II congreso de la sociedad española de genética

a coruña - 22 al 24 de septiembre de 1999

libro de actas

PROGRAMA CIENTÍFICO

MIÉRCOLES, 22

Sede del congreso: Facultad de Informática. Campus de Elviña.

9:00 – 10:45: **Workshops**

Sala A: Genética en acuicultura

Sala B: Modelos genéticos cuantitativos y heterosis

Sala C: Mutagénesis ambiental

10:45 – 11:15: Café

11:15 – 12:10: **Workshops**

Sala A: Genética en acuicultura

Sala B: Modelos genéticos cuantitativos y heterosis

Sala C: Mutagénesis ambiental

12:15 – 12:45: **Inauguración oficial del congreso**. Salón de Actos.

12:50 – 14:15: **Conferencia Plenaria**

Dr. Victor Corces "The role of chromatin insulators in nuclear organization and gene expression".

Patrocinada por Amersham Pharmacia Biotech.

14:15 – 15:30: Comida

15:30 – 16:30: Café y **sesión de posters**. Pabellón de Estudiantes.

16:30 – 17:45: **Workshops y comunicaciones orales seleccionadas.**

Sala A: Genética en acuicultura

Sala B: Modelos genéticos cuantitativos y heterosis

Sala C: Mutagénesis ambiental

JUEVES, 23

Sede del congreso: Facultad de Informática. Campus de Elviña.

9:00 – 11:15: **Workshops y comunicación oral seleccionada**.

Sala A: Desarrollo y evolución

Sala B: Organización y comparación de genomas

Sala C: Modificación genética y medio ambiente

11:15 – 11:45: Café

11:45 – 12:45: **Workshops y comunicación oral seleccionada.**

Sala A: Desarrollo y evolución

Sala B: Organización y comparación de genomas

Sala C: Modificación genética y medio ambiente

12:45 – 14:15: **Conferencia Plenaria**

Dr. Brian Charlesworth "The evolution of sex chromosomes and dosage compensation".

Patrocinada por Leica Microsystems

14:15 – 15:30: Comida

15:30 – 16:30: Café y **sesión de posters**. Pabellón de Estudiantes.

16:30 – 17:45: **Workshops**

Sala A: Desarrollo y evolución

Sala B: Organización y comparación de genomas

Sala C: Modificación genética y medio ambiente

VIERNES, 24

Sede del congreso: Facultad de Informática. Campus de Elviña.

9:00 – 11:15: **Workshops y comunicación oral seleccionada.**

Sala A: Genética molecular humana

Sala B: Genética de poblaciones y evolución

Sala C: Tendencias actuales en la genética bacteriana

11:15 – 11:45: Café

11:45 – 12:45: **Workshops y comunicación oral seleccionada.**

Sala A: Genética molecular humana

Sala B: Genética de poblaciones y evolución

Sala C: Tendencias actuales en la genética bacteriana

12:45 – 14:15: **Conferencia Plenaria**

Dr. Manuel Perucho "Cáncer gastrointestinal hereditario y esporádico".

Patrocinada por Innogenetics Diagnóstica y Terapéutica, S.A

14:15 – 15:30: Comida

15:30 – 16:30: Café y **sesión de posters**. Pabellón de Estudiantes.

16:30 – 17:45: **Workshops**

Sala A: Genética molecular humana

Sala B: Genética de poblaciones y evolución

Sala C: Tendencias actuales en la genética bacteriana

18:00: Salón de actos: **Reunión de la S.E.G.**

programa workshops

Genética en Acuicultura

Sala A, miércoles 22

Coordinadoras: Dra. **Josefina Méndez Felpeto**. Dpto. Biología Celular y Molecular. Universidade da Coruña.
Dra **M. Carmen Alvarez Herrero**. Dpto. de Biología Celular y Genética. Universidad de Málaga.

9:00-10:45: Dr. **Luis Cornudella Mir**. Dpto. de Biología Molecular y Celular. Centro de Investigación y Desarrollo. CSIC, Barcelona.
Título de la conferencia: "**Nucleoproteínas espermáticas y su estructura génica en genomas haploides de invertebrados marinos**".

Dra. **Laura Sánchez Piñón**. Dpto. de Biología Fundamental. Universidade de Santiago de Compostela.
Título de la conferencia: "**Caracterización citogenética y molecular de peces de interés en acuicultura: Salmónidos y Pleuronectiformes**".

11:15-12:10: Dr. **Eleftherios Zouros**. Institute of Marine Biology of Crete. Grecia.
Título de la conferencia: "**The evolutionary consequences of the exceptional mitochondrial DNA system of mussels**".

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dra. **M. Carmen Alvarez Herrero**. Dpto. de Biología Celular y Genética. Universidad de Málaga.
Título de la conferencia: "**Peces transgénicos y acuicultura**".

Dr. **Miguel A. Toro Ibáñez.** Dpto. Mejora Genética y Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.
Título de la conferencia: "**Mejora genética en acuicultura**".

Comunicación Oral: **Resultados preliminares sobre la variabilidad genética en el cangrejo de río autóctono *Austropotamobius pallipes.*** Ochando, M.D.; Beroiz, B. y Alonso, F.

Comunicación Oral: **Organización de secuencias repetidas de ADN en núcleos paquiténicos de dorada (*Sparus aurata*).** De La Herrán, R.; Cuñado, N.; Garrido-Ramos, M.A.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M. y Santos, J.L.

Modelos genéticos cuantitativos y heterosis

Sala B, miércoles 22

Coordinador: Dr. **Jesús Moreno González**. Dpto. de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. CSIC-Xunta de Galicia, A Coruña.

9:00-10:45: Dr. **José Crossa**. Centro Internacional de Mejora de Maíz y Trigo. México.
Título de la conferencia: "**Modelos multiplicativos para el análisis de ensayos de variedades en ambientes múltiples**".

Dr. **Emilio Carbonell Guevara.** Instituto Valenciano de Investigación Agraria.
Título de la conferencia: "**QTLs: modelos estadísticos en la genética de caracteres cuantitativos**".

11:15-12:10: Dr. **Juan Altarriba Farran**. Dpto. de Anatomía, Embriología y Genética Animal. Universidad de Zaragoza.
Título de la conferencia: "**Modelos de valoración genética de candidatos a la selección**".

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Antonio Martín Muñoz.** Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba.
Título de la conferencia: "**Poliploidía y heterosis: la tribu *Triticeae* como modelo**".

Dr. **Jesús Moreno González**. Dpto. de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. CSIC-Xunta de Galicia, A Coruña.
Título de la conferencia: "**Métodos para detectar heterosis con marcadores moleculares**".

Comunicación Oral: **Mapa de ligamiento de QTLs (Quantitative trait loci) para resistencia a jopo (*Orobanche crenata*) y tamaño de grano en *Vicia faba*.** Román, B.; Torres, A.M.; Rubiales, D.; Macas, J.; Pozarkova, D. y Cubero, J.I.

Comunicación Oral: **Variabilidad genética y respuesta realizada de variables de comportamiento en ganado bovino de lidia.** Cañón, J.; Gutiérrez, J.P. y Vallejo, M.

Mutagénesis Ambiental

Sala C, miércoles 22

Coordinador: Dr. **Miguel Angel Comendador García.** Dpto. Biología Funcional. Universidad de Oviedo.

9:00-10:45: Dra. **Carmen Pueyo de la Cuesta**. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.
Título de la conferencia: "**Papel de las ADN-Alquiltransferasa en la mutagénesis por haloalcanos**".

Dr. **Felipe Cortés Benavides.** Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla.
Título de la conferencia: "**Topoisomerasas de DNA: mecanismos de acción y posible papel en la reparación del daño genético**".

11:15-12:10: Dr. **Ricardo Marcos Dauder**. Dpto. de Genética i Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Mejoras metodológicas en la evaluación del daño genético inducido en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos**".

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dra. **María Sierra Zapico**. Dpto. de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.
Título de la conferencia: "**Espectros de mutación, mecanismos de reparación y *Drosophila*: información privilegiada**".

Dr. **Ekkehart W. Vogel**. Dpt. of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis. Leiden University. Medical Center. Leiden. Holanda.
Título de la conferencia: "**Genetic damage by anticancer drugs in germ cells: correlations with their acute toxicity and carcinogenicity**".

Comunicación Oral: **Efecto de la ligasa de T4 en la modulación del daño inducido por radiación ionizante y agentes radiomiméticos en células en cultivo.** Ortiz, T.; Piñero, J.; Edreira, A. y Ledesma, M.A.

Comunicación Oral: **Biomonitorización de trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas. Niveles de daño genético (micronúcleos) y su relación con el genotipo GST**. Marcos, R.; Lucero, L.; Pastor, S.; Suárez, S.; Parrón, T.; Gómez, C.; Durbán, R. y Creus, A.

Desarrollo y Evolución

Sala A, Jueves 23

Coordinador: Dr. **Jaume Baguñà Monjo**. Dpto. Genética. Universitat de Barcelona.

9:00-11:15: Dr. **Jaume Baguñà Monjo** y Dr. **Emili Saló Boix**. Dpto. Genética, Universitat de Barcelona.
Título de la conferencia: "**¿Qué aportan las filogenias basadas en el gen ribosómico 18S y los genes Hox sobre el origen y radiación de los metazoos bilaterales?**".

Dr. **Jordi García Fernández.** Dpto. Genética. Universitat de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Hox, ParaHox, ProtoHox: el genoma de anfioxo en los estudios de Evo-Devo**".

Comunicación Oral: **Un paso más en la caracterización del gen MBL y de su papel en el desarrollo de *Drosophila*.** García-Casado, M.Z.; Navarro, P.; Terol, J. y Pérez-Alonso, M.

11:45-12:45: Dra. **Pilar Cubas Domínguez**. Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid.
Título de la conferencia: "**Cycloidea y la evolución de la asimetría floral**".

Comunicación Oral: **Comparative analysis of male reproductive-tract esterases: how sex-specific expression patterns are structurally compartmentalized and assimilated during evolution.** Torrado, M.; Paz, M.; Korochkin, L.I. y Mikhailov, A.T.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Sergio González Crespo.** Centre d'Investigació i Desenvolupament. CSIC, Barcelona.
Título de la conferencia: "**Desarrollo y evolución de los apéndices de Artrópodos**".

Dr. **José Luis Gómez Skarmeta**. Dpto. Biología. Universidad de Chile. Santiago.
Título de la conferencia: "**Comparación de la función de las homoproteínas de la familia iroquois en vertebrados e invertebrados**".

Organización y Comparación de Genomas

Sala B, Jueves 23

Coordinador: Dr. **Nicolás Jouve de la Barreda**. Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá de Henares.

9:00-11:15: Dr. **Pere Arús Gorina**. Dpto. Genética Vegetal, IRTA, Barcelona.
Título de la conferencia: "**Mapas y comparación de genomas en frutales de la familia de las rosáceas**".

Dr. **Katherine M. Devos.** Cambridge Laboratory, Johns Innes Center, Norwich Research Park, U.K.
Título de la conferencia: "**Current status of grass comparative genetics**".

Comunicación Oral: **Localización cromosómica de elementos transponibles en especies de *Drosophila.*** Pérez-Muñoz, A.; González-Guzmán, M.; Martínez-Sebastián, M.J. y de Frutos, R.

11:45-12:45: Dr. **José E. Pérez-Ortin.** Dpto. Bioquímica. Universitat de Valencia.
Título de la conferencia: "**Organización molecular del genoma de *Saccharomyces cerevisiae***".

Comunicación Oral: P**eriodicidad 3 en secuencias de ADN: presencia y ausencia en relacion a distintas categorias evolutivas.** Barral, J.; Hasmy, A. y Naveira, H.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Alfredo Villasante.** Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC, Madrid.
Título de la conferencia: "**La heterocromatina de *Drosophila*: estructura y función**".

Dra. **Ángeles Cuadrado Bermejo.** Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá de Henares.
Título de la conferencia: "**Organización de secuencia repetidas y microsatélites en plantas**".

Modificación Genética y Medio Ambiente

Sala C, Jueves 23

Coordinador: Dr. **Horacio Naveira Fachal.** Dpto. Biología Celular y Molecular. Universidade da Coruña.

9:00-11:15: Dra. **C. Tahía Benítez Fernández**. Dpto. Genética. Universidad de Sevilla.
Título de la conferencia: "**Mejora de cepas del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* para su utilización como biofungicidas**".

Dr. **José Luis García López**. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC, Madrid.
Título de la conferencia: "**Diseño de biocatalizadores para la desulfuración de petróleo**".

Comunicación Oral: **Construcción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de utilizar lactosa.** Díaz Prado, S.; Siso, M.I.G.; Cerdán, M. E. y Becerra, M.

11:45-12:45: **Dr. Armand Sánchez Bonastre.** Unidad de Genética y Mejora Animal. Universitat Autónoma de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Organismos transgénicos en producción animal. Mitos y realidades**".

Comunicación Oral: **Resistencia al virus Y de la patata en plantas transgénicas portadoras del gen CPLMV.** Ceballos, E.; Martínez De La Hidalga, A.; Ruiz De Galarreta, J.I. y Ritter, E.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Juan José Estruch.** Novartis Company. USA.
Título de la conferencia: "**Plantas resistentes a insectos. Un análisis de la situación actual**".

Dra. **Blanca San Segundo de los Mozos**. Centro de Investigación y Desarrollo. CSIC, Barcelona.
Título de la conferencia: "**Mejora genética en plantas: obtención de resistencias frente a la infección por patógenos o al ataque de insectos**".

Genética Molecular Humana

Sala A, Viernes 24

Coordinadora: Dra. **Roser Gonzàlez Duarte**. Dpto. Genética. Universitat de Barcelona.

