, *50*(4), 247-250.
- Vieira, C., & Biémont, C. (1996). Geographical variation in insertion site number of retrotransposon *412* in *Drosophila simulans*. *J. Mol. Evol.*, *42*, 443-451.
- Vieira, C., & Biémont, C. (1997). Transposition rate of the *412* retrotransposable element is independent of copy number in natural populations of *Drosophila simulans*. *Mol Biol Evol*, *14*, 185-188.
- Vieira, J., Vieira, C., Hartl, D. L., & Lozovskaya, E. R. (1998). Factors contributing to the hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis*. *Genet.Res.*, *71*, 109-117.
- Vilela, C. R. (1983). A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.*, *27*, 1-114.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, *23*(21), 4407-4414.
- Wagner, A. (2006). Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes. *Mol Biol Evol*, *23*, 723-733.
- Wasserman, M. (1982). *Evolution of the repleta group*. The genetics and biology of *Drosophila.*, 61-139.

- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A., Thomas, B. B., *et al.* (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) *Molecular & General Genetics*, 253(6), 687-694.
- Wharton, L. (1942). Analysis of the *repleta* group of *Drosophila*. University Texas Publications 4228, 23-52.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., *et al.* (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973-982.
- Winter, C. B., & Porter, A. H. (2010). AFLP linkage map of hybridizing swallowtail butterflies, *Papilio glaucus* and *Papilio canadensis* *The Journal of Heredity*, 101(1), 83-90.
- Zampicini, G. (2004). Insertional polymorphism of a non-LTR mobile element (NLRCth1) in European populations of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) as detected by transposon insertion display. *Genome*, 47, 1154-1163.
- Zeid, M., Schön, C., & Link, W. (2004). Hybrid performance and AFLP- based genetic similarity in faba bean. *Euphytica*, 139(3), 207-216.
- Zemach, A., McDaniel, I., Silva, P., & Zilberman, D. (2010). Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 328(5980), 916-919.
- Zha, H. G., Milne, R. I., & Sun, H. (2010). Asymmetric hybridization in *Rhododendron agastum*: a hybrid taxon comprising mainly F1s in Yunnan, China *Annals of Botany*, 105(1), 89-100.
- Zhao, X., Si, Y., Hanson, R., Crane, C., Price, H., Stelly, D., *et al.* (1998). Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genet. Res.*, 8, 479-492.

Anexos

Anexo 1. Secuencias nucleotídicas de los marcadores AFLP de transposición (marcadores de inestabilidad híbrida asociada a ETs)

GGCTC21

GGAACAAAAAACTCAAGCGAATTAGAAGTGTATGTGCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTG
 ACTGCGTACCAATCCATCTAAATGTATATAATAGACAGATGAAGGTGTGGTAGATTTTCAT
 AAAGTATATATATTCTTGAACAAGGCGTTGTGCTAAGTTGATAAGCCTTATATGTGATTTT
 ATGTATCTATCCATCCGTTTGTCTATCGGTACGTATCTTTGTCAGCCCTTCTATATAGAAGT
 CTGTCGGTCCATCTAGAAATCTGTCCGCCTCTCTATTCATCCATCCGCTTCTCGTCGATCTG
 TGGCTCCGTCTGCCATCTTCCGTTAGTCCCTCTCTCCGATTATCCGTCCATTCGTCTCC
 GTCTGCTCTTTCATTCATCTTATTGTTTCATCTGCCTGCCTGCCTGGTCCATCCATCTGCCCGT
 CTGTCCGACTTTTCTCTCGCCGACTGTCCGTCGATTCGTCCGCTCGTCTGTTCTCCATCCG
 TCTTCTCGTCCATCTGTCTGCCCGTCGTCCATCTGTCCCTCTCTCCGACTGTCCGTGCATTCT
 TCCGCTCATCCATCCGCTTCTCGTCCCTCCCACGTTCCCTTATTGTAAAGATTGAATATGCTT
 GAATTGATTTGCAAGTTTGGTTGC

CAGCA21

CATTTTCAATGGGTTCAAGGGTATAATAAAAGCAGATACTGCCTCACATGTCGTATCCGATG
 AAAGCCTAGATAAGAAATCTTGCTTTTCGAGAAGATGCGACAGATAAGGTAATGCCAGGA
 GTGGTTGACTTATTGTCACCTTAGTTTGAAGTATAAATTGGATAGGAGTCCAATTTTTGAAC
 AGAGACTTGAGTATCAATAGCAGCAACGACAGGGGAAACAGAAGATTCAAGAACTACTG
 GTTTAGGTTCAAGAGAATTAGGCCAGAGGACAATACAGAAGCACAGGGTGATGGTGTA
 GCAAGTATGTTCCGGTGACAGTATTGGTACAGAAGGAGGTACCAATGACTTACAAAATAAA
 CAAGTAAGAAGACTCTAGTCGAGACGGCTCGACTACGAGATACCCTGAACCCAAAAAAG
 GTGATACATTCTTCTTTACACACTTGTAAGCGCGTGCTCTGCTAACC GCGCAGTTGCTGCG
 CGGGGGGTGGG

GGATT21

GGCCTCAAGCAACAAAGGCGTATGAAAGCATAAATATATACATATAAAGACATCTACATA
 TATGTATATTTATATATAAAAATATATATTCGTTTGATTTGTTTTGTTGCGAAGCTGCTGAG
 GTCATTGAACGCGACTTCAAATGCGGCTGCGACTGCGCTTACATTTCTGTGATTTATAA
 ATACATACATACATATATTTATGTATGTCTATCAGAGATTGCGTATACGGCTCGTTGTCTAA
 GGTAAAGGGCGATGAGCGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAATCAAGTAAATGAAGCC
 AAATGAAAATAAGAAAATTGTGATACGCTGAGCTTTAGAGCAGGTATTTTCACTTCCACC

TCACTGAGTGTAGCGTAGTATAACGACTATAGGATACCCTTCAATGCTATGCTAGCAAATT
CTTGAAATTTCAAAAAGGAAT

CCCCC21

CCAACAAAAAATCAAGCGAATTAGAAGTGTATGTGCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTGA
CTGCGTACCAATTCCATCTAAATGTATATAATAGACAGATGAAGGTGTGGTAGATTTTATA
AAGTATATATATTCTTGAACAAGGCGTTGTGCTAAGTTGATAAGCCTTATATGTGATTTTAT
GTATCTATCCATCCGTTTGTCTATCGGTACGTATCTTTGTCAGCCCTTTCTATATAGAAGTCT
GTCGGTCCATCTAGAAATCTGTCCGCCTCTCTATTCATCCATCCGCTTCTCGTCGATCTGT
GCGTCCGTCTGCCATCTTCCGTTAGTCCCTCTCCGATTATCCGTCCATTCGTCCTCCCG
TCTGCTCTTTCATTCATCTTATTGTTTCATCTGCCTGCCTGCCTGGTCCATCCATCTGCCCGTC
TGTCCGACTTTTCTCTCGCCGACTGTCCGTGATTTCGTCGCTCGTCTGTTTCTCCATCCGT
CTTCTCGTCCATCTGTCTGCCCGTGTCCATCTGTCCCTCTCTCCGACTGTCCGTGCATTCTT
CCGCTCATCCATCCGTCTTCTCGTCCCTCCCACGTTTCTTATTGTAAGATTGAATATGCTTG
AATTGATTTGCAAGTTTGGTTGC

CCCCC21

CCCACCCCCGCGCAGCAACTGCGCGGTTAGCAGAGCACGCGCTTACAAGTGTGTAAAGA
AGAATGTATCACCTTTTTTGGGTTACAGGGTATCTCGTAGTCGCGCCGTCTCGACTAGAGTC
TTCTTACTTGTTTATTTTGTAAAGTATTGGTACCTCCTTCTGTACCAATACTGTCACCGAACA
TACTTGCTACACCATCACCCAAAGAGCTATATTGCCTCTCAAAGAGGCAGTTATTACATC
TAATCCCGTAGTTTGGATATGGGCTGTTTCCCCCTCCATTGTTCTTAGTAGTACTCAGCGGT
CTATCAAAGAAATCAATCCTTACTCATTCTTTTCATCAGAACCCCGGAAGAAAGTCCACCT
GTCTTGCGGATACTGGGGTCCATTCTTCTTTTGAACGCTTGATTTCTGTTTGTAAATCAA
TTACCAAACCACCCAGGCACCCGCTGCTTCCCTTCCCATGGGGGCTTTTCTATGGG
GCTTTTCCCGCATCCCTTAAACATGTGGGTTGGTAAATCTAAGAGG

TGTCG27

TGCGCCATATACTGCCACCAAGGAACAGAATTGGTGAAAGGCAATTCAGCGACATACTC
GCTTCTGTGGCCAAAGGTATTTTATTGGTGGCGACTGGAATGCGCGACATTGGCTGTGG
GGAGACTCATACAACTCTCCAGGGGCAGAGAACTTGCAGAAGCCATTACAGCCAGAAGC
GCTAATATTCTTGCTACAGGATCTCTACTAGATACCCGTATATATCCAATCACACTCCCTC
TTGCATTGATTTTGCATTATACCATGGGATACAGCATTACCAAGTAAATATACACCAAAT
GGGACTTGGATTCTGACCACCTAGCCCTCATTGCCGAGTTGCACATTGATGGTTCTAATAT

CAGCCCAAGCCCAAGGCTAATAACCAACCGTACTGACATTGCGGCTTTCAGACAACAGCT
AGATGACTCCATCCGA

CAGCG21

CAGCATGTATATTACCTCGCGTATCCTGACAGAACTGGCCGGAAGCGGGGATGCACCTGC
CGTGCTGGCACGCACTTCCACCACGCAGACGCCGCGTCTGGCCATTACCGTCAGCAGTATT
GCGGGCACGCTGGTTGCGTTTTCTCCATTCTTGCGCCAACACCATTTTTGCTTTTTGCT
GAGCTGTAGCGGCGGGGTGATTCTGGTGGTGTATTGCCTGATTGTGTCTGCTTATGTTCA
GGCGCGGAGTAAGGCGGAAAAACCGGGCAGGGGGAAGGGTTCAACCTGCCGCTGTTCC
CGTTCTGCAATTACGGGACGTTGCTGGCTGTGGCCTTTGTGTTCAATGCCATGATGTTCA
ACCCGGAGGAACGGATGACCGCCATTGCAAGCCTTGGCACTTCGGTCTTTTTCTCCTTCT
GGCGTCTTTCAGGAACAGACGCGCT

TGATT25

TGTCCCTTATTATTAGCAAATATGAGCTCAACTAGTATGTAAATTATGATAATTACATTAGT
TTTTCAACATGTAAGTAGAGTAGGCATAGGTTTGAACCCATTGAAAATGGGAAATCGGGG
TATAATGGGTTTGCTAAAAGTATGTAACAGGCAGAAGGAGGCGTGGCAGAGGAGGGTG
ACGAGCTGTGTGCATATAGCTATGTCCGTCCGTATGTATGAACGCGTCGATTTCCGAAGAT
ACAAGAGCTAGGTAGTTCATTCTTTTTGTGTTAGATTTCGTATATTGCACGCGCAGTACAAG
TTTGTGTCAGTAATTCGATAACTCGTATATGTTTCAGAGTTATCGATAAAAACAATTATCGA
GAATCAGTTATAAAATTCTAGCTAATTCATCTTTAGAGTTAGAGTCTGCAAGCTTCTGCAT
ATATATAGATACTAATT