9:00-11:15: Dr. **Ángel Carracedo Álvarez**. Instituto de Medicina Legal. Universidade de Santiago de Compostela.
Título de la conferencia: "**Nuevas tecnologías para el análisis de la variabilidad genética**".

Dr. **Santiago Rodríguez de Córdoba.** Unidad de Patología Molecular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.
Título de la conferencia: "**Alcaptonuria 1902-1998 de los "errores metabólicos congénitos" de Garrod al proyecto Genoma Humano**".

Comunicación Oral: **Clonación y análisis molecular de las regiones implicadas en una translocación X/10 asociada a un fenotipo muy complejo.** Martínez Garay, I.; Jablonka, S.; Kutsche, K.; Nothwang, H. y Gal, A.

11:45-12:45: Dr. **Roderic Guigó i Serra.** Institut Municipal d'Investigació Médica. Barcelona.
Título de la conferencia: "**Bioinformática, acortando el camino entre la secuencia y la función**".

Comunicación Oral: **Homocisteina y el alelo MTHFR 677 C-T en pacientes españoles con infarto prematuro.** Grinberg, D.; Garcia-Giralt, N.; Ferrer, I.; Vilaseca, M.A.; Pintó, X. y Balcells, S.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dra. **Roser Gonzàlez Duarte**. Dpto. Genética, Universitat de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Bases genéticas de enfermedades complejas: el síndrome de Down**".

Dra. **Marta Izquierdo Rojo**. Dpto. Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
Título de la conferencia: "**Terapia génica**".

Genética de las Poblaciones y Evolución

Sala B, Viernes 24

Coordinador: Dr. **Marcelino Pérez de la Vega**. Dpto. Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.

9:00-11:15: Dr. **Jim. M. Lake**. Molecular Biology Institute. U.C.L.A. Los Angeles – California. USA.
Título de la conferencia: "**Relating horizontal transfer to gene function**".

Dr. **Alfredo Ruiz Panadero**. Dpto. Genética y Microbiología. Universitat Autónoma de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Cartografía molecular en el género *Drosophila*: patrones y procesos de evolución entre el gen y el cromosoma**".

Comunicación Oral: **Variabilidad genética de la resistencia a insecticidas microbianos en la polilla de las crucíferas.** Ferré, J.; Granero, F. y Ballester, V.

11:45-12:45: Dr. **Luis Serra Camó** y Dra. **Marta Pascual Berniola** Dpto. Genética. Universitat de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Variación molecular y estructura poblacional en especies del grupo *obscura* de *Drosophila***".

Comunicación Oral: **Mutation rate heterogeneity in the mtDNA second hypervariable region (HVII).** Salas, A.; Lareu, Mv.; Calafell, F.; Bertranpetit, J. y Carracedo, A.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Carlos Polanco de la Puente**. Dpto. Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.
Título de la conferencia: "**El espaciador intergénico del DNA ribosomal: algo más que un simple espaciador**".

Dr. **Eladio Barrio Esparducer**. Dpto. Genética e Insto. "A.J. Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva". Universitat de Valencia.
Título de la conferencia: "**¿Es el genoma mitocondrial de *Drosophila* un marcador molecular neutral?**".

Tendencias Actuales en la Genética Bacteriana

Sala C, Viernes 24

Coordinador: Dr. **Alfonso Jiménez Sánchez.** Dpto. Genética. Universidad de Extremadura.

9:00-11:15: Dr. **Antonio Tormo Garrido**. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid.
Título de la conferencia: "**Fase estacionaria de bacterias: comportamiento GASP**".

Dr. **Antonio Juárez Giménez.** Dpto. Microbiología. Universitat de Barcelona.
Título de la conferencia: "**Topología del DNA y regulación de la expresión génica en bacterias**".

Comunicación Oral: **Topología de los intermediarios de replicación.** Olavarrieta-Scappini, L.; Martínez-Robles, M.L.; Krimer, D.B.; Hernández, P. y Schvartzman, J.B.

11:45-12:45: Dr. **Josep Casadesús Pursals.** Dpto. Genética. Universidad de Sevilla.
Título de la conferencia: "**Metilación DAM: un mecanismo de memoria de la célula bacteriana**".

Comunicación Oral: **Relación estructura-funcion en NtrB. Análisis mutacional.** Martínez-Argudo, I.; Martín Nieto, J.; Maldonado, R.; Salinas, P. y Contreras, A.

15:30–16:30: Sesión de posters

16:30-17:45: Dr. **Alfonso Jiménez Sánchez**. Dpto. Genética. Universidad de Extremadura, Badajoz.
Título de la conferencia: "**Inducción térmica del inicio de la replicación cromosómica en *Escherichia coli***".

Dr. **Richard D'Ari.** Centre National de la Recherche Cientifique: Institut Jacques Monod. Paris.
Título de la conferencia: "**Amplification of the ftsQAZ genes in *Escherichia coli***".

conferencias plenarias

THE ROLE OF CHROMATIN INSULATORS IN NUCLEAR ORGANIZATION AND GENE EXPRESSION

Víctor Corces
John Hopkins University, USA

Current models to explain regulatory mechanisms underlying eukaryotic gene expression rely heavily on ideas derived from prokaryotic systems. These models assume that transcriptional enhancers account for the temporal and spatial specificity of eukaryotic gene expression by serving as binding sites for transcription factors that can then activate transcription by looping out intervening sequences and contacting components of the promoter-bound transcription complex. But many phenomena, observed in a variety of systems, suggest that this picture is too simplistic to realistically explain the complexity of the eukaryotic genome and the variety of patterns of gene expression that are required for proper development of higher eukaryotes. DNA in the eukaryotic nucleus wraps around histone complexes to form nucleosomes, and the resulting primary chromatin fiber is organized into higher order domains that arise from further compaction. In addition, the organization of this fiber within the nucleus, probably through the attachment to specific subnuclear structures, is also important for the regulation of gene expression. This complex organization of the DNA, in the form of chromatin and within the nucleus, would appear to preclude the type of interactions necessary to activate transcription, which presumably require contacts among proteins bound to enhancers and promoters. Some of the regulatory input that controls eukaryotic gene expression must thus be directed to the establishment and maintenance of this higher order domain organization, and transcriptional activation might involve the alteration of this organization in a manner that permits enhancer-promoter interactions (Corces, 1995).

Various functional assays have been used to identify DNA sequences that affect transcription by establishing domains of organization of the DNA within the nucleus. These sequences have been named insulator or boundary elements. The structural attributes and cellular properties of proteins that bind to these sequences are beginning to give insights into the role of nuclear architecture in the regulation of gene expression, and might explain aspects of eukaryotic transcription difficult to comprehend simply based on prokaryotic models (Gerasimova and Corces, 1996). Insulator elements have been identified based on two different properties: their ability to interfere with enhancer-promoter interactions and their capacity to buffer a transgene from chromosomal position effects by conferring position-independent expression to the integrated transformed sequences. Using as an assay system one or both of these properties of insulators, these novel regulatory sequences have been identified in a variety of systems. Our lab has been studying an insulator present in the gypsy retrovirus of *Drosophila*. This element is 350 bp in length and is located in the 5' transcribed untranslated region of gypsy, upstream from the start of the *gag* open reading frame (Gdula et al., 1996). The gypsy insulator was originally identified by the nature of the mutations induced by insertion of this retroelement. In most instances, gypsy inserts into non-coding regions of genes and causes a tissue-specific mutant phenotype due to the inactivation of specific enhancers. The

inactivated enhancers are always located distal to the insertion site with respect to the promoter. This polar effect on transcription is one of the characteristic properties of insulator elements, and the mutagenic effect of gypsy on adjacent genes can be explained exclusively by the presence of the internal insulator element (Geyer and Corces, 1992). The gypsy insulator contains 12 copies of a 26 bp sequence composed of a core element similar to the octamer motif found in various vertebrate enhancers and promoters. This insulator is perhaps the best-studied system with respect to the characterization of protein components that interact with insulator DNA. One of these components, the suppressor of Hairy-wing [su(Hw)] protein, contains 12 zinc fingers involved in DNA binding; interaction of the su(Hw) protein with its target sequence is a pre-requisite for proper insulator function, as mutations that disrupt the zinc fingers hamper the ability of the insulator to repress enhancer-promoter interactions (Harrison et al., 1993). In addition, su(Hw) contains two acidic domains, located in the amino- and carboxy-terminal ends of the protein. These two domains are dispensable for the effect of the insulator on enhancer function and its ability to buffer against chromosomal position effects. An a-helical region homologous to the second helix-coiled coil region of basic HLH-bzip proteins is absolutely required for insulator function (Harrison et al., 1993). Since leucine zipper regions usually mediate protein-protein interactions, and su(Hw) does not interact with itself, this observation suggests the involvement of other proteins, in addition to su(Hw), in the formation of the boundary element. A second component of the su(Hw) insulator has been identified by searching for mutations that alter gypsy-induced phenotypes. Mutations in the *modifier of mdg4* [*mod(mdg4)*] gene reverse the polar effect of the insulator on enhancer function. Null mutations are embryonic lethals, but hypomorphic mutations partially disrupt insulator function and result in a partially active enhancer. The *mod(mdg4)* gene encodes at least three different proteins, arising from alternatively spliced RNAs, that contain a BTB domain (Gerasimova et al., 1995). The BTB domain is present in various transcription factors including GAGA, a transcriptional activator encoded by the *Trithorax-like* (*Trl*) gene. Genetic and molecular analyses suggest that mod(mdg4) proteins interact directly with su(Hw) and therefore constitute a second component of the gypsy insulator.

An important insight into the mechanisms by which the *mod(mdg4)* protein affects insulator function came from the observation that mutations in this gene behave as an enhancer of position effect variegation, enhancing the phenotype of classical variegating alleles such as *white-mottled 4* (w^{m4}). In addition, the *mod(mdg4)* gene also displays properties characteristic of *trithorax-group* (*trxG*) genes. Mutations in *mod(mdg4)* in fact satisfy all three criteria previously established as required for membership in the trxG gene family: they enhance the phenotype of *trxG* mutations, suppress the dominant *Polycomb* (*Pc*) phenotype and decrease the expression of homeotic genes such as *Ubx*, *Ant*, *Scr* and *AbdB* (Gerasimova et al., 1998). These results, indicating that *mod(mdg4)* has properties characteristic of *E(var)* and *trxG* genes, are very informative in giving us clues as to the mechanisms by which insulators affect enhancer function. The results suggest that the mod(mdg4) protein is involved in establishing higher order levels of chromatin structure, supporting the notion that the gypsy insulator affects gene expression at

this level, and that the normal role of insulators might be to establish domains of gene expression by regulating chromatin structure at higher order levels of organization.

Some of the properties of *mod(mdg4)* as an *E(var)* and *trxG* gene suggest that the effects of the gypsy insulator on enhancer function might take place not only at the level of the organization of the primary chromatin fiber, but also by regulating the establishment of higher order domains of chromatin organization. Insulator-binding proteins, through interactions among themselves and perhaps with specific subnuclear structures, establish functional domains of gene activity. Enhancer elements present in one domain can activate transcription from promoters located in the same domain. When a second insulator is inserted between the two enhancers, the new insulator separates the original domain into two topologically isolated ones. Under these conditions, the enhancer present in one domain is unable to activate transcription from a promoter located in the second one. Evidence supporting this model comes from the analysis of the properties and distribution of the mod(mdg4) protein described above. The mod(mdg4) protein is present in approximately 500 sites on polytene chromosomes of *Drosophila* larvae. Half of these sites overlap with sites of su(Hw) localization, such that mod(mdg4) is present in all su(Hw) sites but the two proteins do not overlap in the rest. It is thought that these sites correspond to endogenous insulators that play a role in the normal organization of the genome. In a *su(Hw)* mutant fly, neither su(Hw) nor mod(mdg4) are present at common sites, suggesting that the two proteins interact and that su(Hw) is necessary for the binding of mod(mdg4) to the chromosomes. In addition, mod(mdg4) overlaps with other trxG and PcG proteins at some but not all chromosomal locations (Gerasimova and Corces, 1998).

An important clue to explain the mechanism of insulator action came from the observation that mutations in *trxG* genes enhance the effect of the gypsy insulator whereas mutations in *Pc* have the opposite effect and reverse the effect of the insulator on enhancer-promoter interactions. Interestingly, trxG and PcG proteins such as trx, GAGA, ash1, and Pc are not present at gypsy insulator sites, suggesting that their effect on the insulator is indirect. The effect of these proteins on insulator function appears to be at the level of the subnuclear distribution of insulator components. The su(Hw) and mod(mdg4) proteins are not distributed uniformly in the nuclei of interphase diploid cells. Rather, they appear to be localized in a punctated pattern, with dots dispersed throughout the nucleus but concentrated mainly in the nuclear matrix. The number of dots per nucleus varies between 20 and 30, and the patterns of su(Hw) and mod(mdg4) localization are identical. This suggests that 20-40 individual DNA binding sites for these two proteins come together in specific subnuclear regions. Interestingly, trxG and PcG proteins are also distributed in a punctated pattern that is relegated mostly to the central region of the nucleus and does not overlap with that of su(Hw)/mod(mdg4). The distribution of trxG and PcG proteins is not altered by mutations in *su(Hw)* or *mod(mdg4)*, but the punctated pattern of su(Hw)/mod(mdg4) localization changes dramatically in the presence of mutations in *trxG* or *PcG* genes (Gerasimova and Corces, 1998).