TCAGT21

TCATTCCGCCTAGTCTATAATATGTGTGTGTCTACCTTATGTATGTGTGTGTGTGTGTGT
TTGTTGGTGGTGCTGGTGTGTATCTGTCTGCCGAAACAACATATTTTCATGGCTTAGGTAGA
TATTTTTTAGCTAGTCAGCGCAAACGTAACGAAAAATAAAATAAATGAATATGCGCCACG
CACAGGCATCCCAAAGCACACGCACACACACACACGACGACGCACTTCTACATATATAC
AGCATCCTGTCAGCCATTTTTGTTGCTGTTGTTGCGGTCCTTTGTGGCACTGGCATAGCTAA
GCGTGTGCACTGCATTTGTTTTACATTTTATTATGCTACT

TCAGT21

TCGACGTTACATACAGACGGACAGACAGACAGACGGACGTACAGACTGACGGACATGGCT
AGACCAACTTATTTTTGTATGCTGATCAAAAATATATATACTTTATGCGGTCTGCGACGTCT

CCTTCTGCCTGTTACATACTTTTTACAAAAACCATTATACCAAACGTAAAAAGTAATCG
 AATAAACTCGCACTGCATAAGTAACATACGAGTACTTATGTAAAATTCAGCTCTCTAGCTT
 TTGTAGTTTACGAAATCTCTGCAATAATAAGGACGGACAGGCGGACAAGGGTATAATAAC
 T

TGCGG21

TGCCAATTATCAGAGCAGCTGGCCGGAAGCGACTTGGCGAAACCCGTGCTAATCCATTG
 CCGTCTGCGATTACTGGACGCAGGTTAGGTCATATATATCCTAACCCGAGTCAAACCAGCT
 GTACTIONAACCTATATAACAGCCG

TGATT21

ATTCGATTTTTATTGGTATTAGGAAGAATAGAAAATATGTTGATAGATGAATGATAAACAG
 TGAACAGGAAGCAAGAATTGATACCGAAATATATATAGACTTCTGCTAAAATTGAAAGGC
 AATATGCCAATATCGATTTTTATCGATATGACAGTATAAAGAAGAGAAGGCTGATTGATAT
 CAGTGAAAGAAATGCAAGCAAAGAAAGATAGACATACAAATGAGATCCTAACTTACCCAA
 GTAGCGCTGCTGATCTTGACTATGAATATTGATTATGAAATATTGTCGCCATCGACACACG
 ACACACACACTATGCTCGCAACTAATATACCCTATCACAGAGCCAACTACTAATGCTGGGC
 ATAATGAAAAGAGCAGCTAACTGGATACGTTGAAATATATGCACATGATTTAGAGAGTTG
 TTTAGGGTTTCATTGAAATGCATACGGAGAGCAGACCCGCTCTCGTAAGGGGTAGCCCTG
 GCTACTCGAGCTGCTGCTTGAGTTTGCTCTCAGTCCTCATTTCGGTTTCTGCTGCTGTTTCA
 GTTTCAAT

TGATT24

TGCTGGCAGTGTGGGCGTATAGGCGTGCGCAAGGCATACTGTTGCAAGAAGAACTCCAA
 TGCCTTGTGCGACTCCAGAGCCTTTACTTTTTGTGTTCTCGGGATTTGAGATCGCTATAT
 TCTCTTATTTCTACAAAGTACAATTCAGTCTCGCTATACATTATGCCTGCCTGAGGFACT
 CCTGGTCTGAATAGACGTCCAAAATATCTGCCGAGGATATTTTTGGATTTTCCACAAAA
 TCCTGTCCGCCTGAAGTCCTTGATACCGGATTGCAGTCCTTCGCGGTCTTTTATATGGTA
 TTCACTCGCGTTGACTTTCGGCACTACTAAGTTTCACTAGCGGCACTACGCAACGCCGGC
 AAAAGCACTATTATGCGTCGTTGACTGTAACGTTCTTACTTATTATTACCTGTTTTTGGTC
 ATTGACGATTATTTACTATTATAAATTTTTCTAAAATATTTAGTACCAGTCTACGTATTTAT
 AGTTATTAGTATAAAAAATAATATATCCTGATTCAAT

TGATT25

TGCACCAAAAATGACGAGTGTGGGATCATTGTCTTGTGGAACAGCCATTGTGTTCCAC
 TAAGGCCAACTTCTCAACTGGGGTCAAATATTTTCAAATATCCAAGAAACCATA
 TTTATCCATGGTCCATCAATAAAAGCTAGTTGACCAACTCCAGATGCCGAACAACATCCC
 CACGCCATCACATTTCCGCCGCCGTGTTTTACAGTTTTGCGGAGATTTTTTCTTGCAGCTC
 TTTGTTGGCTTTCGCCACACTTTTTGGCTGCCATCAGACCCAAAAAGGTTGAATTTGGAC
 TCATCACTGAAAATTACATTGTTCCAGAATGAGTCCGGCTGGCTTACGTATCTCTTGGCAA
 AGTCCAGCCTCTTCGCCTATTTACTTTTTGAAATAAAAGGCTCCGCCGCGGAACCTGCCA
 TGATACCCAGCCTTATTCAGTGTATTCGCACGGTTTGTGGGCAAACTTAGCTCCAATAG
 AATCTTGCAGTTCCTGACACAAT

TGATT26

ATTCAATCCCGCCTTTGTCGTCTCAACTACTTTCAAAGTTTCTACGGCATGCAGGAGCTA
 GGAGCTGGCAGGTGCCTGCTGCCTGCTGCCTGCCGCCTCTGCTCCATTGCTTA
 GAAGCTGCTGCAGCTGCAGCTGCAGTTCCTAGCTGCCTCAATCTAGCTGCTATTGCTTTG
 GCTGCTGTTTGACTTTCAGTCTCGAATGATTTACCTTACAAGATAAACAGACAGCGCTGCT
 CCAGCGCAGTTGCAGCGCAGCTTTGGCTGCTTCTCTCTCCATTTTTATTTTTCGTCTGA
 GCAGCCGAAGTTGACTTTTGTCTTTGTATGCAATGCGCCGTTGTCTGAGCCATAGGATA
 ATGCGCTTCAAATTGTGCCCGTGTGCGTGCCCTTACTCATCTCTCTCTCTCTTTTTTC
 TCTCTCTCTCTATCTCGCCCTACTCATTCTTGTGGCGTCTCAGCATCACATTGCGCTTG
 GCAATGCAAT

TGATT22

TGGCTCAATTTCATATTTGACTTGTGTAACACTACGCCACTGCTTTGTGGTAACAGTTTGGTAA
 GGTGCTTTCATCCGCCTGCTGATAATCAGTTCAATTTCTGCTCAGTTTCAACTTCTGGC
 TCTGAGTCAGGTACAATTTCATGTTCTCTGCTAAAGGCGTCAATGTTTCATTTCCATTAT
 GAGTCTTTGACTTCTCCGGTATTCCGTCCTGTTGTTGTTGGGTAAGGCCTGACAATAGT
 TCACGTTGTGCACTGATGCATCGGTCTCGAAATCTGACTGCGCTTGTGAGTTCAATATTAC
 AGCACTCGCACATCAGCTCAGGCAGGCAAGGAAAACCTTCCA

TGATT27

TGTCCTTTATTATTAGCAAATATGAGCTCAACTAGTATGTAAATTATGATAATTACATTAGT
 TTTTCAACATGTAACACTAGAGTAGGCATAGGTTTCAAACCACTGAAAATGGGAAATCGGGG
 TATGATGGGTTTGCTAAAGGTATGCAACAGGCAGCAGGAGGCGTGGCCGAGGAGGGTG
 ACGAGCTGAGTCGATATAGCCATGTCCGTCCGTATGTATGAACGCGTCGATTTCAAAGAT
 ACAAGAGCTAGAGAGTCCATTTCTTTTTGTGTTAGATTTCGTATATTACACGCGCCGTACAAG

TTTGTGTCAGCAATTCGATAACTCGTATATGTTTCAGAGTTATCGATAAAAAACAATTATAGA
 GAATCAGTTATAAAATTCTAGCTAATTCATCTTTAGAGTTAGAGTCTCCAAATCTTCTGCAT
 ATATATAGATACTAAT

TCTCG21

TGACGACGGGACAAATTC AAGTAATGAAATATCCATTACAAAGCGCAATGAATGTACCAA
 CATATTTTCATTGCCAAGCCGGCCAACATCTAATGTACATCGGTCGCTTAGTTCTAGCAGT
 GAAAATAGTGATGATCATTATCTGTAAGCAGTACAAGTGAACAAAGTTCTCCTGACAATG
 TGAAAAATATGCGATGTAATAATAAACAACGATACGA

CGGGG22

CGGGTAAATGCTCATAACATGAAGCAAGATACAGTAAATGTGTGTGTGCATGCTCATCGCG
 AAAAAGTAATGCTTTTGTACATCAGCGTTTTTCATACCCTTCAAAAAATAATCACGAAAAC
 ACTAAAATTTTGTATGAGCATGGCAAAGCCGTATAAGAGTTCGGCATAACC

CCGAT21

CCTATGCACACTTTGACTTTCCCTCCTGTGCCCGACATCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTG
 ACTGCGTACCAATTCCTATTTCAAGGGTTCAGGGTATAAAAAGAAAGAAATAATAAAC
 AAGTAAGAAGGCTCTAGTCGAGACGGCTCGACTACGAGATCCCCTGAATCCTGCAAAAAA
 AGTGATACTCTTCTTTACGATCGCATGAGCGGAGCTCTGCTAACC GCGCAGTTGCTG
 TCGTGGCTTGGGGTGGGTTGGGCTATAATTTGAACGCTTGTAAC TCAATTTCTAGATGG
 ATGATC

CCGAT22

CCCATGCCGTATCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTGACTGCGTACCAATTCCTATTTCAAT
 GGGTTCAGGGTATAAAAAGTAAGAAGGCTCTAGTCGAGACGGCTCGACTACGAGATCCC
 CTGAACCCTGCAAAAAAGTACTCTTCTTTACGATCGCATGAGCGGAGCTCTGCT
 AACCGCGCGGTTGCTGCTGTGGCTTGGGGTGGGCTGGGCAATACTTTGAACGCCTATAA
 CTCATTTCTAGATGGATGATC

CCGAT23

CCATTTTCAATGGGTT CAGGGTATAAAAAGAAACAAGTAAGAAGGCTCTAGTCGAGACGG
 CTCGACTACGAGATACCCTGAACCCAAAAAATACTCTTCTTTACGATTGCATGAGCGC
 GCCCTCTGCTAACCGCGCAGTTGCTGCCGTGGCCTGGGTGTGGGTTGGGCTATACTTTGA

ACGCTTATAACTCCATTTCTAGATGGACGATCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTGACTGCGT
ACCAATTCCCCGTAAGCCTATAAAATAAACTCCTGCCTAGACACAATTACGACAGCATC

CCGAT24

CCATTTTCAATGGGTTTCAGGGTATAACAAGTAAGAGGGCTCTAGTCGAGACGGCTCGACT
ACGAGATCCCCTGAACCCTGCAAAAAAAGTGATACTCTTCTTTTACGATCGCATGGGCG
CGAGCTCTGCTAACCGCGCAGTTGCTGCCGTGGCTTGGGGTGGGTTGGGCTATACTTTG
AACGCCTATAACTCCATTTCTAGATGAATGATCTTACTCAGGACTCATCAGCCCTGACTGC
GTACCAATTCCCTCCCTTTTAGTTTGTGCTTATGTTTTTCAAATATCGATCTATA
CTAGGAACCTTATC

TGTCG21

TGGCTGGCTGTGCGCAGCAATGTCGAGCTGATGTCAGAAGTCAGACATTGGTGGTGGTT
GTTCCGAAGATATCGTCCGCCTGTGCAGGATGAGGAGGAAGGTTTCTCAAACCTGCG
GCGGATTTGCTTCCGGCGGAACCATGGACGCAGGAAACATGGAAGGACTGGACTGCGGA
ATTGAAGGAAGCCACGGGGCGTCCGGAAAAACGTTGTTCCGTCCGTTGCGTCTGGCTTT
GACGGGTGAAGAGCATGGCCCTGAACTGAAGGATCTTCTCCCCTGATCGGGCGGGAGC
GGGTGTTGCAACGTCTGTGCCCGTTGAGGGTTGATGTCTGGGAAGTTCCGAATTTCTTC
AGTTGAGACTTTGGACGA

TGTCG22

TGCGCCATATACTGCCACCAAGGAACAGAATTGATGAAAGGCAATTCAGCGACATACTC
GCTTCTGTGGCCAAAGGTATTTTATTGGTGGCGACTGGAATGCGCGACATTGGCTGTGG
GGAGACTCATACAACTCTCCAGGGGCAGAGAACTTGCAGAAGCCATTACAGCCAGAAGC
GCTAATATTCTTGCTACAGGATCTCCTACTAGATACCCGTATATATCCAATCACACTCCCTC
TTGCATTGATTTTGCATTATACCATGGGATACAGCATTACCAAGTAAATATACACCAAACT
GGGACTTGGATTCTGACCACCTAGCCCTCATTGCCGAGTTGCACATTGATGGTTATAATAT
CAGCCCAAGCCCAAGGCTAATAACCAACCGTACTGACATTGCGGCTTTCAGACAACAGCT
AGATGACTCCATCCGA

TGTCG23

TCGCAGAAAACAGTACTGGAATCGCTGCCCTATATTGGCAGCACTGCATCGTATCAGGT
AATGCGCGATCAGATTATAAATGAGAACTAACCAAGGAAATGGCGCACAGCTGGATGA
GCTCGCTGTCAATTTATCACGCGACCGGATGCAGAGACTGGAGACCTTTTACACCATACT

TGACTATGCTAGAAACAAACTGGATCCGGAATACACACTGGGCGCAACGGCTGTGGTACA
 CAGCTATTGCAGGCATCATGAAAATTGCGAGGAGGATCTGAAGGTGATGCAAATTATCAA
 TCTGCTGGAGACCGAGTTTCTGAGCCAGTTCAAGAGATATCGCGGCGATCGCAAGCAACG
 CGAACGCCTAATTATACTGCTCAAGGGTCTTGGTAATATTGGAGTTATGTCCCA

CACTC22

CAGCCTAGCGGGATGTTAGTCACTTCCTTAGCGAACGTGCTTGCGCACCTGAAGTTATGGA
 AGGTGATCTTTCAACCCCAACAGTTCCAATCTCAATTCCGAGATCCCCAAACCCTGCCCGTC
 CAAACCGAGTCAAATCATTCCACACCCAAGTACACACAAAACGCATGAAGTGCGAGCTGC
 CCTTGCAAGAGAACCATCCTAGTCCGAGTAGAGTTATGTCGAACACCCAAACGTATTTGGC
 TGCTAATACGCAAAGAGTCCCTCCTCGGCACGGCGGTGGTCAATATATGCCACTTCGGAGC
 CATCTATCCCGCCCGTGCTTTAGTCGACTCAGGGTCCGAAACAACCTTTCATTTCTGAGCGA
 CTATTCCGTAAGATCAAGTTGCCTTTCACATCCGTGAAAACCTGCGTTTTCCAGCCTGAATC
 AAGCGATTACGGCCAACGCCAAAAGCTTCGCAATTTTTATATTGGTTCTCCGTTGAAACC
 GACCGTTGCGAG

CAGCA22

CAATTGAAATGGAATTTACTTTCTATTCTCACCTTTCCAGGCGGCATGACCATTCAGCCCT
 ACTTCGATGAGGAGCAACTGGAGCATATACTGCACACGGACGATGAAGACGACGATGAG
 GAGGATGGGCGTAGGCATGCGGTGGACGATGACCAGGAGATGCAGCTGGATGTGGCCG
 ATGAAAGCGGCGATGAGATTGTCATGTTGAATCAGCACAATCGACGAAGGCAATAGATA
 GATAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGCGAAAGAGAGAGAGATGGCAACACTCAGACAACAA
 CAGCACACAACGTAAGTGTGATTCCAAAGTTTTCAAAAACCAAGCGCTCTGCTACAATTAT
 GC

CGAGT21

CGACAATACCTTATCGATGTGTTTAGATGTTGCCAGAATGTCGCAAACTTATCTGCAAAA
 ACAATTAGACGCCGAATTGCAATATTGAAAAAGTAGTACTGTAAATTATTGCGAATATGTC
 CATGATTCCATTCTTTCAAATCTCAAGCCTACTGTGGCTAATCGTTTTTGGTTTGATATGA
 CATCCGATGATGAGATGCAAACAAAGCGCTATGAAGACGAGCGCAGAAATTGGGTATGT
 CTGCAATAAATACATATGTATGAATGTATATAAATTGAATTACAATTGATTTCTATTTTA
 GCGAGAATCTTTGAAGACAGCTGCAACAGATTTGCAGCCACTGGGTAAGGTGCATACTAT
 AACTGGCGTCGAAACAGATGATGAGGATGGTAAGTCACAAGCAGATAAACATTTGGGAA
 ATATCCATTTATTTCTTACCACAGCCAACGATGATAGTGAAGACACCGATAGTCACGATG
 AGGAGGACGACGAGACCAACGATCGTGTTATTTCCGTTACGCAGGACTTTTACTCAGCAG

ACGATATACAAATGAACGACGAGACCTCGCCACAGCACCCCTAAAAGGAAAGGCATTGCA
 TAGATACACCATTTAGTTAGTAAAGAGTTAGTTACTGTTGCGATCACAAAGTCCCTTTACA
 AACTGTAATAACAATTTTTCTTTACTTTACTCAGGACA

CACAT21

CACCGTCTCAAGTGCCTCGAGCACCAGATCCTGATATTCCTGAACTTGTGCCATTTTGATG
 CTTGTCTTTGCGCTGCCCTCAAATTGGCGCGCAAATGTGATTCCAATTGTAGCGTCGAA
 ACAGCAAACGCTTGCAGACTGTACAAGGAG

CACTC21

CACCGTCTGCTACACCAAGTAAGGGCATTCAATTTGTGAATTGGAACCCGCTGACCCGCAA
 AAGGCGCAAAGTCCAAGAAGAACAAGAAGAAGGCCGAAAAGCCAAGGCCGACTCCAA
 GGCCGACGAGACCAAGAGGATGCGCCAGCCGATCACAAATGACACTGATGTATGTGGTG
 AACTTCTCCGATTGTCATTGCACCTTTGCTGAGACCTTACAAGATCGAGCCCAATGATGC
 CAACGAGGCCATACAAGTGCCAGAATCCAACGGCGCCAAGCCCGCCACGATAGACGGCA
 GTCTGCCAGATCGGTCTGTCAAGAACCAGGAGCCCGTGGCTACTAGCGATGCCCCCCCAC
 GAACCGATAGCCAGTCCGACCCCGCTTCCGATGGCACCGAGCCAAAGGATCGATTGATG
 CACTTGTACGAGATCGCGACTCGCTACGCGCGGAAGTAGCCGATATGCGAAAATCATTGG
 AACAGATTCAGTCCAAGCATAACAGCAGACATGGAGGCCCTGCAGCAGAAATTGGAGGAT
 GCGGGGAGCAAAAAGGAGCAGGCGGAAACGCAGTTCAGATGCTCCTGGAACGAG

TGATT26

TGGTCTTGATCGGCGGATGCGAAACCGGAACGCTCGCAGACGTCCCCATACCGAACATCA
 GTCCATAACCGCCAAGAGATGCAGCAGAATTACAACCAGCAGAGCAACAACCCGACAA
 CAGCTCCTGTTCCGACGACAAAGCGCACCCGACTCTGTTGCTGTTGCGCGTGGTCCTTCAT
 ATTTCTACATCCTCCTTCTCCACGCCAGCCAAAGAAACACTGGCCAGCGCCATCACCTGAT
 CTATGGCATCAAAAAGTATGATGGCCCTGCACCAACATTTGTCCTCAGCACTGGATAGACT
 GACAGAGCTGCATGGCTGCCATCTTCTGACCCTGATTGGGCAATTTGACAGCAAATATGT
 CAAGAATGTTCTTGATCGAAAATGAACACTGCCCTCTTTCAATGCAGACGGCCACAAAAC
 AGGCATATCATCCAGATCCGAGAAAAAAGCCACTTTCTGTTGAGATGTGTGAGAATCAG
 GGTCAATCATGCCTGTTTTGAGCCATTTGAAT