In *trxG* mutants, the su(Hw) and mod(mdg4) proteins loose their nuclear localization and appear distributed in a diffuse pattern mostly in the cytoplasm. In the background of *Pc* mutations, the localization of these two proteins is nuclear, but the punctated patter disappears to give rise to a uniform nuclear localization. These results suggest a model in which both insulator components and members of the trxG and PcG proteins function to organize the chromatin fiber within the nucleus by attaching the DNA to specific nuclear compartments. The su(Hw) and mod(mdg4) proteins are mostly involved in organizing the DNA around the nuclear periphery, perhaps by attaching the chromatin fiber to the nuclear matrix. trxG and PcG proteins appear to play a similar role in the central region of the nucleus. The relative effects of mutations in the genes encoding these proteins suggest that trxG and PcG proteins play a primary role in this organization in that the structure set up by these proteins is required for the establishment of insulators. The role of su(Hw) and mod(mdg4) is secondary and it is not required for the primary level of organization established by trxG and PcG proteins (Gerasimova and Corces, 1998). The localization of insulator components to the nuclear matrix and their possible role in the organization of the chromatin fiber within the nucleus are properties characteristic of scaffold or matrix attachment regions (SARs or MARs). The similarity between properties of the gypsy insulator described above and those of MARs/SARs suggest that these two types of sequences might play similar or identical roles in the biology of the eukaryotic nucleus. MARs/SARs are AT-rich DNA sequences, often containing topoisomerase II cleavage sites, that mediate the anchoring of the chromatin fiber to the chromosome scaffold or nuclear matrix and delimit the boundaries of discrete and topologically independent higher order domains. Proteins bound to these sequences tether the chromatin fiber into structural loops held together by the components of the chromosome scaffold. It is easy to visualize how these structural domains that organize the chromosome could also serve a functional purpose to organize genes into specific hierarchies of regulated transcription by acting as boundary or insulator elements. Whether the ability of MARs/SARs to act as insulators is a general phenomenon is not clear at this time, but the localization of protein components of the gypsy insulator to the nuclear matrix strongly suggests similar biological roles and mode of action for these two types of regulatory elements.

References

Corces, V. G. (1995). Chromatin insulators. Keeping enhancers under control. **Nature 376**, 462-463.

Gdula, D. A., Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (1996). Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93**, 9378-9383.

Gerasimova, T., Gdula, D. A., Smith, P. A., Gerasimov, D. V., and Corces, V. G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. **Cell 82**, 587-597.

Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (1996). Boundary and insulator elements in chromosomes. **Curr. Opin. Genet. Dev. 6,** 185-192.

Gerasimova, T. I. and Corces, V. G. (1998). Polycomb- and trithorax-group proteins mediate the function of a chromatin insulator. **Cell 92**, 511-521.

Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* Zn finger protein. **Genes Dev. 6**, 1865-1873.

Harrison, D. A., Gdula, D. A., Coyne, R. S., and Corces, V. G. (1993). A leucine zipper domain of the *suppressor of Hairy-wing* protein mediates its repressive effect on enhancer function. **Genes Dev. 7**, 1966-1978.

THE EVOLUTION OF SEX CHROMOSOMES AND DOSAGE COMPENSATION

Brian Charlesworth
University of Edinburgh, UK

Sex chromosomes have evolved independently in many groups of animals and plants. The final phase of their evolution often produces morphologically and genetically distinct X and Y chromosomes, which fail to recombine along all or part of their length (Bull 1983; Charlesworth 1996). This is associated with an almost complete erosion of genes from the Y chromosome, with the exception of genes with functions specific to the heterogametic sex. It is generally believed that the Y chromosome of a group such as mammals or *Drosophila* was originally homologous to an ancestral X chromosome, and has subsequently lost its genetic activity. The possession of a genetically eroded Y chromosome in many groups with differentiated sex chromosomes is associated with dosage compensation, such that the activity of most X-linked genes is effectively the same in males and females (Charlesworth 1996).

Elucidation of the evolutionary causes of these phenomena is a challenge for both theoreticians and experimentalists. The first step in the evolution of sex chromosomes is the establishment of restricted recombination between a proto-X and proto-Y. This probably involves the need to prevent recombination among genes with primary sex-determining roles, since such recombinants would be likely to be neuters or hermaphroditic. The proto-X and proto-Y chromosomes probably differed only with respect to such loci. Subsequently, selection for alleles which are advantageous in males but disadvantageous in females can lead to further genetic differentiation between the two sex chromosomes, and to selection for suppression of recombinational exchange over most or all of their length (Rice 1996). This sets the scene for further evolution of the incipient Y chromosome.

Three main theories of the degeneration of a Y chromosome are currently favoured (Charlesworth 1996; Rice 1996). Each involves the special situation faced by a large block of non-recombining genes subject to mutation and selection. In a infinitely large population, a balance between mutation and selection at many loci is established, such that a stable distribution of the number of deleterious mutations per chromosome exists, with properties determined by the mode of selection and the mutation rate. The first model is known as “Muller’s ratchet”. It involves the stochastic loss of the class of chromosomes carrying the smallest number of deleterious mutations in a population of finite size. In the absence of recombination and back mutation, this “least-loaded” class of chromosome cannot be replaced after it has been lost. In a haploid genome (such as a proto-Y chromosome), each loss of a least-loaded class is accompanied by fixation of one deleterious mutation at a locus on the chromosome in question (Charlesworth & Charlesworth 1997). If the ratchet is operating sufficiently fast, it can thus lead to the gradual impairment of gene function on the proto-Y chromosome.

The second model is that of genetic hitchhiking: if an adaptive gene substitution takes place in the non-recombining portion of an incipient Y chromosome, it causes the fixation of all linked deleterious mutations present on the chromosome on which it originated. Successive selective sweeps of this kind would lead to the fixation of deleterious alleles at many Y-linked loci (Rice 1987).

The third model is known as "background selection" (Charlesworth 1996). A weakly selected mutation that arises in a large non-recombining population has a non-zero chance of survival only if it arises on a chromosome free of deleterious mutations. This is because chromosomes carrying one or more strongly selected deleterious mutations are rapidly eliminated from the population, carrying any new variants with them. The effective population size of a non-recombining chromosome can be greatly reduced by background selection, if the deleterious mutations are sufficiently abundant, leading to an acceleration of the fixation of deleterious mutations on a proto-Y chromosomes, and a retardation of the fixation of advantageous mutations (Charlesworth 1996).

The selective force that drives the evolution of dosage compensation is related to the decline in mean fitness of carriers of the Y chromosome, which may be caused by any of these three mechanisms. The increased abundance of Y-linked deleterious mutations relative to the X chromosome means that it is selectively advantageous to increase the activity of X-linked genes in the heterogametic sex, at the expense of the activity of their Y-linked homologues (Charlesworth 1996). This could ultimately lead to a complete down-regulation of genes on the Y chromosome, except for those which lack functionally equivalent counterparts on the X.

A useful testing-ground for these theories is provided by the existence of neo-X and neo-Y chromosomes, which are created by the translocation of an autosome to an X or Y chromosome, and hence have a known ancestry. Given the lack of crossing over in male *Drosophila*, an autosome that forms a neo-Y chromosome will immediately be exposed to the above forces that can cause degeneration. Several such systems, of varying age, are known in the genus *Drosophila*. Given the conservation of gene content among chromosome arms (Muller's "elements") in this genus, these systems provide the opportunity to use data on molecular variation and evolution of genes on the neo-X and neo-Y chromosomes to test the predictions of the models (Charlesworth 1996).

The first prediction, common to all three models, is that the process of evolution of a completely degenerate neo-Y chromosome, and of full dosage compensation of the genes on the neo-X chromosome, should be very slow. The comparative evidence from *Drosophila* supports this prediction (Charlesworth 1996). *D. pseudoobscura* has a neo-X chromosome formed by fusion of element D to the true X, which occurred about 13 million years old. There is apparently complete dosage compensation of genes on the neo-X, and loss of activity of all genes on the neo-Y. *D. miranda* has a neo-Y chromosome formed by the fusion of element C with the true Y chromosome, which is absent from its relative *D. pseudoobscura*. These species diverged about 2

million years ago. A substantial fraction of the genes on the neo-Y have become non-functional or completely lost, and their homologues on the X have become dosage compensated, but many loci still retain their function (Steinemann & Steinemann 1998). The neo-Y of *D. americana* is the product of a fusion between element B and the X chromosome, which are unfused in the closest relatives of *D. americana*, such as *D. texana* and *D. virilis. D. americana* and *D. texana* are separated by only very small genetic distances, so that the neo-Y may only be a few tens of thousands of years old. Genetic experiments indicate that most loci on this chromosome are active (Charlesworth *et al.*, 1997).

Investigations of the properties of genetic variation on the neo-X and neo-Y chromosomes will help to discriminate between the models, particularly if loci which are still active on the neo-Y chromosome can be studied. All three models predict a considerable reduction in effective population size for the neo-Y, which should manifest itself in much less nearly-neutral variation for genes on the neo-Y compared with that for their homologues on the neo-X. The operation of Muller's ratchet is thought to require the least-loaded class to be very small in size. Since this essentially determines the effective population size, no sequence variation is likely to be seen in samples of neo-Y chromosome alleles if the ratchet is operating. Hitchhiking on a non-recombining chromosome is expected to leave a signature of departure from equilibrium expectation among any variants that are detected, in contrast to the expectation under background selection. In addition, there should be an acceleration of the accumulation of deleterious nucleotide substitutions on the neo-Y, and a retardation of the accumulation of favourable substitutions. Data on DNA sequence variation among neo-Y alleles at the *Lcp* loci of *D. miranda* suggest that there is too much variation to be consistent with the operation of Muller's ratchet, and that selection against deleterious amino-acid replacements is completely ineffective. Although these results are far from conclusive, further investigations of this kind should enhance our understanding of sex chromosome evolution.

References

Bull, J. J., 1983 **Evolution of Sex Determining Mechanisms**. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA.

Charlesworth, B., 1996 The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. **Curr. Biol. 6**: 149-162.

Charlesworth, B.& D. Charlesworth, 1997 Rapid fixation of deleterious alleles by Muller's ratchet. **Genet. Res. 70**: 63-73.

Charlesworth, B., D. Charlesworth, J. Hnilicka, A. Yu & D. Guttman, 1997 Lack of degeneration of loci on the neo-Y chromosome of Drosophila americana americana. **Genetics 145**: 989-1002.

Rice, W. R., 1987 Genetic hitch-hiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. **Genetics 116**: 161-167.

Rice, W. R., 1996 Evolution of the Y sex chromosome in animals. **Biosciences 46**: 331-343.

Steinemann, M. & S. Steinemann, 1998 Enigma of Y chromosome: neo-Y and neo-X chromosomes of Drosophila miranda a model for sex chromosome evolution. **Genetica 102/103**: 409-420.

CÁNCER GASTROINTESTINAL HEREDITARIO Y ESPORÁDICO

Manuel Perucho
Oncogene & Tumor Suppressor Gene Program. The Burnham Institute.
10901 North Torrey Pines Road. La Jolla, California 92037, USA.

El cáncer del tracto digestivo, principalmente de colon y estómago, es el segundo en importancia epidemiológica en países desarrollados tras el cáncer de pulmón y el tercero a nivel mundial tras el cáncer de pulmón y hepático. En países como EEUU 131.600 nuevos casos de cáncer colorectal y 22.600 de estómago ocurrieron en el año 1998. España sigue tendencias semejantes, mientras que países asiáticos como Japón, muestran una incidencia invertida con liderazgo del carcinoma gástrico. Pese a la sutil mejora en mortalidad durante los últimos años, ambos tumores siguen constituyendo problemas sanitarios de primer orden.

Estudios epidemiológicos han probado la relación de estos tipos de cáncer con diversos factores ambientales, fundamentalmente dietarios. Además, el cáncer de colon presenta un componente genético claro. Junto a los casos denominados esporádicos, dada la ausencia en ellos de una base hereditaria probada, existen una serie de síndromes polipósicos y no polipósicos en los que se registra una elevada incidencia de cáncer. Estos síndromes de transmisión hereditaria de penetrancia variable conforman lo que se conoce como “cáncer familiar”. Los dos síndromes mas representativos son la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer hereditario no polipósico (HNPCC). La situación del cáncer gástrico es semejante, con una mayoría de casos esporádicos y una minoría ligados a síndromes hereditarios, como el HNPCC.

La oncogénesis digestiva se produce por dos vías paralelas moleculares que conllevan diferentes inestabilidades genómicas:

La inestabilidad cromosómica, todavía no muy bien caracterizada, pero que tiene como denominador común la alteración del balance cromosómico, subyace a la ruta supresora, y se asocia con en el desarrollo de tumores aneuploides. Pertenecen a este grupo la mayoría de los tumores esporádicos de colon (aproximadamente el 85% del total) y los hereditarios de la FAP que representan alrededor del 1%.

b) La inestabilidad de secuencias repetidas simples o microsatélites que conduce al desarrollo de tumores de la ruta mutadora, que son en su mayoría diploides o pseudodiploides. La mayoría de tumores de colon hereditarios no polipósicos (HNPCC), que representan alrededor del 5%, así como una minoría (10%) de los esporádicos siguen esta ruta oncogénica.

Inestabilidad cromosómica en la ruta supresora

El cáncer de colon es posiblemente uno de los modelos tumorales mejor estudiados en lo referente a sus alteraciones genético-moleculares. El cáncer colorectal se produce por la activación de oncogenes (K-ras) y la inactivación de genes supresores tumorales (APC y p53) por mutaciones puntuales y por deleciones de las regiones cromosómicas correspondientes del alelo residual, evidenciadas en los ensayos de pérdida de heterozigosidad (Loss of Heterozigosity o LOH). En los casos hereditarios, la mutación somática en el alelo normal del gen APC inicia el desarrollo de miles de pólipos en el colon. La mutación posterior de otros genes tumorales (K-ras y p53), propician la evolución de los pólipos colónicos hacia la lesión neoplásica maligna a través de una serie de estadios bien definidos histológicamente.