CGGCA21

CAGTTCCTCGATCAATTAACAGGTTAAATGGTTTTAGGTATGACTGGGTGGTATAATAA
 ATTTATTAAGAACTATGCCACCATTGCATCTCCTATAACGGATACATTAAGGCAGAAACAA
 AAATTTGAATGGGATGAATCTGCCCGAAGGCGTTCTGAAGAGCTTAAGGTGAAGCTTAGT
 TCGGCCCCAGTTTTGCATAGCCAGACTTTAACCTTCCTTTTTCCATACACTGTGATGCCAC
 CCATACAGGTGTAGGCGCCGTGTTGGTATAATCCGCGGACAATAATGAAGAAGTACCACT
 TGCTTTTAGTTGCTAAACCGTTTTAGAGGAGTTATTCCGTAAGTAAAAGGAATGTCTGG
 CAGCTATTCTAGCCATAAAAAAATTCCGAGCTTACGTTGAAGGGCAAAAATTTTCGGTAGT
 TACCGATCATGCTTCGTTAAAATGGCGCATGTCTCAATCTGACTTGAGTTCTCGGTTGGCC
 AGGTGGGCTTTAAAGCTCTAAGGTTTTGAATTTACAATAATTCATAGAAAAGGCAGTCAAA
 ATATTGTCTCCGACACTTTATCGCGAGCGTATACAGAAGATCTCCCTGAAATTACGACCGA
 CTGTTTAATAGATGTGATTAGGCAATTTTAAATCATCCGACTATCAGGAAGTGAAGGCC
 AATATAATAGCCAATCAGTCAAGTTACCGGATGTGAAGGTAGTTGACGGATATATGTAT
 CGTAGAGCCGATCATTATCGGGTGAGAAAATGGCCGATTATCACTGTTGGAACTTTGG
 GCTCCCCAGTTGTTGGTTCCATCCGTCCTTAAAGAGGCCCATGAGCCTCCACTAGCTTCTCA
 TCCTGGGATAAGCAAGATGTTAGCCAAATTGCATCGATATCTTTATTGGCCACAAATGGCC
 GTAGACGTTAAGAAATTTGTGAATGCTTTCGAGAGCTGCAAGTGAATAAGCATCCAAAT
 CGCACATTGCGTCCACCCTTAGGGACATCAGGTCCTACCCATCGCTTCTCCAGAAGCTTTA
 TATAGATTTCTAGGTCCGTACCCACGAAGTCGTGCTGGGAATGTAGGAATACTAGTTATG
 TTAGACCATATGTCGAAGTTTCTTTTCTTACACCAGTTAAAAGTCTGACTGCAGACGCCAT
 TATCAATTATTTAGAGCGGGACTTGTTCCATTGCTTCGGAGTTCCCGAAACTATTGTCTCTG
 ATAACGGTGTG

CACTC23

CACACGGAGCGCATGCGGTAAGTCCGATCCAGATGCAACCTTAGAGGCATATACAACAACA
 CTCTATCGCTACGCCGCGCAGGCGGGCTTCAGCGGTCGTCTCCCTACTTTGATTGAAGAGG
 AATATGAAACCCAAGCCTGTCTGATATTGTTTCTATGGAGTACACCAACCTATCTAAGCC
 AGAACTCAATCCTTTGGTCCAGGATTGGTTCAAATCCACCACGAAAGCGCTATTGCCTGTT
 GCATGGAAAAGACAAGGACACTCAAAGGAAGAAATCGAATCACAGCTTCATCAACTCGAC
 GGCGACATTGAAAGCTCATTCAACGAAGGGGTGGTTCCAGATATGAGGCTTGGGTCTGTT
 TTGGCAAGAAAGCCTTCTAATTTGGGAAGGACACGTTGTTGCAATGATATTTCCCTCGTT
 TACAATGTTGTACGTGAAACATGTGGACAATAAATTGCCATCCAAGTCCCTCTGTCTTTTG
 ATGAGGCCATTGGTGAAGCGCTACTATAGATAAAAAGCCCTGTGTCTTCCAGTGGCGAG
 AGCTGGCTAGTTTAGACTCGTAGGATATCAAAAACATAGCACACGCTTGGGAGAG

TGCC21

TGTCATGGCTATACTTACTCAGGCCATCCTTTGGCTGCGGCTGTAGGTCATGTCTGTCTGG
ATATTATGGAAAGCGAAGGCCTGTTTGAACGGG

TGCC22

TGTGCCCACTGCCGCATACGTACAGCTCTGTGCAGAAATTTTCAAAGCTAGTAAAAATGAAG
TTGAATGCCCTCAAGCTATACCCACACCTCCCGAGGACTTTTGTATTAGGG

TGGCG21

GCGATGTCCTCTTCTCAGCTAGACCAACAGATCTTCTTTGCTCGTATTTTGAAGAAAAGG
CTCAGAGAATCGAGAAAAACAACAAGTCAGGGATATGAATCTAACTCAAGATCCAAAAT
ACAATCAGCCAGGGAAGAGCCACATTATAAGAAACCA

TGGCG22

TGCATCTAATGCAATTTGGCAATCCAACCTCCCAAGTCAAATCATAAAAAAAAAAATTGCATGA
GAAACTATTTGACTTGCTGAAAATGACTGAGAATGGAACGTGCGAGTCTTTGGCTAGAA
CTTGGTGTTAGCGACTGAAAACGGCCAAATAGCGC

GGGG21

GGTTGCACCATACTGCGCCAATTTTTCTAAATGATACGCGGTTGGGTAGCCTTTATGCTTC
GCAAACCATATTACAGAAAAGCTTTGTCCAACCTCAACCATTTCCCTATCCCTAATCACTTT
AGCTAAAATGGATGCTGCGCTAATTTCTTGTACTAGGCTGTGCGCC

GGCC21

GGTATGGGTGTTTCCGGTCTTCTGTTGCTGTCTTTGGGGCTGTTTGCCGTGATGTCTGGCG
TTAGCAGATATTACGCTTCCGTTGTGCAGCCTGTTCCGGTCAGATGTCGTAAACGTCGCTG
AGAGAAGGGC

TGCG21

TGCATGTTGGCTCTCAGAATCTAAAACCTTTTGCTTTTATTCTATTTGCCG

TGCTC21

TGGTTGAAAACGAACGGCAGGCATAACGTTTGCCTTTTGTGACCGGGCGCAGAACAGAAT
CCGCGAGAGGAAAATTCAGGAAAAAAGATCTTCTCCCTCAAGTCCATTCTTCAGAGTGAT
GGAAATTGCAATAGCCTGCGCATTGCGCCCGACACGGTATTGTGCGGATGGGGGCAA

ATGACTGTGCTCCTCTGCGTCATGGCAACTCAGAATCATGCGTTCCAGGTCGGTAACACTG
CCAAGCTGACGCGGAAGCAGCGTGCGCCTCAGATTCGGCTGAATTTCCAGAATCTGGCGG
GCTCTCTTTGCCGCAATGGTGTGTATCAATGTTTCCATTCGCGCACGCTACGACCAGAG

CGGCC21

CGCCGGACGCCAGCCTAGTCACATGCAATGGGCGGCTAATATTGCGCAGTCTGCG

GTGCC21

GTGGGCTGCCTGAATCACACCATAAGGCCCCCGCCATCTGTCATGATGTAGTCATTCAGC
ACAATCAGCCCCGTATGCGGC

TGTCG41

TCGGATGGAGTCATCTAGCTGTTGTCTGAAAGCCGCAGTGTCAGTACGGTTGGTTATTAG
CCTTGGGCTTGGGCTGATATTAGAACCATCAATGTGCAACTCGGCAATGAGGGCTAGGTG
GTCAGAATCCAAGTCCCAGTTTTGGTGCATATTTACTTGGTAATGCTGTATCCCATGGTATA
ATGCAAAATCAATGCAAGAGGGAGTGTGATTGGATATATACGGGTATCTAGTAGGAGAT
CCTGTAGCAAGAATATTAGCGCTTCTGGCTGCAATGGCTTCTGCAAGTTCTCTGCCCTGG
GAGAGTTGTATGAGTCTCCCCACAGCCAATGTCGCGCATTCCAGTCGCCACCAATAAAATA
CCTTTGGCCACAGGAAGCGAGTATGTCGCTGAATTGCCTTTCATCAATTCTGTTCTTGGT
GGGCAGTATATGGCGCA

Anexo 2. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 1, híbridos HR1

Generación	CI		RC1				Híbridos							
	Dk	Db	HF1	HF1	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	
Tamaño (pb)														
171	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
188	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
194	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
209	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
222	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
228	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
234	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
238	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
264	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
280	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
290	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
305	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
318	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
336	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
345	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
356	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
360	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
416	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
428	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
442	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
479	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
487	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
527	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	
550	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	
581	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
621	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
666	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
807	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	
848	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
961	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	
1131	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
1177	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,

RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 3. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 1, híbridos HR2

Generación	RC 2		Híbridos																			
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2				
Sexo	+O	O ₃	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃
Híbridos	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
Tamaño (pb)																						
171	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
188	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
194	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
222	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
228	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
234	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
238	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
296	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
336	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
356	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
360	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
416	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
428	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
479	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
487	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
505	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
527	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
550	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
581	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
621	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
666	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
807	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
961	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
989	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1131	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1177	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 5. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 10, híbridos HR1

Generación	CI			HF1			Híbridos	
	Dk	Db	Db	HF1	Db	Db	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♂	♀	♂	♂	♀	♀
Híbridos	1	2	3	4	6	7	8	9
Tamaño (pb)								
194	1	0	1	0	0	1	1	0
209	0	0	1	0	1	1	0	0
222	1	1	1	0	1	1	1	0
228	0	0	0	0	0	1	0	0
238	1	0	1	1	1	1	1	0
252	1	0	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1
264	1	0	1	0	0	1	0	0
269	1	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	0	1	1	0	0
290	1	1	1	1	1	1	1	1
318	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	0	1	1	1	1	1	1
345	0	0	0	0	0	1	0	0
356	0	0	1	0	0	1	1	0
360	1	0	1	0	0	1	1	0
397	1	1	1	1	1	1	1	1
416	0	1	1	1	1	1	1	0
428	0	1	1	0	0	1	0	0
435	0	1	1	0	0	1	0	0
442	1	0	0	1	1	1	1	0
455	0	1	1	0	0	1	0	0
460	1	1	1	1	1	1	1	0
468	0	0	0	0	0	1	0	0
501	0	1	1	1	1	1	1	0
505	1	1	1	1	1	1	1	1
513	1	1	1	1	1	1	1	0
527	0	1	1	1	1	1	1	0
545	1	0	1	1	1	1	1	0
550	0	0	1	1	1	1	1	0
556	1	1	1	1	1	1	1	0
570	1	0	1	1	1	1	1	0
642	1	1	1	1	1	1	1	0
665	0	1	1	1	1	1	1	0
678	0	0	0	1	1	0	1	0
726	1	0	1	1	1	1	1	0
797	1	1	1	1	1	1	1	0
930	0	0	0	0	0	0	1	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,

RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 6. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 10, híbridos HR2

Generación	RC 2		Híbridos																		
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2		
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
Híbridos	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28	29	
Tamaño (pb)																					
194	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
209	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	
222	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
228	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
234	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
238	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	
256	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
269	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	
280	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
307	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
345	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
356	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
360	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	
385	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
416	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
428	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
435	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
455	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
468	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	
494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
501	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
523	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
527	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
556	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
570	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
642	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
646	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
665	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
678	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
694	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
726	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	
734	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
797	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
838	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
930	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	
942	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
956	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 7. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 10, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																									
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3				
Sexo	+O	O ₃	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O	+O			
Híbridos	11	30	31	38	41	42	43	44	45	46	47	48	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	63	64	65	
Tamaño (pb)																												
194	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
212	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
222	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
228	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
238	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
243	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
256	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
264	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1
280	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
290	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
307	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
318	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
339	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
345	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
356	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
360	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
385	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
416	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
435	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 7 continuación.Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 10, HR3