Inestabilidad de microsatélites y la ruta mutadora

Mediante el uso de DNA fingerprinting por AP-PCR en 1993 describimos la existencia de una nueva clase de genes, que cuando son inactivados por mutación (*mutación mutadora*) desencadenan una inestabilidad genética que subyace a una ruta mutadora nueva hacia la oncogénesis. Estas *mutaciones mutadoras*, que inactivan genes reparadores de DNA, son responsables de la acumulación de cientos de miles de mutaciones somáticas de carácter clonal en microsatélites, debido a la incapacidad de reparar errores en la replicación por alineamiento desigual en las cadenas de DNA. La inestabilidad de microsatélites es una característica diagnóstica del cáncer colorectal no ligado a poliposis hereditario (HNPCC) así como de otros tumores esporádicos y hereditarios del tracto gastrointestinal. Los tumores de colon del fenotipo mutador de microsatélites (MMP) presentan una incidencia baja paradójica de mutaciones en los genes anteriormente descritos (APC, *ras* y p53) típicos de los tumores de la vía supresora.

Genes tumorales diana del MMP

En el cáncer del MMP, las mutaciones se acumulan indiscriminadamente a lo largo del genoma de la célula neoplásica. No obstante, es la activación y/o inactivación de los genes tumorales (oncogenes y genes supresores) la que confiere ventaja proliferativa. El receptor del gen transformante del crecimiento beta tipo 2 (TGFβRII), fue el primer *gen tumoral* en el que se demostró una vinculación a la ruta mutadora. Este gen posee un poly(A)10 que sufre mutaciones en más de un 80% de los tumores de colon de la ruta mutadora, pero estas mutaciones están ausentes en los tumores de la ruta supresora. Al TGFβ se le considera actualmente como un gen supresor tumoral, en base a su probado efecto inhibitorio de la proliferación celular.

Conexión entre el MMP y el escape de la apoptosis

BAX es otro gen tumoral implicado en la oncogénesis de la ruta mutadora. Los genes BAX y Bcl2 mantienen un equilibrio antagónico que regula la entrada de la célula en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. El aumento de expresión de

BAX, induce la apoptosis. El gen BAX contiene una secuencia diana, poly(G)8, que sufre deleciones o inserciones de uno o dos nucleótidos en la mitad de los cánceres de la ruta mutadora de colon y en algo mas de un 60% de los de estómago. Este hallazgo es una prueba mas de la conexión existente entre el fenómeno de apoptosis y el desarrollo del cáncer. Además, ayuda a explicar la asociación paradójica negativa de los tumores de la ruta mutadora con mutaciones en el gen supresor p53. P53 es un transactivador de BAX, al recoger la señal de daño genómico. Pero en presencia de mutaciones de frameshift en el gen BAX, su activación transcripcional por la p53 es inútil. La inactivación mutacional del gen BAX hace así innecesaria la presencia de mutaciones en el gen p53, puesto que la cadena de eventos moleculares conducentes a la apoptosis esta rota en un eslabón posterior. En estudios recientes hemos comprobado la selección positiva de estas mutaciones *in vivo*.

Razón subyacente a las diferentes rutas moleculares oncogénicas

El cáncer gastrointestinal del fenotipo mutador de microsatélites representa una ruta molecular distinta para la oncogénesis (la ruta mutadora) porque los genes tumorales mutados son diferentes de aquellos mutados en la vía clásica de oncogénesis (la ruta supresora). Y esto es simplemente debido a que algunos genes tumorales contienen secuencias repetidas que los hacen exquisitamente susceptibles a sufrir mutaciones en células cancerosas de la ruta mutadora, lo que resulta en la inactivación de sus productos génicos. Por tanto, la presencia de secuencias repetidas en un subgrupo de genes tumorales, en conjunción con defectos en los sistemas de reparación de estas mutaciones espontáneas es la razón última de la existencia de estas dos vías moleculares distintas de oncogénesis. Además, la naturaleza de las mutaciones en secuencias repetidas también explica la naturaleza aleatoria pero inexorable de los eventos que conducen al cáncer. Después de la mutación mutadora, las mutaciones en el gen BAX ocurren en general antes que en el de la p53, porque éste no tiene en su región codificante secuencias repetidas tan largas como las 8 Gs del BAX.

Aplicaciones clínicas del diagnóstico de tumores de la ruta mutadora

El diagnóstico de tumores de la ruta mutadora es fácil mediante la identificación de alteraciones en microsatélites. Este diagnóstico es útil en la clínica puesto que sirve para identificar casos de familias con cáncer hereditario; a su vez, este diagnóstico conduce a la búsqueda del gen mutador y la mutación mutadora correspondiente, que implica un ensayo directo de detección de los miembros afectados en las familias. Además, el diagnóstico de cánceres del fenotipo mutador de microsatélites, tanto con o sin componente hereditario, conlleva una información útil para el pronóstico del paciente de cáncer, y últimamente al diseño de estrategias de tratamiento y prevención.

Conclusiones

Las rutas supresora y mutadora se pueden diferenciar porque los tumores correspondientes manifiestan diferencias claras en su fenotipo, no solo a nivel celular (como el grado de diferenciación), sino también en sus manifestaciones clínicas (como el grado de invasión). Las diferencias en fenotipo de los tumores de estas dos rutas moleculares son debidas en último término a diferencias en sus genotipos. La relación genotipo-fenotipo se empieza a entender varios años después del descubrimiento de la ruta mutadora y de las mutaciones mutadoras que la originan. Que los tumores de una vía molecular sean diferentes fenotípicamente de los tumores de la otra vía molecular es debido a diferencias en el espectro de los genes tumorales correspondientes. Y que los tumores de una ruta molecular tengan mutados una serie específica de genes tumorales es simplemente debido a la presencia o ausencia en la estructura primaria de estos genes de estas secuencias repetidas cuya propensión a sufrir mutaciones, cuando falla el sistema de reparación de las mismas, caracteriza a la ruta mutadora.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Casares, S., Ionov, Y., Ge, H-Y., Stanbridge, E. and Perucho, M. (1995) The microsatellite mutator phenotype for cancer is often recessive. **Oncogene, 11**, 2303-2310.

Fearon, E. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell 61**, 759-767.

Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature, 363**, 558-561.

Kolodner, R.D. (1995). Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. **Trends Biochem. Sci. 20**, 397-401.

Malkhosyan S. Rampino N. Yamamoto H and Perucho M. (1996). Frameshift mutator mutations. **Nature, 382**, 499-500.

Markowitz S. Wang J. Myeroff L. Parsons R. Sun L. Lutterbaugh J. Fan RS. Zborowska E. Kinzler KW. Vogelstein B. et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-b Receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. **Science 268**, 1336-1338.

Marra, G. and Boland C.R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): the syndrome, the genes, and historical perspectives. **J. Natl. Cancer Institute 87**, 1114-1125 (1995).

Perucho, M. (1998). Cancer del fenotipo mutador de microsatelites. **Investigacion y Ciencia, 261**, 46-55.

Perucho, M. (1996). Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. **Nature medicine, 2**, 630-631.

Perucho, M., Peinado, M. A., Ionov, Y., Casares, S., Malkhosyan, S.& Stanbridge, E. (1994). Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mechanism for oncogenesis. **Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 59**, 339-348.

Rampino N. Yamamoto H. Ionov Y. Li Y. Sawai H. Reed J and Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science, 275:** 967-969.

Shibata, D., Peinado, M.A., Ionov, Y., Malkhosyan, S. and Perucho, M. (1994). Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. **Nature Genetics, 6**, 273-281.

Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J. Tsugita, A., Terzaghi, E., and Inouye, M. (1966). Frameshift mutations and the genetic code. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol 31**, 77-84.

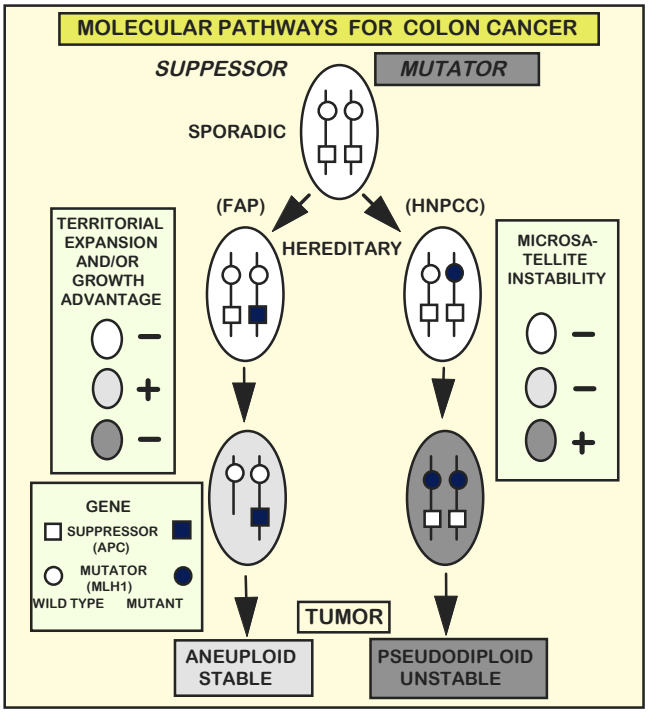

Figura 1. Rutas moleculares del cáncer colorectal. El modelo de Alfred Knudson, propuesto para el retino-blastoma, se ilustra en el caso particular del cancer de colon de la vía supresora. En este modelo, para iniciar el proceso que conduce al cancer (aneuploide) se requiere la mutación en los dos alelos del gen supresor. La ruta mutadora que conduce al cancer (quasi-diploide) sigue un proceso similar, mediante la inactivación mutacional de los dos alelos mutadores. La diferencia entre una y otra ruta reside en que la mutación en el gen supresor conduce a una ventaja de crecimiento o expansión territorial, mientras que la mutación mutadora no.

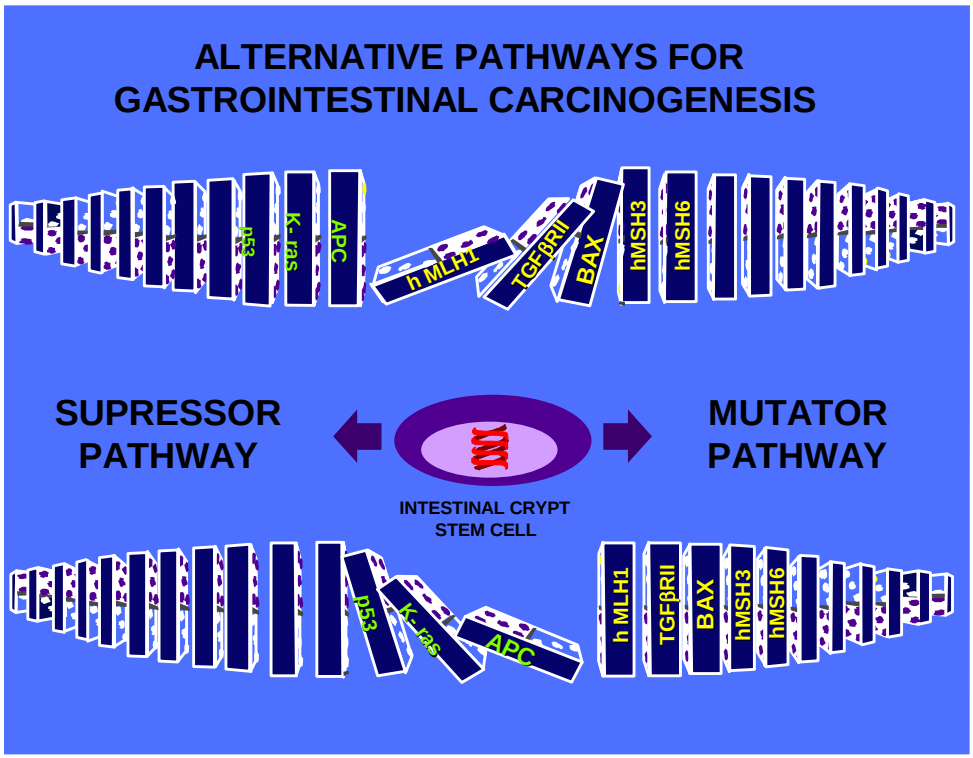

Figura 2. Figura 2. El diagrama ilustra el carácter aleatorio aunque direccional, del proceso que conduce al cáncer gatrointestinal. En la ruta mutadora, tras la mutación por ejemplo en el gen mutador *hMLH1*, la probabilidad de ocurrencia de mutaciones en los genes tumorales específicos de esta vía (*TGFβRII*, *BAX*, etc) es mucho mayor que la probabilidad de ocurrencia en los genes tumorales propios de la vía supresora. (*APC*, ras, p53) porque los primeros contienen secuencias repetitivas, dianas del MMP, mientras que los segundos carecen de ellas (*panel superior*). En ausencia del MMP mutaciones en secuencias repetidas no se ven favorecidas (*panel inferior*).

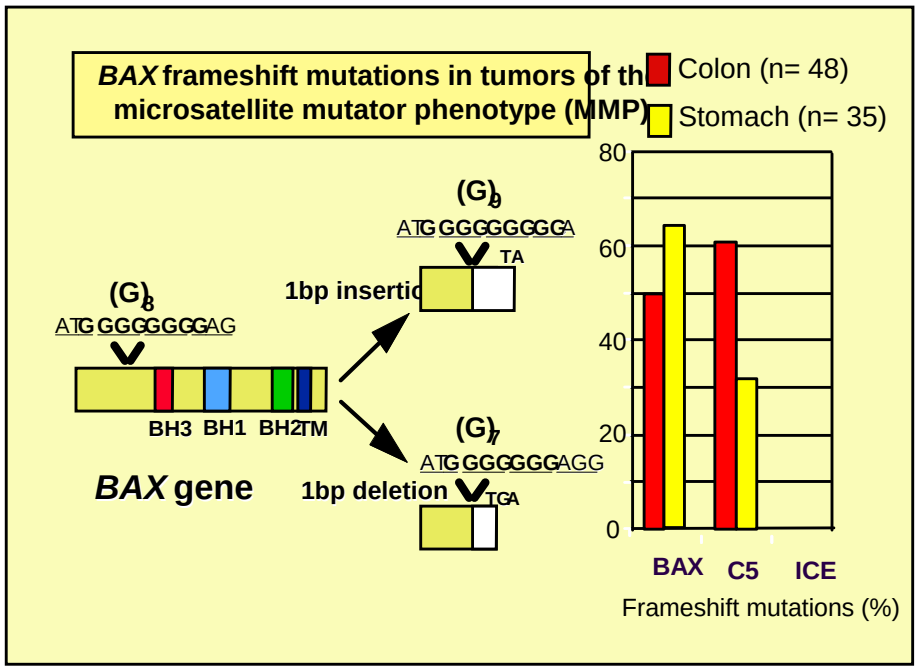

Figura 3. Mutaciones de errores de fase de lectura ("frameshift") en el gen pro-apoptótico BAX. El diagrama representa la estructura primaria del gen BAX, con sus dominios de homodimerización; éstos son relevantes en la activación de su potencial apoptótico, conducente al suicidio celular. En presencia del MMP, la repetición de $(G)_8$ presente en la región amino terminal es una diana para mutaciones de deslizamiento ("slippage") que conducen a su inactivación por truncamiento de la proteína. Estas mutaciones son frecuentes en tumores de la ruta mutadora pero ausentes en los de la ruta supresora.

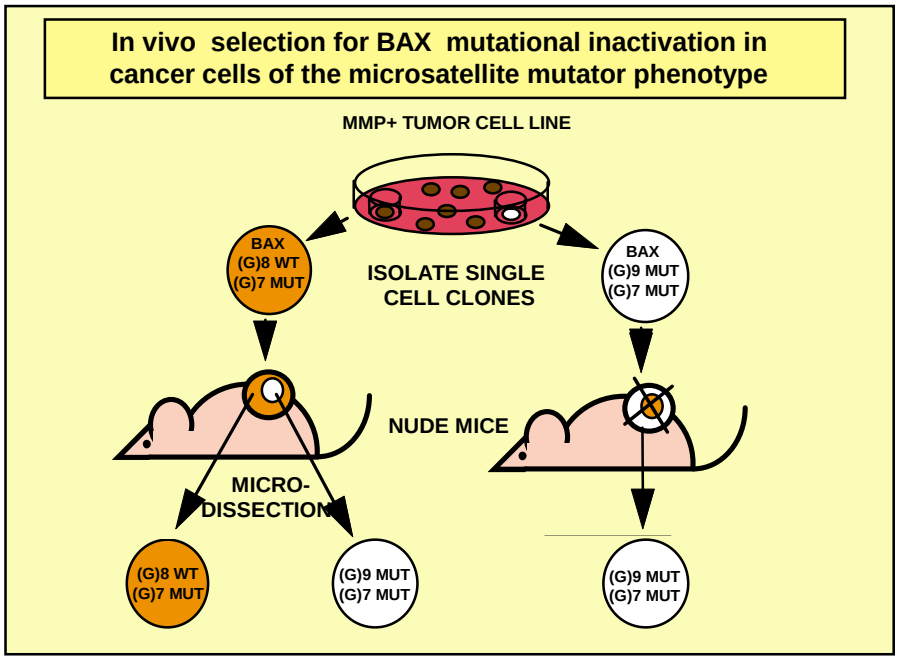

Figure 4. Selección *In vivo* de la inactivación del gen BAX. El resultado de los ensayos de tumorigenicidad en ratones inmunodeficientes demuestra que la inactivación del alelo normal del gen BAX está sometida a una fuerte selección positiva.

workshop
genética en acuicultura

NUCLEOPROTEÍNAS ESPERMÁTICAS Y SU ESTRUCTURA GÉNICA EN GENOMAS HAPLOIDES DE INVERTEBRADOS MARINOS

Luís Cornudella
Departamento de Biología Molecular y Celular. Instituto de Biología Molecular del CSIC. Jordi Girona, 18-26. E-08034 Barcelona

La cromatina eucariote es un complejo nucleoproteico macromolecular esencialmente constituido por DNA y proteínas básicas. Las Histonas, de relativa conservación evolutiva, son las proteínas genuinas de la cromatina somática y están implicadas en la jerarquización estructural de la fibra cromatínica. Sin embargo estas proteínas no representan la única manera de empaquetar el DNA para acomodarlo en el interior del núcleo celular. En realidad existen muchas otras alternativas para realizar este cometido. Un claro exponente de ello ocurre en la Espermatogénesis que implica la compactación reversible del DNA en una estructura cromatínica inerte susceptible de ser descondensada con celeridad en el instante de la fertilización. En general, las histonas somáticas asociadas al DNA resultan substituidas durante el proceso de desarrollo que culmina en el espermatozoide maduro. Ha sido posible comprobar que el DNA en los gametos masculinos se asocia a una gran diversidad de proteínas básicas, tanto en composición química como número, reflejando la sorprendente variedad de moléculas proteicas existentes en los distintos grupos de animales. Esta abarca desde aquellas especies que retienen las histonas o variantes cercanas, otras en las que aparentemente se da la coexistencia con variantes específicas de esperma, hasta aquéllas en las que ocurre una completa substitución por moléculas de mayor basicidad como las nucleoprotaminas o por moléculas equiparables a éstas, aunque distintas de las de mamíferos y peces. La información química disponible engloba una gran variedad de vertebrados: anfibios, aves, peces y mamíferos. Entre los invertebrados la información es mucho más escasa, destacando ciertas especies de moluscos y equinodermos. Los rasgos distintivos de la mencionada variabilidad son: (a) en aquellos casos en los que la dotación somática de las histonas aparece conservada, una mayoría de especies exhiben al menos un componente adicional específico del esperma; (b) las variantes de histona específicas de esperma poseen mayor basicidad que la de las correspondientes somáticas; (c) existe una correlación directa entre el grado de condensación de la cromatina espermática y el carácter de las proteínas asociadas al DNA.

Es evidente que el incremento de la basicidad de las proteínas espermatogénicas repercutirá en la eficiencia de empaquetamiento del DNA. Obviamente, en el espermatozoide esta situación esta justificada como medio para proteger la dotación genómica. Con todo, no puede descartarse una adaptación evolutiva del espermatozoide para soportar el almacenaje y transporte del DNA en ausencia de mecanismos de reparación. El motivo de la variabilidad de las nucleoproteínas espermatogénicas es desconocido y su significado funcional, así como la repercusión a nivel molecular, todavía no clarificados. La existencia de variantes de histonas en los linajes germinativos y de tipos proteicos específicos de esperma sugiere que la compactación del DNA no es la sola finalidad, sino también otras exigencias más discriminatorias, impuestas por las transiciones estructurales de la cromatina

relacionadas con la modulación de la actividad génica durante la Espermiogénesis y su quiescencia final.

Se han propuesto diversos categorismos, basados en criterios citoquímicos y de composición aminoacídica, para abarcar la transición Histona↔Protamina en células germinales. Para algunas de ellas se ha sugerido una hipotética relación evolutiva originada en la histona H1, basándose en la peculiar composición proteica observada en el esperma de algunos moluscos bivalvos. La histona H1 y todos sus subtipos constituyen, entre las clases de histonas, la más heterogénea. La variabilidad evolutiva de las secuencias se concentra en las extensiones terminales carboxílicas y de los grupos amino de las moléculas, mientras que el núcleo globular central, de carácter hidrofóbico, se mantiene substancialmente conservado. Esta organización asimétrica ha impulsado a sugerir que el terminal carboxílico se halla implicado en la compactación de orden superior de la cromatina. Los invertebrados marinos, particularmente los moluscos y equinodermos, son un buen modelo para comprobar este supuesto dado que sus histonas somáticas aparentemente coexisten tanto con variantes específicas de esperma, como con moléculas semejantes a las protaminas pero distintas de las de los mamíferos y los peces.

En los eucariotes, las histonas somáticas prevalentes son codificadas por agrupaciones multigénicas reiteradas cuya expresión está estrictamente acoplada a la fase de replicación del DNA en el ciclo celular. En contraste, los genes de las variantes de substitución y específicas de tejido suelen hallarse en número muy reducido de copias o incluso en copias únicas y su expresión ocurre con independencia de la fase replicativa del ciclo celular, acumulándose sus productos en células quiescentes al tiempo que substituyen a las histonas dependientes de replicación. Así, los acontecimientos diferenciativos distintivos de la Espermiogénesis resultan ser promovidos por productos génicos expresados en genomas haploides y han dado lugar a la propuesta de clasificaciones basadas en consideraciones regulatorias. La conversión del núcleo diploide, activo transcriptivamente, en el del espermatozoide haploide, obviamente exige el control temporal de los genes de las nucleoproteínas básicas que se acumulan en éste en substitución de las histonas somáticas. Los escasos genes de variantes de histonas específicas de esperma y de protaminas de vertebrados identificados hasta el momento resultan transcribirse y expresarse en fases postmeióticas de la maduración de los gametos, siendo sus elementos de regulación totalmente distintos de los de las histonas. Las secuencias promotoras y señales de terminación no presentan ninguna semejanza entre si. Los transcritos de las variantes aparecen poliadenilados y pueden contener intrones, características éstas nunca observadas en los genes de las histonas somáticas.

En definitiva, el conocimiento de la organización de los genes de las variantes de las histonas específicas de tejido, así como del origen evolutivo de los genes de las nucleoprotaminas y de los de las moléculas semejantes a las protaminas, es muy tenue. La discusión de estas cuestiones y la obtención de nueva evidencia relativa a la transición Histona↔Protamina y a la caracterización de los genes que las codifican,

son el objeto de esta revisión y el medio de dilucidar a nivel molecular su función diferencial y asimismo su implicación en la organización estructural de la cromatina espermatogénica.

CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA Y MOLECULAR DE PECES DE INTERÉS EN ACUICULTURA: SALMÓNIDOS Y PLEURONECTIFORMES

Laura Sánchez
Departamento de Biología Fundamental, Area de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España.

Los Salmónidos constituyen un grupo de peces extensamente analizados desde el punto de vista genético. Diversas especies de este grupo se utilizan habitualmente en acuicultura (el salmón Atlántico, la trucha arcoiris) otras poseen gran interés por su importancia en la pesca deportiva (la trucha común).En los peces planos (Pleuronectiformes) donde se incluyen el rodaballo, el lenguado, y la platija entre otros, los datos genéticos son mucho mas escasos. Sin embargo este grupo de peces esta demostrando un creciente interés para el cultivo.

En los dos grupos de peces mencionados anteriormente hemos realizado una caracterización citogenética con diversas técnicas que van desde la descripción del cariotipo al análisis de la heterocromatina (banda C, fluorocromos, digestión in situ con enzimas de restricción, in situ nick translation) y el análisis de la regiones organizadoras del nucleolo (NORs) con la tinción de plata, y cromomicina. Todos estos datos nos han permitido describir diversos polimorfismos cromosómicos y en algunos casos proponer una hipótesis de la evolución cromosoma de los dos grupos.

Mas recientemente hemos iniciado un análisis molecular de la heterocromatina y de las regiones NOR . Dentro de los Salmónidos hemos descrito elementos repetidos del tipo de ADN satélite, ADN telomérico, SINEs y LINEs habiéndolos caracterizado molecularmente (clonados y secuenciado) y posteriormente localizados mediante hibridación in situ sobre los cromosomas. Toda esta información nos permite avanzar en un mejor conocimiento de la organización genómica de los Salmónidos. En el caso de los Pleuronectiformes se presentan resultados preliminares de este tipo de análisis.

También se ha analizado desde el punto de vista molecular la región NOR, tanto en los Salmónidos como en los Pleuronectiformes, mediante la localización de los genes de ADN ribosómico y un análisis de mediante RFLPs de los IGSs. Recientes estudios en Peces de mapas genómicos utilizan marcadores de ADN polimórficos para tratar de realizar mapas de ligamiento intentando cubrir todo el genoma. Estos resultados solo son disponibles en muy pocas especies: el pez zebra (*Danio rerio*) y la tilapia (*Orochromis niloticus*). En otras especies como el salmón Atlántico, la trucha común y la trucha arcoiris están en avanzado estado de desarrollo. El interés de estos mapas radica, fundamentalmente en su potencial para localizar genes que determinan caracteres cuantitativos para la mejora del cultivo. Todo este desarrollo de los mapas ligamiento se beneficiara ampliamente con la posibilidad de localizar genes de interés sobre los cromosomas (mapas físicos) a lo cual contribuirá, sin lugar a dudas el conocimiento de la organización genomica de las especies de interés.

THE EVOLUTIONARY CONSEQUENCES OF THE EXCEPTIONAL MITOCHONDRIAL DNA SYSTEM OF MUSSELS

E. Zouros
Institute of Marine Biology of Crete, Greece

Background

That extranuclear genomes are inherited through one mating type or gender appears to be one of the few universal rules in biology. The transmitting gender can be either the female or the males. In conifers, for example, mtDNA is transmitted maternally and cpDNA paternally. The most generally accepted view (1) is that uniparentality evolved as a defence mechanism of the nuclear DNA against cytoplasmic mutations (e.g. large deletions) which may provide the affected genomes with a replicative advantage, but are deleterious for the cell.