Generación	RC3		Híbridos																									
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3					
Sexo	+♂	♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂				
Híbridos	11	30	31	38	41	42	43	44	45	46	47	48	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	63	64	65	
Tamaño (pb)																												
442	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
455	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
460	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
468	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
494	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
501	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
527	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
539	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	
550	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
556	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
570	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
630	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
642	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	
646	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
665	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	
678	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
694	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
726	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
734	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
797	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	
830	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
838	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
883	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
930	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
942	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
956	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 8. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 13, híbridos HR1

Generación	CI			RC1				HR1	HR1
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db		
Sexo	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀
Híbridos	68	69	70	71	72	73	74	76	77
Tamaño (pb)									
175	0	0	0	0	0	0	0	0	1
188	0	1	0	0	0	0	1	0	0
194	1	1	1	0	1	1	1	0	0
209	1	1	1	0	0	1	1	0	1
222	1	1	1	0	1	1	1	0	0
228	1	1	1	1	1	1	1	0	1
252	1	0	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	1	1	1	1	1	1	1	0	0
280	0	1	1	0	0	1	1	0	0
286	1	1	1	1	1	1	1	1	1
318	1	1	1	1	1	1	0	1	1
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1
336	0	1	1	0	0	1	1	1	1
345	0	1	1	1	1	1	1	0	1
356	1	1	1	0	0	1	1	0	1
360	0	1	1	0	0	1	1	1	1
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1
416	0	0	1	1	1	1	1	1	1
428	1	1	1	0	1	1	0	1	1
435	0	0	1	0	0	1	1	0	0
455	1	1	1	0	0	1	0	1	0
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1
468	1	1	1	0	0	1	0	0	1
479	1	1	0	0	0	0	0	0	0
492	0	1	1	0	0	1	0	0	1
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1
527	1	0	1	1	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	1	0	1
550	1	1	1	1	1	1	1	0	1
556	0	1	1	1	1	1	0	0	1
570	0	0	1	1	1	1	1	0	1
642	1	1	1	1	1	1	1	1	1
666	0	1	0	1	1	1	0	0	1
678	1	1	0	1	1	0	1	1	1
726	0	0	0	1	1	1	1	0	1
797	1	1	0	1	1	1	1	1	1

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,

RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 9. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 13, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos														
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
Híbridos	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	94
Tamaño (pb)																	
175	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
188	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
194	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
222	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
228	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
252	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
260	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
269	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
286	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
302	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
318	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
323	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
336	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
345	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
356	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
360	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
416	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
428	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
435	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
455	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
460	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
468	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
479	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1
492	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
505	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
513	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
527	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
545	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
556	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
570	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
642	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
666	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
678	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
726	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
797	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 11. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 40, híbridos HR1

Generación	CI			RC1				Híbridos				
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♀
Híbridos	136	137	138	139	140	141	142	144	145	146	147	148
Tamaño (pb)												
194	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
209	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
222	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
228	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
251	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
269	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
279	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
290	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
318	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
326	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
343	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
352	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
360	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
395	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
418	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
428	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
435	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
455	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
460	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
467	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
492	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
500	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
513	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
527	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
570	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
642	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
665	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
678	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
729	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
807	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1177	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,

RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 12. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 40, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos														
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀
Híbridos	146	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	
Tamaño (pb)																	
185	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
194	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
209	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
222	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
228	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
269	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
279	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
290	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
326	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
334	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
343	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
352	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
360	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
395	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
418	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
435	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
455	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
467	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
492	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
500	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
513	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
527	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
545	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
550	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
556	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	
570	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
642	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
665	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
678	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
729	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
797	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
807	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
1057	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
1177	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 13. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 40, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																		
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
Híbridos	151	164	165	167	168	169	170	171	172	177	179	180	181	182	183	185	186	187	188	190	
Tamaño (pb)																					
185	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
194	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
201	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
209	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
222	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
228	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
279	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
326	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
334	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
343	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
352	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
360	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
369	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
395	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
418	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
428	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
435	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
444	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
455	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
467	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
492	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
510	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
527	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
550	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
556	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
570	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
642	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 13 continuación. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo*, familia 40, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																		
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
Híbridos	151	164	165	167	168	169	170	171	172	177	179	180	181	182	183	185	186	187	188	190	
Tamaño (pb)																					
665	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
678	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
729	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
797	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
807	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
857	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
938	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
966	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1003	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1057	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1129	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1177	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 14. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 1, híbridos HR1

Generación	CI		RC1					Híbridos						
	Dk	Db	HF1	HF1	Db	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tamaño (pb)														
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
123	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
139	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
154	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
169	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
199	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
239	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
250	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
269	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
280	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
294	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
330	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
364	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
450	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
529	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
630	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*, RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 15. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 1, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos																
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	8	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Tamaño (pb)																			
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
123	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
139	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
145	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
154	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
169	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
199	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
209	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
239	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
250	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
257	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
269	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
280	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
294	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
330	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
340	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
364	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
422	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
450	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
529	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
598	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
630	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

RC2: parentales retrocruce R2, Db: D. buzzatii, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 17. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 10, híbridos HR1

Generación	CI			RC1			Híbridos	
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♀	♀
Híbridos	1	2	3	4	5	7	8	9
Tamaño (pb)								
110	1	1	1	1	1	1	1	1
123	1	1	1	1	1	1	1	1
139	1	0	0	1	1	1	0	1
145	1	1	0	1	1	1	1	1
154	0	1	0	1	1	1	0	0
169	0	1	0	1	1	1	1	1
186	0	1	0	1	1	1	1	1
199	1	0	0	0	1	1	1	1
209	1	0	0	1	1	1	1	1
239	0	1	0	1	1	1	0	1
250	1	0	0	0	1	1	1	0
269	0	0	0	1	1	0	0	1
379	1	1	1	0	0	0	1	1
397	0	1	0	0	0	0	0	0
422	0	1	1	1	1	1	1	1
438	0	1	1	1	1	0	1	1
467	1	0	0	1	1	0	0	1
549	1	0	0	0	0	0	0	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*, RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 18. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 10, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos																			
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2		
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
Híbridos	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
Tamaño (pb)																						
110	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
116	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
123	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
139	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
154	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
169	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
186	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
199	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
239	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
250	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	
269	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
294	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
379	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
397	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	
422	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
438	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	
467	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
489	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	
571	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 19. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 10, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																																							
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3									
Sexo	+♂	♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂								
Híbridos	11	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	49	50	51	52	53	54	55	56	58	59	60	61	64	65	66	67							
Tamaño (pb)																																										
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						
116	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1				
123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1				
139	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
154	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1			
169	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
186	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
199	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
239	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	
250	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
269	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
280	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
294	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
302	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
379	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
397	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
422	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
438	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
467	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
489	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
549	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
571	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
630	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

RC3: parentales retrocruce R3, Db: D. buzzatii, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 20. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 13, híbridos HR1

Generación	CI			RC1				Híbridos		
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	HR1	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♀
Híbridos	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
Tamaño (pb)										
110	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
116	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
123	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
139	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
145	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
154	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
169	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
186	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
199	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
209	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
239	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
250	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
269	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
294	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
379	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
422	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
438	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
489	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,
 RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 21. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 13, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos																
	HR 1	D b	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	HR 2	
Sexo	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
Híbridos	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	92	93	94	95	
Tamaño (pb)																			
110	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
116	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	
123	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
139	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
154	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
169	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
186	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
199	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
239	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	
250	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	
269	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	
294	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	
330	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	
379	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
397	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
413	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
422	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
438	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
467	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
489	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 22. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 13, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																																									
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3									
Sexo	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀							
Híbridos	79	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135				
Tamaño (pb)																																												
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
116	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1		
123	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0		
139	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1		
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
154	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
169	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
186	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
199	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
209	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
239	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	
250	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	
269	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
294	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
330	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1		
364	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
379	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
397	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	
413	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	
422	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
438	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
467	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
489	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

RC3: parentales retrocruce R3, Db: D. buzzatii, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 23. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 40, híbridos HR1

Generación	CI			RC1			Híbridos					
	Dk	Db	Db	HF1	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	
Sexo	♀	♂	♂	♀	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♂
Híbridos	136	137	138	140	141	142	144	145	146	147	148	
Tamaño (pb)												
110	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
116	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
123	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
139	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
154	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
169	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
186	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
199	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
209	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
239	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
250	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
269	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
280	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
294	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
322	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
379	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
397	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
422	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
438	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
467	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,
 RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 24. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 40, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos														
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2		
Sexo	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂
Híbridos	146	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	162	163		
Tamaño (pb)																	
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
123	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
139	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
154	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
169	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
186	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
199	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
239	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
250	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
269	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
280	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
294	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
322	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
351	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
379	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
388	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
397	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
413	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
422	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
438	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
467	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0

RC2: parentales retrocruce R2, Db: D. buzzatii, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 25. Matriz de datos del transposon display de *Helena*, familia 40, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
Híbridos	151	164	165	166	167	170	171	172	173	174	177	178	180	181	183	185	189	190	
Tamaño (pb)																			
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
123	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
139	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
154	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
169	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
186	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
199	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
239	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
250	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
269	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
280	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
294	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
351	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
364	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
379	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
388	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
397	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
413	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
422	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
438	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
467	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 26 Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 1, híbridos HR1

Generación	CI		RC1					Híbridos							
	Dk	Db	HF1	HF1	Db	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Tamaño (pb)															
191	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
215	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
245	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
294	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
301	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
339	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
348	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
355	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
366	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
398	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
419	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
434	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
443	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
476	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
511	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
532	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,
 RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 27. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 1, híbridos HR2

Generación	RC		Híbridos																		
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2			
Sexo	+♂	♀	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	+♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀		
Híbridos	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
Tamaño (pb)																					
191	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
215	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
245	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
294	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
301	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
339	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
355	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
366	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
370	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
380	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
398	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
411	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	
419	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
434	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
443	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	
483	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
511	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
532	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
573	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
605	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
672	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: D. buzzatii, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 29. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 10, híbridos HR1

Generación	CI			RC1				Híbridos	
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀
Híbridos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tamaño (pb)									
191	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	0	1	0	1	0	1
261	1	0	1	1	0	1	1	1	1
275	1	1	1	1	1	1	0	1	1
283	0	1	0	1	1	0	1	0	1
301	1	1	1	0	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1
366	1	1	1	1	1	1	1	1	0
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	0	1	0	1	0	0	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	0	1	1
411	1	1	1	1	1	1	1	1	0
419	1	0	1	1	0	0	1	0	1
437	0	1	1	0	1	1	1	0	1
442	1	0	1	1	0	1	0	1	0
453	1	0	1	1	1	1	0	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	0	1	1	1	0	0	0	1	1
483	0	1	1	0	1	0	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1
511	1	0	1	1	0	0	1	1	0
520	0	1	1	1	0	1	0	1	1
532	1	1	1	1	1	0	0	1	1
545	1	0	1	1	0	1	1	1	1
583	1	0	1	1	1	1	1	1	1
590	1	1	1	0	1	1	1	0	1
605	1	0	0	1	0	0	0	1	0
631	1	0	1	1	0	0	1	1	0
653	0	1	0	0	1	1	0	0	1
678	0	1	1	0	1	0	0	1	0
849	0	1	0	1	0	1	0	1	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*,
 RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 30. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 10, híbridos HR2