Inheritance of mtDNA in mussels

Exceptions to strict maternal inheritance of mtDNA were noted in *Drosophila* (2), mice (3) and fish (4), but they represent "leaky" paternal contributions (amounting to about 10^{-4} of total mtDNA). Thus, the finding that in the mussel *Mytilus* transmission of mtDNA is obligatory biparental was metacentric with considerable surprise and interest. Fisher and Skibinski (5) reported that heteroplasmy (presence of two mtDNA kinds in the same individual) was more common among males than females. Subsequently, Hoeh et al. (6) noted the molecular divergence between mtDNA's in heteroplasmic individuals was too high to be explained by mutation and suggested, instead, biparental inheritance. By means of pair matings, we confirmed biparental transmission (7) and sowed that in *Mytilus* there exist two mtDNA types, one (the F type) that is transmitted from the mother to both daughters and sons and another (the M type) that is transmitted from the father to the sons only (8, 9). Skibinski et al. (10, 11) arrived at the same conclusions by examining somatic tissues, eggs and sperm from random mussels. This mode of transmission assures that females will be homoplasmic (for F) and males heteroplasmic (for F and M) and that each type is transmitted through one gender. For this reason, we have dubbed this system doubly uniparental inheritance (DUI) (8).

Phylogenies of F and M mitotypes

DUI invites a number of question at various levels of biological organization. We have initially focused of those that could be answered in a short time-frame while making preparations for those requiring a heavier investment of time, labor and expertise. RFLP analysis of mtDNA isolated from eggs and sperm from different individuals revealed substantial polymorphism. If the F and M mtDNA lineages are transmitted and envolving independently, the nucleotide sequences of all variants isolated from eggs would form one cluster and all variants isolated from sperm would form another. This was confirmed by us (12), as well as be Rawson and Hilbish (13). It was also found that the F types of three closely related *Mytilus* species, *M. edulis,*

M. trossulus, and *M. galloprovincialis* formed one cluster and the M types another. This suggests that the origin of the F and M lineages predates the split of these species from theirs common ancestral. Liu et al. (14) fortuitously discovered that RFLP patterns of mitotypes from females of the fresh water mussel *Pyganodom grandis* (family Unionidae) differed from the mitotypes from males, a sure sing of DUI. Unionidae are separated from Mytilidae by about 400 million years. CO I sequences obtained in our lab showed that within Unionidae mitotypes cluster according to gender, yet all Unionidae mitotypes cluster together and separately from the Mytilidae mitotypes (15). This implies independent origin of DUI in different taxonomic lines, or that there exists a mechanisms by which the molecular differentiation between conspecific F and M types is periodically wiped out. We have identified such a mechanism.

Masculinization of F mitoypes

Two sets of pair-matings (9, 16) produced evidence of occasional breakdowns of DUI resulting in M- negative males. Sperm from such males contains the F molecule of the male's mother, which suggests that in the absence of M, the F molecule can assume the M´s role, even though molecularly it is an F type. We call this "masculinization" of the F molecule. Confirmation of this hypothesis awaits the sexual maturation of progeny of M- negative males. However, we have evidence that the phenomenon occurs in nature. In both *M. edulis* and *M. trossulus* we have isolated mitotypes from male gonads (functionally type M) whose nucleotide sequences are about
20% different from the standard M type, but only 2% from the F type (17). Masculinization also predicts different phylogenetic patterns among F and M types in taxa with varying taxonomic distance. The expected patterns were indeed observed in comparisons of congeneric species *M. edulis* and *M. californianus* and in comparisons of two general, *Mytilus* and *Gukensia* (17).

M evolves faster than F

Hoffmann et al. (18) have noted that the gene arrangement of the *Mytilus* mtDNA is very different compared to other animal mtDNAs. We have extended this observation to nucleotides showing that in a phylogenetic tree containing representative sequences from the animal kingdom, the branches leading to either F or M type of *Mytilus* were longer than branches connecting any other invertebrate or vertebrate mtDNA (19). We (9) and others (10, 11, 13) have also noted that the M molecule evolves faster than the F. We proceeded to show that this noted that the M molecule evolves faster that the F. We proceeded to show that this is because the M molecule is under relaxed selective constraint, which we explained on the basis of the distribution of F and M types in somatic tissues and in female and male germ lines of *Mytilus* (20). Further evidence for this hypothesis comes from a study designed to detect even minute amounts of either F Or M types in mussel tissues (21). The study confirmed the practical absence of M from female tissues. Most importantly it demonstrated that male somatic tissues are dominated by the F type which provides further support that

the function of M is really restricted in the male germ line. At present, the M molecule of *Mytilus* remains the mtDNA with the fastest rate of evolution. The absence of M from females is not due to failure of sperm mitochondria to enter eggs that are destined to become females. Rather, we have shown (22) that sperm mitochondria enter all eggs, but are subsequently eliminated from eggs destined to become females. Whether the M mtDNA will be retained and multiplied in the eggs or will be eliminated (or simply maintained as a very small minority) is determined very early in the development of the embryo (22).

Incompatibility between interspecific mtDNA molecules

Interspecific introgression of mtDNA is a widespread phenomenon. *M. edulis* and *M. trossulus* hybridize, yet we found no evidence of introgression. Examination of hybrids from nature showed that males with the M of one species and the F of the other were much fewer than expected. Also there was a strong tendency for mtDNA types to match (in terms of species origin) the nuclear genotype (23). This suggests that the mtDNA/ nuclear DNA interactions are much stronger in species with DUI than in species with conventional uniparental inheritance. This may have implications for reproductive isolation.

Female-dependent sex inheritance and male-dependent inheritance of M mtDNA

Our first set of crosses showed that some females produced only daughters, others produced mostly sons and others produced both sexes in equal numbers, irrespectively of mate (9). A second set of crosses (16) proved that the sperm's nuclear genome has no effect on the determination of the zygote's sex. We have also found that certain males failed to produce sons with M mtDNA, again irrespectively of mate. Clearly, in species with DUI sex and mtDNA inheritance are intimately linked. We have summarized all experimental evidence about DUI into the following working hypothesis (16): a) development of a male gonad requires the presence in early germ cells of an agent associated with sperm-derived mitochondria, b) these mitochondria have a paternally encoded replicative advantage through which they overcome their original minority in the fertilized egg and c) this advantage is countered by a maternally encoded egg factor.

References:

Hurst, L.D. & W.D. Hamilton. (1992) **Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 247**: 189-194.
Satta, Y.,N. Toyohara, C. Ohtaka, et al. 1998. **Genet. Res. 52**:1-6.
Gyllensten, U. B., D. Whartton, A. Josefsson, & A. Wilson. (1991) **Nature 325**: 255-257.
Magoulas, A., & E. Zouros. (1993) **Mol. Niol. Evol. 10**: 319-325.
Fisher, C. & D. O. F. Skibinski. (1990) **Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 242**: 149-156.
Hoeh, W. R., K. H. Blakley, & W. M. Brown (1991) **Science 251**: 1488-1490.
Zouros, E., K. R. Freeman, A. O. Ball, & G. H. Pogson (1992) **Nature 359**: 412-414.

Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra & K. R. Freeman. (1994) **Nature 368**: 818.
Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra & K. R. Freeman. (1994). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91**: 7463-7467.
Skibinski, D. O.F., C. Gallagher, & C. M. Beynon. (1994) **Nature 368**: 817-818.
Skibinski, D. O.F., C. Gallagher, & C. M. Beynon. (1994). **Genetics 138**: 801-809.
Stewart, D. T., C. Saavedra, R. R. Stanwood, A. O. Ball, & E. Zouros (1995) **Mol. Biol. Evol. 12**: 735-747.
Rawson, P. D. & T. J. Hilbish (1995) **Mol. Biol. Evol. 12**: 893-901.
Liu, H. P., J. B. Mitton & S. K. Wu (1996). **Evolution 50**: 952-957.
Hoeh, W. R., D. T. Stewart, B. W. Sutherland, & E. Zouros (1996) **Evolution** (in press).
Saavedra, C., M. I. Reynero, & E. Zouros (1997). **Genetics 145**: 1073-1982.
Hoeh, W. R., D. T. Stewart, C. Saavedra, B. W. Sutherland, & E. Zouros (1997) **Mol. Biol. Evol. 14**: 959-967.
Hoffmann, R. J., J. L. Boore & W. M. Brown. (1992) **Genetics 131**: 397-412
Hoeh, W. R., D. T. Stewart, B. W. Sutherland & E. Zouros (1996) **Mol. Biol. Evol. 13**: 18-412.
Stewart, D. T., E. Kenchington, R. Singh, E. Zouros (1996) **Genetics 147**: 1349-1357.
Garrido-Ramos, M. A., D. T. Stewart, B. W. Sutherland & E. Zouros (1998). Genome 41: 818-824.
Sutherland, B. W., D. T. Stewart, E. R. Kenchington & E. Zouros (1998). **Genetics 148**: 341-347.
Saavedra, C., D. T. Stewart, R. R. Stanwood & E. Zouros (1996). **Genetics 143**: 1359-1367.

PECES TRANSGÉNICOS Y ACUICULTURA

M. Carmen Alvarez Herrero
Dpto. de Biologia Celular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

En la Acuicultura actual existe una necesidad creciente de desarrollar nuevas variedades de peces mas productivas, en el sentido de que crezcan mejor y sean mas resistentes a condiciones adversas, incluidas sus patologias. Con este objetivo, hace unos 15 años se comenzó a aplicar a los peces la tecnologia de la transgenia. Aunque los primeros resultados no dieron los frutos esperados, los experimentos se han sucedido de forma ininterrumpida en mas de una decena de especies tanto modelo como comerciales. La información generada han sido muy aleccionadora y ha permitido identificar muchos problemas que no se esperaban, cuya solución permitira satisfacer las expectativas iniciales.

Las posibles aportaciones de la transgenia a la Acuicultura tienen una doble vertiente: a) mejorar la productividad de especies comerciales, creando nuevos fenotipos y b) estudiar "in vivo" la expresión de genes relacionados con la producion piscícola. En esta charla voy a revisar los métodos de manipulación genética que se han empleado, los resultados obtenidos, los problemas surjidos, las nuevas estrategias en marcha y las tendencias que se vislumbran para el futuro inmediato.

A) Etapas para obtener peces transgénicos:

1) Diseño y fabricación de las construcciones que se van a introducir
Cada construcción contiene un gén con la proteina de interés y los elementos reguladores que controlan su expresión. Entre los genes de elección utilizados, el de la Hormona de Crecimiento de procedencia muy variada, es sin duda el mas utilizado. Otros genes como el de la Proteina Anticongelante para conferir resistencia al frio, los de las Metalotioneinas para resistencia a metales pesados o algunos relacionados con resistencia a enfermedades, han sido tambien objeto de numerosos ensayos. En cuanto a los elementos reguladores, en la primera fase se han utilizado sobre todo promotores y potenciadores de vertebrados terrestres, asi como de sus virus. Mas recientemente se ha hecho uso de elementos aislados de peces, movidos por un deseo de fabricar construcciones "todo pez". Sin embargo no existen pruebas concluyentes de que los elementos específicos de peces funcionen mejor que sus homólogos de otras especies animales.

2) Transferencia del transgen. Para que el transgen se pueda expresar debe de llegar al núcleo de las células del embrión, para lo cual se introduce en una fase lo mas temprana posible del desarrollo. Entre los métodos utilizados, la microinyección es el mas empleado por su alta fiabilidad, a pesar de los inconvenientes técnicos que conlleva y de la imposibilidad de dirijir el DNA al núcleo. Otras estrategias encaminadas a la transferencia masal del transgen, como electroporación, sperma transportador, balística biológica o lipofeccion han sido utilizadas en casos puntuales con éxitos muy variables. Ninguna de estas últimas se usa de forma rutinaria

3) Análisis y caracterización de los individuos transgénicos: Una vez el transgén ha llegado al núcleo, su destino va a depender en parte del azar y en parte de los acontecimietos moleculares y celulares del embrión. La tasa de integración es muy baja y la fidelidad de su expresión depende del sitio(s) del cromosoma donde se integre. Como la integración ocurre en una fase posterior a la de una célula, el resultado es la producción de individuos mosaicos para el transgén, lo cual dificulta enormente su caracterización para integración y expresión. La prueba definitiva de integración es su transmisión a al descendencia.

4) Valoración de los transgénicos en cuanto a productividad e impacto ecológico: Se hace por su capacidad de transmisión del transgén a la F1 y a la F2. Para evaluar el fenotípo productivo y ecológico de una línea de transgénicos hay que obtener individuos homozigóticoa para el transgén y evaluarlos en el ambiente donde se van a explotar comercialmente.

B) Resultados obtenidos:

Desde un punto de vista básico, la transgenia en peces ha generado un importante bagaje de conocimientos sobre el funcionamiento de genes de desarrollo en especies modelo (pez cebra y medaka).

Desde el punto de vista aplicado, los mayores logros se centran en la aceleración del crecimiento tras la inyección de genes de la Hormona de Crecimiento en tilapias, trucha, salmones, carpa y lucio. El aumento del crecimiento oscila entre el 10% y el 1000%. Sin embargo y salvo en casos puntuales, va acompañado de efectos secundarios indeseables, lo cual es comprensible si consideramos la gran complejidad del proceso y la gran cantidad de otros factores que intervienen en él. La resistencia al frio es otro rasgo que se ha querido introducir en especies que tienen que soportar temperaturas bajo cero, utilizando el gen de la proteina anticongelante endémica de algunos peces árticos, que es capaz de disminuir la temperatura de congelación del plasma. Los ensayos hechos en salmón resultan esperanzadores. Otro foco de atención preferente es la utilización de transgenes para conferir resistencia tanto inespecífica, como específia a enfemedades infecciosas. Los resultados son preliminares y en absoluto concluyentes

C) Reflexiones de la primera etapa y perspectivas

La experiencia de estos años revela que la transgenia en peces se puede aplicar a gran número de especies con objetivos muy diversos. Sin embargo el éxito en la obtención de transgénicos reales es muy bajo, debido al carácter mosaico de la F0, a la baja tasa de integración y a la “silenciación” en la expresión.