Generación	RC 2		Híbridos																	
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2		
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	
Híbridos	8	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	27	28	29	
Tamaño (pb)																				
191	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
251	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
261	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
275	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
283	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
301	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
339	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
366	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
380	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
411	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	
419	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
437	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
442	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
453	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
483	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
511	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
520	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
532	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	
545	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	
583	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
605	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
618	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	
631	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	
653	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
678	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
735	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
785	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
804	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	
849	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 31. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 10, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																																	
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3			
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂		
Híbridos	11	30	31	33	34	36	37	38	39	40	42	43	44	46	47	48	49	50	51	52	53	56	57	58	60	61	62	63	64	65	66	67				
Tamaño (pb)																																				
191	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
235	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
251	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
261	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1		
275	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
283	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1		
323	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	
339	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
366	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
375	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
380	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
411	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
419	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
437	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
442	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1

RC3: parentales retrocruce R3, Db: D. buzzatii, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 31 continuación.. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 10, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																															
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3				
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂			
Híbridos	11	30	31	33	34	36	37	38	39	40	42	43	44	46	47	48	49	50	51	52	53	56	57	58	60	61	62	63	64	65	66	67		
Tamaño (pb)																																		
453	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
460	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
483	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
511	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
520	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
532	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	
545	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	
583	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
605	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
618	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
631	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
653	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
678	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
735	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
785	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
804	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
849	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 32. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 13, híbridos HR1

Generación	CI			RC1				Híbridos		
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	HR1	HR1	HR1
Sexo	+O	O ₃	O ₃	+O	+O	O ₃	O ₃	+O	+O	+O
Híbridos	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
Tamaño (pb)										
191	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
209	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
261	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
275	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
283	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
294	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
301	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
339	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
348	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
366	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
375	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
399	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
419	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	1		1	1	1	1	1	1	0	1
442	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
453	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
483	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
511	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
520	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
532	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
545	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
565	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
573	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
590	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
605	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
618	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
631	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
639	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
653	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
672	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
684	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
735	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
758	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
785	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
793	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
804	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
849	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
866	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*, RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 33. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 13, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos										
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2
Sexo	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	77	78	79	80	81	84	87	89	91	92	93	94	95
Tamaño (pb)													
191	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
251	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
261	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
275	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
283	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
294	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0
301	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
339	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
366	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
375	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
419	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
442	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
453	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
483	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
511	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
545	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
565	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
573	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
605	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
618	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
631	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
639	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
653	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
672	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
684	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
735	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
758	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
785	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
793	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
804	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
849	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
866	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

RC2: parentales retrocruce R2, Db: D. buzzatii, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Generación	RC3		Híbridos																																	
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3						
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂				
Híbridos	79	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	123	124	125	126	127	128	129	133	135		
Tamaño (pb)																																				
500	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1			
511	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1			
520	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1			
532	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1			
545	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1		
556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0		
565	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1		
573	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
583	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
605	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1		
618	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
631	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
639	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	
653	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
672	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
684	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	
696	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	
735	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	
758	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
785	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
793	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
804	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
849	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
866	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1

RC3: parentales retrocruce R3, Db: D. buzzatii, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 35. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR1

Generación	CI			RC1					Híbridos				
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Híbridos	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
Tamaño (pb)													
191	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
245	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
251	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
261	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
283	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
294	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
301	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
339	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
355	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
366	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
370	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
384	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
419	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
437	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
453	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

CI: cruce interespecifico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*, RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 35 continuación. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR1

Generación	CI			RC1					Híbridos				
	Dk	Db	Db	HF1	HF1	Db	Db	Db	HR1	HR1	HR1	HR1	HR1
Sexo	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♂
Híbridos	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
Tamaño (pb)													
500	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
511	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
573	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
605	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
618	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
631	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
639	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
653	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
672	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
686	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
696	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
735	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
740	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
758	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
785	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
793	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
814	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
838	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
866	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

CI: cruce interespecífico, Dk: *D. koepferae*, Db: *D. buzzatii*, RC1: parentales retrocruce R1, HF1: híbridos F1

Anexo 36. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos															
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2		
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀
Híbridos	146	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163		
Tamaño (pb)																		
191	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
245	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
261	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
283	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
294	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
339	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
355	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
366	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
384	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
419	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
447	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
453	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

RC2: parentales retrocruce R2, Db: D. buzzatii, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 36 continuación. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR2

Generación	RC2		Híbridos														
	HR1	Db	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	HR2	
Sexo	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂
Híbridos	146	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	
Tamaño (pb)																	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
511	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
520	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
573	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
583	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
605	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
618	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
631	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
639	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
653	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
672	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
684	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
701	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
735	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
740	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
758	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
785	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
793	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
804	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	
814	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
838	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
866	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

RC2: parentales retrocruce R2, Db: *D. buzzatii*, HR1: híbridos R1, HR2: híbridos R2

Anexo 37. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																								
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3			
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂			
Híbridos	151	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	179	180	181	182	184	185	186	187	188	189	190	
Tamaño (pb)																											
191	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
245	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
261	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
283	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
294	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
323	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
339	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
355	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
366	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
370	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
384	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
399	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
411	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
419	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
437	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
453	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

RC3: parentales retrocruce R3, Db: D. buzzatii, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 37 continuación. Matriz de datos del transposon display de *Galileo*, familia 40, híbridos HR3

Generación	RC3		Híbridos																								
	HR2	Db	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3	HR3		
Sexo	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
Híbridos	151	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	179	180	181	182	184	185	186	187	188	189	190	
Tamaño (pb)																											
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
511	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
573	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
605	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
618	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
631	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
639	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
653	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
672	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
678	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
686	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
701	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
735	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
740	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
758	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
785	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
793	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
804	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
814	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
838	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
866	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0

RC3: parentales retrocruce R3, Db: *D. buzzatii*, HR2: híbridos R2, HR3: híbridos R3

Anexo 38. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo* para *D. buzzatii*, familia B4

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B18	B19	B20	B23
Tamaño (pb)																	
152	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
186	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
193	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
208	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
211	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
222	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
227	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
233	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
242	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
268	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
279	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
289	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
317	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
343	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
354	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
376	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
395	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
418	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
440	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
458	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
467	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
500	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
504	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
513	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
522	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
544	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
555	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
570	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
641	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
666	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
679	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
729	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
806	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
847	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
966	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1175	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

Db: *D. buzzatii*, F4: Descendencia F4

Anexo 39. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo* para *D. buzzatii*, familia B8

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39
Tamaño (pb)																
152	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
186	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
193	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
208	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
211	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
222	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
227	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
233	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
242	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
268	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
279	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
289	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
317	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
343	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
354	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
360	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
376	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
395	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
440	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
458	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
467	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
504	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
513	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
544	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
550	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
555	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
641	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
666	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
679	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
809	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
966	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Db: *D. buzzatii*, F4: Descendencia F4

Anexo 40. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo* para *D. koepferae*, familia K3

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂
Descendencia	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13
Tamaño (pb)													
152	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
168	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
185	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
208	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
211	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
222	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
228	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
234	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
243	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
268	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
274	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
279	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
289	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
323	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
326	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
333	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
343	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
354	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
360	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
377	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
394	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
418	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
427	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
437	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
459	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
500	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
512	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
527	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
544	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
555	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
580	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
603	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
641	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
666	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Dk: *D. koepferae*, F4: Descendencia F4

Anexo 41. Matriz de datos del transposon display de *Oswaldo* para *D. koepferae*, familia K9

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	K25	K26	K27	K28	K30	K32	K33	K34	K35	K36	K39	K40	K41	K42	K43
Tamaño (pb)															
152	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
208	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
211	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
222	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
228	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
234	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
238	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
243	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
268	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
279	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
289	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
318	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
326	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
343	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
354	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
360	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
394	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
418	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
437	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
445	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
459	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
467	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
505	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
512	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
527	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
544	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
555	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
580	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
641	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
666	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Dk: *D. koepferae*, F4: Descendencia F4

Anexo 42. Matriz de datos del transposon display de *Helena* para *D. buzzatii*, familia B4

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B18	B19	B20
Tamaño (pb)																
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
118	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
139	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
144	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
154	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
169	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
199	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
225	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
240	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
260	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
294	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
322	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
340	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
351	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
360	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
380	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
412	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
438	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
450	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
465	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
500	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
549	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
604	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Db: *D. buzzatii*, F4: generación F4

Anexo 43. Matriz de datos del transposon display de *Helena* para *D. buzzatii*, familia B8

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39
Tamaño (pb)																
110	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
118	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
123	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
139	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
144	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
154	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
169	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
186	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
199	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
209	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
225	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
240	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
260	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
280	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
294	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
322	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
340	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
360	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
380	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
412	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
438	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
450	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
465	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
500	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
529	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
549	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
604	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

Db: *D. buzzatii*, F4: generación F4

Anexo 44. Matriz de datos del transposon display de *Helena* para *D. koepferae*, familia K3

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♂	♂	♂
Descendencia	K1	K2	K3	K4	K10	K11	K13
Tamaño (pb)							
110	1	1	1	1	1	0	1
118	0	1	0	0	1	1	1
123	1	1	0	1	0	1	1
139	1	1	1	1	1	1	0
144	1	1	1	1	1	1	1
154	1	1	0	1	0	0	1
186	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	0	1	1
225	0	1	0	1	0	1	1
250	0	1	0	1	1	1	1
269	1	0	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	0	1	1
294	1	0	0	0	1	1	0
322	1	1	0	1	0	0	1
331	0	1	1	1	1	0	1
366	0	0	0	0	1	1	1
374	0	1	1	1	0	1	1
380	1	0	0	1	1	1	0
399	1	0	0	1	0	1	0
422	0	1	0	1	1	0	1
439	1	1	1	1	1	1	1
467	0	1	0	1	0	1	0
529	0	1	0	0	1	0	0
549	1	1	0	1	0	0	1
598	0	1	0	1	0	1	0

Dk: *D. koepferae*, F4: generación F4

Anexo 45. Matriz de datos del transposon display de *Helena* para *D. koepferae*, familia K9

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	K25	K26	K27	K28	K30	K32	K33	K34	K35	K36	K37	K39	K40	K41	K42	K43
Tamaño (pb)																
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
118	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
139	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
144	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
154	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
186	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
209	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
225	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
250	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
269	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
280	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
294	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
322	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
331	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
366	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
380	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
399	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
422	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
439	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
529	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

Dk: *D. koepferae*, F4: generación F4

Anexo 46. Matriz de datos del transposon display de *Galileo* para *D. buzzatii*, familia B4

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B11	B12	B13	B14	B15	B18	B19	B20
Tamaño (pb)															
191	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
245	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
265	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
276	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
294	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
339	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
366	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
375	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
384	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
398	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
407	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
419	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
442	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
511	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
545	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
573	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
605	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
618	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
631	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
653	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
672	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
678	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
735	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
785	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
793	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
814	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1

Db: *D. buzzatii*, F4: generación F4

Anexo 47. Matriz de datos del transposon display de *Galileo* para *D. buzzatii*, familia B8

Generación	Db	Db	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39
Tamaño (pb)																
191	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
245	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
276	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
294	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
301	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
315	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
339	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
348	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
366	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
375	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
384	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
398	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
407	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
411	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
419	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
437	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
442	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
453	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
460	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
476	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
483	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
500	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
511	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
520	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
532	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
545	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
573	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
583	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
605	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
618	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
631	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
640	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
653	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
672	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
678	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
735	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
785	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
793	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
814	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0

Db: *D. buzzatii*, F4: generación F4

Anexo 48. Matriz de datos del transposon display de *Galileo* para *D. koepferae*, familia K3

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂
Descendencia	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13
Tamaño (pb)													
191	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
222	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
230	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
235	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
265	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
276	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
283	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
294	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
315	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
339	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
355	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
366	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
384	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
419	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
427	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
442	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
492	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
511	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
565	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
583	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
595	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
605	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
618	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
631	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
639	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
662	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1

Dk: *D. koepferae*, F4: generación F4

Anexo 49. Matriz de datos del transposon display de *Galileo* para *D. koepferae*, familia K9

Generación	Dk	Dk	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4	F4
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Descendencia	K25	K26	K27	K28	K30	K32	K33	K34	K35	K36	K37	K39	K40	K41	K42	K43	K44
Tamaño (pb)																	
191	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
222	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
230	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
235	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
251	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
265	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
272	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
276	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
283	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
294	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
315	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
323	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
339	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
355	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
366	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
375	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
384	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
407	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
419	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
427	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
437	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
442	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
476	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
483	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
492	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
500	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
511	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
565	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
583	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
595	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
605	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
618	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
631	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
639	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
662	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
672	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
814	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1

Dk: *D. koepferae*, F4: generación F4

Anexo 50. Publicación científica sobre la aplicación de los AFLP en la detección de eventos de transposición

Reports

Adaptation of the AFLP technique as a new tool to detect genetic instability and transposition in interspecific hybrids

Doris Vela, María Pilar García Guerreiro, and Antonio Fontdevila

Grup de Biologia Evolutiva, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

BioTechniques 50:247–250 (April 2011) doi:10.2144/000113655

Keywords: *Drosophila*; interspecific hybrids; AFLP; FISH; transposition; instability marker

An adapted amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol is presented for detection of hybrid instability in the genome of interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* species. Analyses of 15 AFLP instability markers (new bands detected in hybrids) show that up to 81% are the result of transposable element (TE) activity. Twenty TEs associated with AFLP instability markers have been detected by this method in backcross hybrids and segmental hybrids, demonstrating its validity in detecting transposition events occurring during the hybridization process. New insertions of *Helena* TE have been observed in the hybrid genome after hybridization of the TGTCG22 instability marker by FISH. The AFLP marker technique proved to be an efficient method that improves upon traditional and bioinformatic tools previously used to detect TE mobilization. This newly adapted AFLP protocol may also be applied to a large number of organisms outside the *Drosophila* genus, making it of interest to evolutionary and population genetic researchers working with species where the knowledge of the genome is scarce.

Hybridization occurs in nature more frequently than formerly expected and is followed by a high level of genetic instability in the form of mutations, chromosomal rearrangements, and transposable element (TE) activation in hybrid genomes (1). Some studies with interspecific hybrids have shown a direct relationship between hybridization and transposition rate increases (2,3). Studies of interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* species revealed an increase in transposition of the *Oswaldo* retrotransposon in hybrids when compared with parental species (2).

New experimental techniques and computational tools are being implemented with the objective of obtaining more information about TE mobilization, including an estimation of TE transposition rates. The amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique is a DNA fingerprinting tool widely used for the characterization of DNA (4). This technique is advantageous when compared with classic methods such as chromosomal in situ hybridization or Southern blot, since it provides information on the whole genome without requiring

previous knowledge of the genomes under study. In *Drosophila*, the most widely used technique to detect transposition has traditionally been in situ hybridization on polytene chromosomes, which requires prior knowledge of the genome sequence and TEs (5). This technique requires analysis of a large number of offspring from each hybrid cross and evaluation of many chromosomes. Moreover, the impossibility of analyzing many TEs at one time and the necessity for previous knowledge of chromosomal banding makes this technique difficult to implement. To avoid these drawbacks—especially considering the inexistence of genomic information of many species of *Drosophila* and insect species in general—we present a protocol with the AFLP technique adapted to detect transposition events in the whole genome of *Drosophila*. The tool also may be applied to other insect species. Comparisons of AFLP band pattern between hybrid and parental species allow us to rapidly screen the genomic regions subject to instability in hybrid genomes. Hybrid instability can easily be visualized by the presence of new AFLP bands in hybrids that are absent in

parents. Each new band can be characterized in order to identify the class of TE responsible for mobilization.

To assess the power of AFLP markers in detecting TEs, we have sequenced a new band (marker TGTCG22) detected in hybrids whose nucleotide sequence is homologous to an *exo*-endonuclease region of a *Helena* TE. In situ hybridization of this marker on polytene chromosomes of hybrids and parental species showed new chromosomal bands in hybrids that were not detected in the parental species. Comparison between AFLP and in situ hybridization results allowed us to unequivocally validate the AFLP technique for detecting transposition in hybrids.

Material and methods

The *Drosophila* stocks Bu28 and Ko2 are laboratory strains of *D. buzzatii* and *D. koepferae* species founded from collections of natural populations from Bolivia and Argentina, respectively. Interspecific hybrids were established by crossing two *D. buzzatii* males and one *D. koepferae* female. Thereafter, three successive mass

Reports

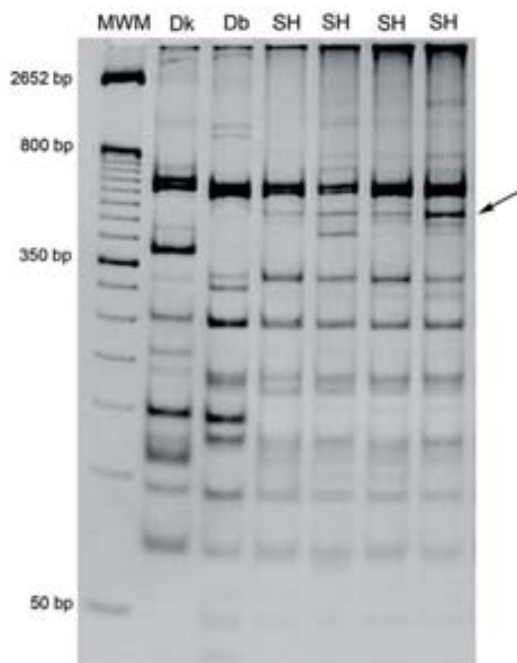


Figure 1. Selective PCR AFLP band patterns using primers with selective nucleotides TG (*EcoRI*) and TCG (*MseI*). The arrow indicates the TGTCG22 instability marker band. MWM, molecular weight marker; Dk, *D. koepferae*; Db, *D. buzzatii*; SH, segmental hybrids (four hybrids).

backcrosses were performed between F1 hybrid females and *D. buzzatii* males to obtain the corresponding backcross hybrids for each generation (BC1, BC2, and BC3).

Segmental hybrids were also obtained using the backcross protocol. They are characterized by hosting specific chromosome fragments of *D. koepferae* in a *D. buzzatii* background. These backcross hybrids were selected each generation by the observation of cytological asynapsis in polytene chromosomes in order to preserve the specific introgressed fragments. To illustrate the general validity of this method to assess transposition phenomena in hybrids, we present the results of a particular segmental hybrid which has been introgressed with the region F3-F4 of chromosome 4.

DNA samples of 14 segmental hybrids, 10 third backcross hybrids (BC3), and their parents were isolated by the usual method of individual DNA extraction (6). Simultaneously, DNA samples were extracted from *D. buzzatii* and *D. koepferae* laboratory stocks.

Genomic DNA was digested with *EcoRI* and *MseI* enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), following the manufacturer's instructions, and linked to adapters *EcoRI* 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'; 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' and *MseI* 5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3'; 3'-CTACTCAGGACTCAT-5' respectively (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The digestion-ligation reaction was prepared in a total volume of 11 μ L with 10 \times T4 Ligation buffer, 0.5 M NaCl, 100 \times BSA, ATP 10 mM, *EcoRI* Adapter 5 μ M, *MseI* Adapter 50 μ M, *EcoRI* 20 U/ μ L, *MseI* 10 U/ μ L, T4 DNA Ligase 10 U/ μ L (Epicentre, Madison, WI, USA), H₂O, DNA (50 ng/ μ L). This reaction was incubated overnight at room temperature. Afterward, the total digestion-ligation reaction was diluted to a 200- μ L final volume.

For preselective PCR reactions, we designed primers by adding one nucleotide (noted in bold) to the previous ones designed for *EcoRI* and *MseI* as follows: 5'-GACTGCGTACCAATTC**T**3' (*EcoRI*), 5'-GATGAGTCTCTGAG-TAAC**T**3' (*MseI*),

from Sigma-Aldrich. A PCR preselective reaction was prepared in a total volume of 20 μ L by adding 10 \times PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 5 U DNA *EcoTaq* polymerase (Ecogen S.R.L., Barcelona, Spain), 2 μ M dNTPs (Roche, Mannheim, Germany), 2.75 μ M *EcoRI*, 2.75 μ M *MseI*, H₂O, and 5 μ L DNA digestion-ligation reaction. Amplifications were run in an MJ Research, Inc. thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) programmed as follows: 2 min at 72°C; 20 cycles of 20 s at 94°C (denaturation), 30 s at 56°C (annealing), 1 min of extension at 72°C then 20 s of final denaturation at 94°C; 2 min of final extension at 72°C; then 30 min of incubation at 60°C. The PCR product was diluted 10 times by adding H₂O to a final volume of 200 μ L.

For selective PCR reactions, two and three selective nucleotides were added (shown in bold) to *EcoRI* and *MseI* primers, respectively (for example, *EcoRI* 5'-GACTGCGTACCAATTC**TG**3', *MseI* 5'-GATGAGTCTCTGAGTA**ATCG**3') and the PCR reaction was performed in a total volume of 20 μ L including: 10 \times PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 5 U DNA *EcoTaq* polymerase, 2 μ M dNTPs, 2.75 μ M *EcoRI*, 2.75 μ M *MseI*, H₂O and 5 μ L of DNA from preselective reaction. The thermocycler was programmed as follows: 2 min of initial denaturation at 94°C; 9 cycles (reducing 1°C each cycle) programmed with 20 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 66°C, and 1 min of extension at 72°C; 20 cycles programmed with 20 s of denaturation at 94°C, 30 s annealing at 56°C, and 1 min extension at 72°C; and finally 20 s of denaturation at 94°C and 30 min incubation at 60°C.

For the AFLP markers, 50 and 32 Eco-Mse AFLP primer combinations were analyzed for BC3 and segmental hybrids, respectively. The AFLP markers were observed in 8% PAGE gels (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) with a 29:1 ratio of acrylamide:bisacrylamide concentration. Electrophoresis was performed in TBE 1 \times buffer using Protean II xi systems (Bio-Rad). DNA bands were calibrated with the molecular weight marker Track It 50-bp Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the samples were subsequently run for 8 h at 100 V.