Para soslayar cada uno de estos problemas se han puesto en marcha diferentes aproximaciones y estrategias moleculares. Asi para aumentar la integración se han empleado proteinas para transportar el trangén al núcleo, integrasas víricas, retrovirus como vectores y elementos trasnponibles. Para salvaguardar la expresion del transgen

este se protege con las secuencias MARS que delimitan dominios independientes de expresión de la cromatina. La eficiencia de estas “novedades metodológicas” se halla en fase de evaluación

Muchos de los escollos anteriores se podrian resolver siguiendo los pasos de otros animales, sobre todo en ratón, que es sin duda la especie modelo por excelencia. Ello pasaria por el desarrollo de células totipotentes ES y de la tecnologia del transplante nuclear.

Que duda cabe que cuando los problemas técnicos de la transgenia en peces se hayan resuelto, el panorama será mucho mas alentador y sobre todo se podra hacer realidad el sueño de los pioneros de la ingenieria genética de peces, de crear variedades superproductoras en Acuicultura.

En cualquier caso la contribución de la transgenia a la Acuicultura del futuro, no solo va depender de los avances científicos, sino de la respuesta de los consumidores y de la sociedad en general.

MEJORA GENETICA EN ACUICULTURA

Miguel Angel Toro Ibañez
Departamento de Mejora Genética y Biotecnología
INIA, Carretera La Coruña km.7, 28040-Madrid.
toro@inia.es

Progreso genético en las especies domésticas animales

Las tasas anuales de progreso genético en las cuatro especies domésticas más importantes (vacuno, ovino, porcino y gallinas) son del orden de 1 al 3% de la media. Aunque pudieran parecer modestas comparadas con los progresos que pueden obtenerse con cambios en la alimentación o en el manejo, hay que tener en cuanto que los progresos genéticos son continuos, acumulativos y permanentes, por lo que los resultados a largo plazo son impresionantes, hasta el punto que la mayor parte de la producción ganadera está, hoy en día, basada en razas mejoradas. Esto no ha ocurrido en Acuicultura, para la que recientes estimas indican que menos de un 1% de la producción mundial está basada en estirpes o líneas mejoradas, a pesar de que en los últimos años el potencial de la mejora genética, en salmón especialmente, está bien documentado.

Diseño de un programa de mejora

El diseño de un programa de mejora sigue una serie de etapas bien establecidas: 1) definir el objetivo de mejora en contexto de un sistema de producción y mercado; 2) elegir la población o poblaciones base así como de un posible sistema de cruzamiento; 3) desarrollar un sistema de control de rendimientos y de selección para la mejora progresiva de las poblaciones; 4) difundir los stocks mejorados a la industria de forma que pueda beneficiarse de la mejora genética

1.Objetivo de mejora

En líneas generales la mejora del rendimiento en acuicultura presenta dos componentes de especial importancia: el tiempo necesario para alcanzar un peso comercial prefijado y el gasto incurrido en la operación que, en su mayor parte, corresponde a la cantidad de pienso ingerido. Además, hay otros caracteres que puede tener interés considerar como la mortalidad a la edad comercial, la resistencia a enfermedades, la calidad de la canal en aquellas especies en las que el valor de la pieza es alto y la edad a la madurez sexual. Los caracteres a mejorar deben ser pocos ya que mientras mayor sea su número menor será el progreso genético que se obtenga para cada uno de ellos. En general la presión selectiva suele limitarse al peso final y a las tasas de crecimiento y supervivencia, aún cuando a veces se evalúan calidad, edad a la madurez sexual y fecundidad, con ele propósito de actuar sobre estos rasgos si se deterioran excesivamente.

2. Elección de la población base y del sistema de cruzamientos

La elección de una población base inicial apropiada es importante y requiere un conocimiento previo del comportamiento productivo de los stocks disponibles y de

sus cruces. Esta información es más o menos conocida para las especies domésticas tradicionales, excepto en el caso de los países en vías de desarrollo. Sin embargo, esto no ocurre en las especies acuáticas, aunque se sabe que existen grandes diferencias entre distintos stocks así como entre poblaciones salvajes y domesticadas. En acuicultura, un programa de evaluación de poblaciones y de sus cruces puede, en muchas ocasiones, ser prioritario pese a que este tipo de programas son económicamente costosos.

3. Evaluación genética y selección

La etapa siguiente es establecer un sistema de testaje y selección. La esencia de la selección artificial consiste en utilizar como reproductores exclusivamente a aquellos individuos de la población cuyas características sean más favorables de acuerdo a un criterio prefijado. La respuesta a la selección a corto plazo dependerá básicamente de: a) la heredabilidad ; b) la intensidad de selección; c) el intervalo generacional; d) la precisión con la que el criterio de selección estima el verdadero valor genético del individuo.

Conforme se ha ido recopilando información, ha quedado manifiesto que las propiedades genéticas tanto de los caracteres de crecimiento como de los reproductivos es similar a la establecida previamente para caracteres comparables en especies domésticas tradicionales. Así la heredabilidad de la tasa de crecimiento es intermedia (del orden de 0,30), y la de los caracteres reproductivos y de resistencia a enfermedades es baja (del orden de 0,10). Por otra parte, aunque debido a la alta fecundidad la intensidad de selección que puede imponerse en organismos acuáticos es potencialmente muy elevada, en la práctica no ocurre así debido a las dificultades para sincronizar los apareamientos y a la necesidad de evitar la depresión consanguínea. Por último, el intervalo generacional no es corto en muchas especies, pudiendo alcanzar valores entre los tres y cuatro años como en salmón y carpa.

La precisión de la evaluación puede aumentarse incluyendo en la evaluación genética de un animal, no sólo la información proporcionada por el fenotipo del individuo, sino también la información proporcionada por sus parientes. Clásicamente, la selección por truncación pude hacerse utilizando sólo la información del propio individuo (selección individual o masal), sólo la información de la media familiar (selección familiar) o sólo la desviación del fenotipo del individuo a la media familiar (selección intrafamiliar). La información puede también combinarse en un índice que pondere adecuadamente las distintas piezas de información. El denominado modelo animal-BLUP se considera hoy en día, el método óptimo de evaluación genética.

Hay que tener presente que dos supuestos habituales en la aplicación de los métodos de evaluación genética no siempre se cumplen en acuicultura. El primero es que las diferencias ambientales entre miembros de una misma familia para los caracteres de interés son aleatorias. El segundo es que el genotipo de un individuo sólo influye sobre su fenotipo y no sobre el de otro individuos con los que comparte el medio. Esta última condición es difícil de cumplir en peces ya puede desarrollarse una fuerte competición entre los individuos de manera que los más agresivos presenten una tasa

más elevada de crecimiento. Esto puede hacer que la respuesta a la selección individual sea incluso negativa, si se favorecen los individuos más agresivos.

4. Difusión del progreso genético

La diseminación del progreso genético desde el núcleo de selección a las piscifactorías comerciales puede verse facilitado por la enorme capacidad reproductiva de estas especies. Sin embargo, a veces es interesante disponer de varios núcleos de selección bien por razones sanitarias, para cubrir diferentes sistemas de producción o para seleccionar para distintos objetivos.

Manipulaciones cromosómicas y del sistema reproductor

Las posibilidades de manipular la dotación cromosómica (triploidía fundamentalmente) puede permitir aumentos en los rendimientos interesantes aunque no sean acumulativos. La esterilidad asociada a los triploides en truchas y ostras mejora el crecimiento debido a al retraso o ausencia de madurez sexual. Asimismo la producción de poblaciones monosexuales en truchas parece ser ventajosa debido a la tardía madurez sexual, mayor tasa de crecimiento, mejor calidad de la carne y menor agresividad.

Animales transgénicos

Desde 1986 muchos laboratorios han informado sobre la obtención de peces transgénicos en salmón, carpa, tilapia y pez gato aunque las posibilidades de aplicación práctica son dudosas. En última instancia, la incertidumbre que manifieste la sociedad frente a los animales genéticamente manipulados va a resultar crítica.

1 / 01

ORGANIZACIÓN DE SECUENCIAS REPETIDAS DE ADN EN NÚCLEOS PAQUITÉNICOS DE DORADA (*SPARUS AURATA)*

De la Herrán, R.[$]; Cuñado, N.[#]; Garrido-Ramos, M.A. [$]; Ruiz Rejón, C. [$]; Ruiz Rejón, M. [$]; Santos, J.L. [#]

[$] Depart. de Genética; Facultad de Ciencias; Universidad de Granada; 18071 Granada.

[#] Depart. de Genética; Facultad de Biología; Universidad Complutense; 28040 Madrid.

Se ha desarrollado una metodología que permite la visualización de complejos sinaptonémicos (CSs) y la realización de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) sobre secuencias de ADN asociadas a esta estructura proteica. Esta técnica ha sido aplicada por primera vez en peces, concretamente en la dorada (*Sparus aurata*) donde se ha estudiado la organización y distribución de tres secuencias repetidas diferentes: ADN ribosómico, ADN centromérico (Garrido-Ramos *et al.* 1994; Cytogenet. Cell Genet. 65:233-237) y ADN telomérico. La localización de los dos primeros tipos de secuencias coincide con observaciones previas realizadas en cromosomas mitóticos (Garrido-Ramos *et al.* 1995a,b; Cytogenet. Cell Genet. 68:3-7; Cytogenet. Cell Genet. 71:345-351). Ambas presentan una organización típica de lazos que emergen del CS con longitudes que oscilan entre 2-3 μm para el ADNr y de 0,5-1,8 μm para el ADN centromérico. Se han detectado diferencias entre cromosomas respecto al tamaño de la señal de hibridación centromérica sin aparente relación con la naturaleza submetacéntrica o telocéntrica de los mismos. Por el contrario, el ADN repetido telomérico presenta una organización diferente ya que la señal de hibridación es muy compacta y asociada íntimamente con los extremos de los CSs. Esta organización peculiar parece ser característica de este tipo de secuencias ya que ha sido observada también en plantas y mamíferos. La técnica utilizada, además de permitir el estudio de la organización de la cromatina en la profase I meiótica, puede tener aplicaciones en la realización de mapas físicos, especialmente en especies con cromosomas de pequeño tamaño, ya que se puede establecer el orden de secuencias de ADN en paquitena donde los cromosomas presentan un grado apreciable de descondensación.

1 / 02

DEVIATIONS FROM MENDELIAN PROPORTIONS AT ALLOZYME LOCI IN MUSSEL CROSSES

Saavedra, C., [1,2] and Zouros, E. [1,3].

[1] Institute of Marine Biology of Crete, Heraklion, Crete (Greece); [2]Present address: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Castellón (Spain); [3] Department of Biology, University of Crete (Greece).

Several studies have reported deviations from Mendelian proportions at allozyme loci and DNA nuclear markers in crosses between randomly chosen individuals of several species of bivalves. The reasons for these deviations remain unclear. We have examined the occurrence of deviations from Mendelian segregation at 5 allozyme loci in a relatively large set of laboratory crosses (16 crosses) of the mussel *Mytilus galloprovincialis* involving 5 females and 5 males from the wild population. An average of 20 individuals were sampled from each family at one year of age. A total of 26 out of 69 locus by cross combinations showed a significant deviation. In crosses in which the parents shared only one or no alleles, a partition of the segregation into sire, dam and interaction effects showed that interactions were non-significant. This allowed the consideration of crosses in terms of alellic segregation at individual parents. Such analysis revealed a large heterogeneity of Mendelian ratios across crosses, although pooled frequencies did not deviate from expectation. Heterogeneity of segregation ratios was significant at the among-individual level. In the individuals that showed significant, a significant heterogeneity among crosses derived from the same individual was also observed in 6 out of the 13 cases tested, suggesting that deviations from expected allelic ratios are often determined by interactions of the marked chromosomal region with the genetic contribution by the other parent involved in the cross. Another observation was that genotypes with alleles with low frequencies in the wild population from which the parents were taken were less frequent than genotypes with common alleles. These observations suggest the presence in natural populations of slightly deleterious mutations with high frequencies and in linkage disequilibrium with the markers studied.

1 / 03

ANALISIS CITOGENÉTICO DE *Perumytilus purpuratus* Lmk. (MOLUSCA: BIVALVIA)

Pasantes, J.J., Torreiro, A.
Área de Xenética. Facultade de Ciencias. Universidade de Vigo. 36200 Vigo.pasantes@setei.uvigo.es

Perumytilus purpuratus Lmk. es una especie de mejillón que habita las costas subtropicales sudamericanas. El complemento cromosómico diploide de esta especie consta de 16 pares cromosómicos de morfología semejante a la ya descrita para otra especie de mejillón sudamericano (*Brachidontes rodriguezi*). Mediante la técnica de impregnación argéntica se localizaron los organizadores nucleolares en las regiones teloméricas de los brazos largos de dos pares cromosómicos. Los experimentos de hibridación *in situ* con sondas ADNr 18S+28S confirmaron la posición cromosómica de esas secuencias. Los organizadores nucleolares se caracterizaron por presentar generalmente fluorescencia brillante con cromomicina A3. Para esta tinción se ha encontrado el mismo tipo de variabilidad intra e interindividual que aparece en otros moluscos bivalvos. Por el contrario estas regiones presentaron de modo consistente fluorescencia disminuida tras tinción con DAPI.

1 / 04

DIFERENCIACION GENETICA ENTRE POBLACIONES DE PEJERREYES DE LA ARGENTINA DEL GENERO ODONTESTHES (PISCES, ATHERINIDAE)

Abel, María Cecilia (1); Maggese, María Cristina (1) y Vilardi, Juan(2).
(1)Lab. de Embriología Animal, (2) Lab. de Genética de Poblaciones. Fac. de Cs. Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Cdad. Universit.(1428) Buenos Aires, ARGENTINA.