To clone the instability AFLP markers, we used the same PCR reagents and concentrations as those used in selective PCR reaction using the following PCR amplification program: 4 min of initial denaturation at 94°C; 9 cycles (reducing 1°C each cycle) programmed with 20 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 66°C, and 1 min of extension at 72°C; 20 cycles programmed with 20 s of denatur-

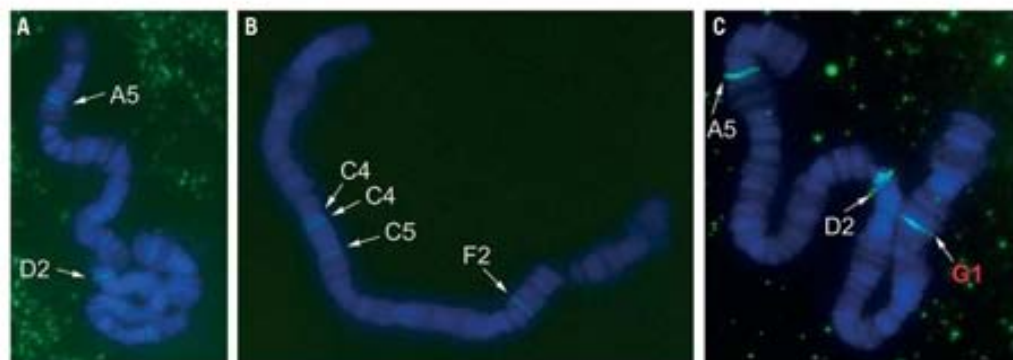


Figure 2. TGTCG22 instability marker in chromosome 5. FISH hybridization of this marker in the parental species *D. buzzatii* (A), *D. koepferae* (B), and in the segmental hybrids (C), a new insertion in G1 chromosomal region in the hybrids.

ation at 94°C, 30 s annealing at 56°C, and 1 min extension at 72°C; and finally 20 s of denaturation at 94°C and 30 min incubation at 60°C. DNA of the AFLP markers was extracted from the agarose 1% gel using a kit for DNA gel extraction (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Plasmid pGem-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) was used to clone AFLP markers. DH5 α *Escherichia coli* cells were transformed with each AFLP marker and cultured at 37°C overnight in Luria-Bertani (LB) plates containing ampicillin and X-Gal. Positive colonies were cultured in a LB-ampicillin medium, followed by miniprep of the samples. Clones of each AFLP marker were sequenced and their nucleotide sequences analyzed using the alignment tools available in Flybase, NCBI, UCSC and G1 databases (7–10). In some cases, we found a direct homology with coding or non-coding regions of *D. melanogaster* genome (the closest sequenced species to *D. buzzatii* and *D. koepferae*). Repbase, the repetitive DNA database of G1, was used to detect homology with transposable elements or repetitive DNA using the forced translated option. The Pfam protein families database (11) allowed the identification of the domains of exo-endonuclease of the *Helena* element. Complementary information obtained from each database was fundamental in the identification of the TEs present in each AFLP marker checked.

To test the repetitive nature of the resulting hybrid instability markers isolated, we selected the TGTCG22 AFLP instability marker as a probe to hybridize, by FISH, in the polytene chromosomes of segmental hybrids and parental species using the Alexa Fluor 488 Signal Amplification Kit for Fluorescein and Oregon

Green Dye–Conjugated Probes (Cat. no. A-11053; Roche) and DAPI, as described by Invitrogen (<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp11053.pdf>).

Polytene chromosomes from salivary glands of segmental *D. buzzatii*–*D. koepferae* hybrids and parental species, were prepared by the squash method (12). Cytological observations were done using a Zeiss Axio Imager A1 (Jena, Germany). Pictures were captured with an Axio Cam MRc5 photographic camera and visualized with the software Axio Vision ACRd 4.5.

Results and discussion

AFLPs detect nucleotide changes in the restriction sites of each enzyme detected by the disappearance of some bands (present in parents) or the addition of new bands. We identified three kinds of markers in polyacrylamide gels using this adapted AFLP method for detection of hybrid genome instability: bands from *D. buzzatii*, bands from *D. koepferae*, and bands originated de novo in the segmental hybrids (instability markers) by transposition (Figure 1). The bands range 50–1000 bp long.

Different AFLP band patterns were observed for each primer combination in BC3 hybrids (50 AFLP primer combinations) and segmental hybrids (32 AFLP primer combinations). Differences were also observed in the number of AFLP genomic bands between hybrids and parental species. The average number of genomic bands observed with Eco-Mse primer combination in BC3 hybrids was: 29.2 bands in hybrids, 21.8 in parental *D. buzzatii*, and 20.8 in maternal *D. koepferae*. In segmental hybrids, the average number of genomic bands was 18.6 in segmental hybrids, 18.5 in parental *D. buzzatii*, and

18.2 in maternal *D. koepferae*. Comparisons between patterns of AFLP bands in hybrids and parental species showed that 9 bands corresponded to instability AFLP markers in BC3 hybrids (detected with 7 AFLP primer combinations) and 11 instability AFLP markers in segmental hybrids (using eight primer combinations). Nucleotide sequences of each AFLP instability marker of BC3 and segmental hybrids were analyzed in Repbase database. The results showed a high percentage (66–81%) of instability markers showing direct homology with some TEs; these markers were named AFLP transposition markers. In BC3, segmental hybrids 6 (66% of hybrid specific markers) and 9 (81% of hybrid specific markers) AFLP instability markers correspond to TEs. The nucleotide sequences of these 15 AFLP transposition markers correspond to 20 transposable elements belonging to classes I and II. The remaining AFLP instability markers corresponded to coding or noncoding regions of the genome.

In some cases, AFLP transposition markers showed simultaneous homology with two transposable elements. This may be due either to the fact that some markers hold 2 or more elements that move together, or to detection of a unique conserved region common to different TE families.

Bioinformatic analyses of the putative protein coded by the transposition marker TGTCG22 (443 bp) showed homology with the exo-endonuclease region of the *Helena* TE. FISH hybridization of this marker in polytene chromosomes of segmental hybrids revealed 9 insertions in segmental hybrids, 6 insertions in *D. buzzatii*, and 12 insertions in *D. koepferae*. From the nine euchromatic insertions of the TGTCG22 marker in polytene chromosomes of hybrids, two

Turning your
imaging
system
visions into
successful
solutions.

The
Right Filter.
Right Now.

Semrock Optical Filters

Put the power of
our experience
into your hands.

www.semrock.com
1-866-SEMROCK

The Standard in Optical Filters for
Life Sciences, Lasers & Optical Systems

(XA2 and 2E2) were found in both parental species and segmental hybrids and three (3H, 5A5, and 5D2) were shared by *D. buzzatii* and segmental hybrids. The four remaining (XH, 2E3, 3F4, and 5G1) were new insertions (absent from parental species) (Figure 2). These new copies of TGTCG22 marker are exclusive of the hybrid genome that may have originated by transposition of *Helena* during the hybridization process.

Both the FISH technique on polytene chromosomes and the adapted AFLP protocol presented in this work enable the detection of TE mobilization in genomes (5,13). However, the AFLP protocol coupled with available bioinformatic tools for analyzing and detecting TEs in sequenced genomes (14–16) offer several advantages. First, its application is faster and easier; second, different TEs can be checked simultaneously. Third, results are highly reliable and previous knowledge of chromosomal banding is not required. Moreover, the AFLP technique showed high resolution in detecting genetic instability by transposition. This technique may be expanded to fit the needs of researchers working with other insect species and their hybrids, especially in cases where genomic information is not available. Therefore, AFLP markers have demonstrated unequivocally to be an efficient tool for studying TEs in a hybridization processes.

Acknowledgments

This research was supported by grant nos. POS2003-05904-C02-01, CGL2006-13423-C02-01, CGL2009-12912-C03-01, and CGL2010-15395 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), and grant nos. 2005SGR 00995 and 2009SGR 636 from Generalitat de Catalunya to the Grup de Biologia Evolutiva. D.V. was supported by a fellowship (PIF) from the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Foudréville, A. 2005. Hybrid genome evolution by transposition. *Cytogenet. Genome Res.* 110:49–55.
2. Labrador, M., M. Farré, F. Utzet, and A. Foudréville. 1999. Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvalko*. *Mol. Biol. Evol.* 16:933–937.
3. Micalak, P. 2008. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity* 102:45–50.

4. Vor, P., R. Hogers, M. Blecker, M. Rejman, T. van de Lee, M. Hoernes, A. Frigiers, J. Pot, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.
5. Biémont, C., L. Monti-Dedieu, and F. Lemunier. 2004. Detection of transposable elements in *Drosophila* salivary gland polytene chromosomes by *in situ* hybridization, pp. 21–28. In W.J. Miller and P. Cagy (Eds.), *Mobile Genetic Elements, Methods in Molecular Biology*, Vol. 260. Humana Press, New York.
6. Laayouni, H., M. Santos, and A. Foudréville. 2000. Toward a Physical Map of *Drosophila buzzatii*: Use of randomly amplified polymorphic dna polymorphisms and sequence-tagged site landmarks. *Genetics* 155:1797–1816.
7. Twerdie, S., M. Ashburner, K. Falli, P. Leyland, P. McQuilton, S. Marygold, G. Milburn, D. Osami-Sutherland, et al. 2009. FlyBase: enhancing *Drosophila* gene ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* 37:D555–D559.
8. Johnson, M., I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Menezhuk, S. McGinnis, and T.L. Madden. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 35:W5–W9.
9. Kent, W.J. 2002. BLAT - the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 12:656–664.
10. Jurka, J., V.V. Kapitonov, A. Pavlicek, P. Klionski, O. Kohany, and J. Walichewicz. 2005. Repeat Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* 110:462–467.
11. Finn, R.D., J. Mistry, J. Tate, P. Coghill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunasekaran, et al. 2010. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 38:D211–D222.
12. Labrador, M., H. Naveira, and A. Foudréville. 1990. Genetic mapping of the *Adh* locus in the Repeta Group of *Drosophila* by *in situ* hybridization. *J. Hered.* 81:85–86.
13. Yu, W., J. Lamb, F. Han, and J. Birchler. 2007. Cytological visualization of DNA transposons and their transposition pattern in somatic cells of maize. *Genetics* 175:31–39.
14. Quesneville, H., D. Nouaud, and D. Anxolabéhère. 2003. Detection of new transposable element families in *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae* Genomes. *J. Mol. Evol.* 57:550–559.
15. Andrieu, O., A. Fiston, D. Anxolabéhère, and H. Quesneville. 2004. Detection of transposable elements by their compositional bias. *BMC Bioinformatics* 5:94.
16. Lerat, E. 2010. Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: how to find your way through the dense forest of programs. *Heredity* 106:520–533.

Received 24 January 2011; accepted 23 February 2011.

Address correspondence to María Pilar García Guerrero, Grup de Biologia Evolutiva, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. e-mail: mariapilar.garcia.guerrero@uab.es

To purchase reprints of this article, contact: biotechiques@futureprinting.com