Estudios recientes indican que híbridos entre *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes hatcheri*, obtenidos por inseminación artificial, muestran buenas condiciones para la acuicultura intensiva. Con el propósito de aumentar el número de marcadores genéticos en poblaciones y especies de pejerrreyes, se ha iniciado el análisis isoenzimático de las mismas.

En este trabajo se estudió una población de *O. hatcheri* de EL Bolson (BOL), Provincia de Río Negro y 5 poblaciones de *O. bonariensis* de diferentes regiones de la Provincia de Buenos Aires: Madariaga (MA), Coronel Pringles (CP), San Miguel del Monte (SMM), Chasicó (CH) y Río de La Plata (RP). Se realizaron homogenatos de músculo esquelético e hígado. El análisis de diez sistemas isoenzimáticos permitió detectar un total de 20 loci. La heterocigosis media fue de 0.05 en MA y BOL, de 0.03 en RP y de 0.02 en CP, SMM y CH. El porcentaje de loci polimórficos fue de 10% para las poblaciones de MA y BOL y del 5% para las restantes. Las poblaciones se diferenciaron por las frecuencias alélicas y la presencia de alelos exclusivos. Esto determinó una diferenciación génica y genotípica altamente significativa y un flujo génico estimado muy bajo (Nm=0.015). Se detectaron loci diagnósticos que permiten diferenciar la población BOL y RP con respecto a las restantes. Se estimó la diferenciación genética a partir del F_{ST} y se realizó un gráfico por el método Multidimensional Scaling. Los resultados indican que las poblaciones BOL y RP se encuentran aisladas mientras que las restantes formarían un grupo más homogéneo.

1 / 05

RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL CANGREJO DE RÍO AUTÓCTONO *AUSTROPOTAMOBIUS PALLIPES*

Ochando, M.D., Beroiz, B., Alonso, F.
Departamento Genética. Fac. CC. Biológicas. Universidad Complutense.
28040-Madrid.

El cangrejo de río autóctono, *Austropotamobius pallipes*, constituye una especie de crucial importancia en nuestros ecosistemas fluviales, es un buen indicador de la calidad de las aguas, y desafortunadamente se encuentra actualmente en una situación crítica desde el punto de vista de su conservación.

Por otro lado, el desconocimiento genético de las poblaciones de este crustáceo, y en concreto de la cantidad de variabilidad que aún conserva, es prácticamente total.

Así, hemos iniciado un proyecto con la finalidad de realizar un completo estudio genético de las diversas poblaciones de *A. pallibes* que se conservan en nuestras cuencas fluviales. Hemos puesto a punto dos metodologías genético-moleculares, en su aplicación a éste organismo, electroforesis enzimática en gel de almidón y RAPD-PCR, a fin de conseguir información sobre la variabilidad genética a nivel proteico y acidonucleico.

Estos primeros resultados, en un análisis, todavía, a nivel “cualitativo”, parecen evidenciar que, contrariamente a lo esperado, la variabilidad genética se mantiene en unos niveles aceptables. No obstante habrá que avanzar en la obtención de una mayor cantidad de información, y profundizar en el análisis de la misma, para llegar a conclusiones definitivas sobre las implicaciones que la cantidad y calidad de la variabilidad detectada pueda tener en la conservación de la especie.

1 / 06

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DEL MEJILLÓN MYTILUS GALLOPROVINCIALIS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ALTA RESOLUCIÓN

López, J. L.; E. Mosquera; J. M . Fuentes; G. Alvarez.
Departamento de Biología Fundamental, Facultad de Biología,
Universidad de Santiago de Compostela.

La técnica de electroforesis bidimensional de alta resolución permite resolver mezclas complejas de proteínas con gran eficacia debido al uso de dos parámetros de separación no relacionados, isoelectroenfoque en la primera dimensión y SDS-PAGE en la segunda. Esta técnica ha sido usada para la elaboración de patrones de expresión proteica de pie y manto de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Experimentos que incluyen distintas diluciones de una misma muestra, así como muestras de diferentes individuos han sido estudiados mediante análisis informático, que se ha utilizado para construir una base de datos de estos tejidos de mejillón. Todos los polipéptidos detectados se han numerado y se presentan en un mapa de referencia muy útil para posteriores estudios. Paralelamente presentamos una imagen sintética de ambos tejidos que son el resultado de la comparación y emparejamientos de diferentes patrones de distintos individuos. Los mapas bidimensionales en los que quedan cartografiadas las proteínas separadas en los geles bidimensionales son el punto de partida para la posterior identificación de las mismas. Este trabajo aporta las bases preliminares para la futura caracterización del proteoma de mejillón.

1 / 07

DIFERENCIACION GENETICA EN POBLACIONES DE SALMON ATLANTICO (*Salmo salar* L.): ALOZIMAS FRENTE MICROSATELITES

Fernández, A.; Blanco, G.; Vázquez, E.; Rumoroso, J. y Sánchez, J.A.
Departamento de Biología Funcional. Área de Genética.
Universidad de Oviedo. Asturias. Julián Clavería s/n. 33071. Oviedo. Asturias.

Hemos probado la eficacia de cinco loci microsatélites y seis loci enzimáticos en la discriminación de seis poblaciones de salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) de las Islas Británicas. Aunque la heterogeneidad de frecuencias génicas entre las muestras es significativa en ambos casos, los valores de significación son mayores en el análisis microsatélite. Los valores de los parámetros de variabilidad analizados siempre son mayores en el caso de loci microsatélites, en los cuales se presentan mayor número medio de alelos por locus (4,4±0,92 y 2,16±0,16), proporción más alta de loci polimórficos (91,42±4,36 y 74,99±5,69) y mayor heterocigosidad media (0,37±0,02 y 0,24±0,01). Los valores de diversidad genética absoluta también son superiores al utilizar loci microsatélites (0,4080±0,0883 y 0,3188±0,0755), aunque el reparto de la diversidad dentro de muestras es similar en los dos casos (93,11% y 89,89%). Los resultados obtenidos sugieren el uso de los loci microsatélites como herramienta más eficaz que los enzimáticos en la búsqueda de marcadores genéticos en esta especie.

1 / 08

CARACTERIZACION Y DIVERSIDAD GENETICA EN POBLACIONES NATURALES DE TRUCHA COMUN (*Salmo trutta* L.) EN LA PROVINCIA DE LEON

Corujo, M.; Cagigas, E.; Vázquez, E.; Blanco, G. y Sánchez, J.A.
Departamento de Biología Funcional. Area de Genética. Universidad de Oviedo.
C/ Julián Clavería s/n. 33071. Oviedo. Asturias.

En este trabajo se estudia la diversidad genética en 17 poblaciones naturales de trucha común (*Salmo trutta* L.) pertenecientes a diferentes afluentes de los ríos Sil y Duero en la provincia de León. Los parámetros de variabilidad genética se han estimado basándose en el análisis de 25 loci enzimáticos mediante electroforesis horizontal en geles de almidón. Los niveles de variabilidad genética media observados ($P_{0.95}$= 8.7 y Ho= 0.023±0.015) son similares a los descritos en poblaciones gallegas e inferiores a los descritos en poblaciones españolas de otras áreas geográficas. De las variantes alélicas detectadas destacan las variantes *MDH-3*80* y *MDH-4*80* que parecen ser específicas de poblaciones de la cuenca del Duero.

Los valores absolutos de diversidad genética son sensiblemente inferiores a los descritos para poblaciones españolas. Sin embargo, los correspondientes valores relativos de diversidad se asemejan a los descritos para tales poblaciones españolas, siendo, el 61.92% de la diversidad total debida a diferencias intrapoblacionales, mientras que el 38.08% se debe a diferencias interpoblacionales. Además la mayor diversidad interpoblacional se establece entre cuencas (78.18%), mientras que las diferencias entre ríos dentro de cuenca y entre muestras dentro de éstos son significativamente menores (11.62% y 10.20% respectivamente). A partir de estos resultados, se puede empezar a visualizar la estrategia más adecuada para la conservación de estos recursos naturales.

1 / 09

ANALISIS DE LOS COMPLEJOS SINAPTONÉMICOS EN ESPERMATOCITOS DE TRES ESPECIES DEL GENERO *Barbus* (*Pisces, Cyprinidae*)

Sánchez-Morán, E.; del Cerro, A.; Cuñado, N.; Blázquez, S.; Santos, J.L.
Dpto de Genética, Fac de Biología, Universidad Complutense, 28040-Madrid

Se ha utilizado una técnica que permite visualizar los complejos sinaptonémicos (CSs) para estudiar el proceso de sinapsis en tres especies "tetraploides" de barbos con una constitución cromosómica 2n = 4x = 100: *Barbus comiza, B. bocagei, B. sclateri.* Todos los CSs observados en paquitena tenían elementos laterales de igual longitud y ninguno presentó un patrón de sinapsis atípico que pudiera relacionarse con la existencia de un par de cromosomas sexuales heteromórfico. Individuos de las tres especies mostraron variación con respecto a la frecuencia de cuadrivalentes. Es de destacar que en un macho de *B. comiza* se observaron células con tres y cuatro cuadrivalentes. Estas conservaciones corroboran la naturaleza tetraploide de estas especies y sugieren que el proceso de diploidización todavía no es completo.

1 / 10

CARACTERIZACION CITOGENETICA DE ESPECIES DE OSTRAS

Cross, I.; Amezcua, O.; Vega, L. y Rebordinos, L.
Laboratorio de Genética. CASEM. Universidad de Cádiz.
Polígono Río San Pedro. 11510 Puerto Real (Cádiz).
Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

Ciertas especies de moluscos marinos se localizan en zonas estuarinas, muy afectados por procesos de contaminación. Los contaminantes pueden influir en la constitución genética de una población, ejerciendo una presión selectiva sobre su estrucutra genética y originando por tanto un cambio de la misma, o produciendo mutaciones tanto a nivel génico como cromosómico, incluyendo la aneuploidía.

En las costas del Golfo de Cádiz se han descrito dos especies de ostras, *Crassostrea angulata* y *Ostrea stentina*. La primera, conocida comúnmente como ostra portuguesa, tiene una gran importancia en la ostricultura andaluza, siendo la principal fuente de reproductores las poblaciones naturales de la zona. El cultivo de esta especie se ha visto alterado por la presencia de *O. stentina*, tambien conocida como ostra enana, que es una especie de menor tamaño que compite por los recursos y por el espacio disponible para la fijación de las larvas con *Crassostrea angulata*. Ambas se ven muy afectados por los procesos de contaminación físico-químicos que sufren los medios estuarinos donde viven.

Con el fin de conocer mejor desde un punto de vista genético como actúan los distintos factores ambientales sobre estas especies, estamos llevando a cabo un estudio en el que se analiza la dotación cromosómica de ambas ostras y la posible existencia de aneuploidías en zonas con una elevada concentración de metales pesados, como ocurre en las desembocaduras de los ríos Guadiana y Guadalquivir. Además estamos profundizando en la caracterización de la dotación cromosómica de estas especies mediante distintas técncias de bandeo, para identificar cromosomas individuales, detectar posibles reordenaciones cromosómicas, localizar polimorfismos, etc. para conseguir una caracterización detallada de los cariotipos, esencial para futura manipulación genética.

1 / 11

APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS EN LA GESTIÓN GENÉTICA DEL RODABALLO

Presa P. [1], Bouza C. [2], Castro J. [2], Barja M.D.[2], Insua L. [2], Sánchez L. [2] y Martínez P.[2]

[1]Dept. Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía, Facultade de Ciencias-Bioloxía, Universidade de Vigo, 36200 VIGO

[2]Dept. Bioloxía Fundamental, Area de Xenética, Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 LUGO

El rodaballo es una de las especies comerciales de mayor impacto en los mercados europeos. El estudio de la estructura genética de sus poblaciones naturales es de interés prioritario para la protección y el aprovechamiento adecuados de este recurso. Estudios alozímicos previos no han permitido revelar ninguna estructura genética en sus poblaciones naturales, hecho que pudiera ser debido a la extremada baja variabilidad genética del rodaballo respecto a especies filogenéticamente próximas. Para comprender mejor las causas de esta baja variabilidad genética y disponer de marcadores más resolutivos, se ha puesto a punto la amplificación locus-específica por PCR de 13 microsatélites dinucleótidos. Los microsatélites amplificados en los primeros análisis muestran un grado de polimorfismo más elevado que en alozimas, una mayor variabilidad genética de los stocks cultivados *versus* poblaciones naturales, y una posible diferenciación genética entre las poblaciones atlánticas y cantábricas de rodaballo. Estos resultados preliminares tienen un interés obvio para determinar la estructura genética de esta especie, si la hubiera, cara a una gestión racional de sus recursos genéticos. Además, el elevado polimorfismo de los microsatélites ensayados, hace de ellos una herramienta idónea para el control y seguimiento de stocks, el manejo de reproductores en cultivo y como marcadores control en diversos tipos de análisis genómicos.

1 / 12

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE *OSTREA STENTINA* Y DIFERENCIACIÓN ALOZÍMICA CON *CRASSOSTREA ANGULATA*

Amezcua, O.; Cross, I.; Vega, L. y Rebordinos, L.
Laboratorio de Genética. CASEM. Universidad de Cádiz.
Polígono Río San Pedro. 11510 Puerto Real (Cádiz).
Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

En las costas del Golfo de Cádiz están descritas dos especies de la familia *Ostreidae*: *Crassostrea angulata* y *Ostrea stentina*. Esta última es una especie que se localiza principalmente en las costas este del Atlántico y en el Mediterráneo y que no se explota comercialmente, sin embargo es importante en Acuicultura, ya que compite con otras especies de ostras en la fijación a los colectores de larvas que se colocan en el medio natural. Ambas especies presentan características diferentes para la fijación de metales. Las diferencias entre ambas especies a nivel morfológico son muy pequeñas y a veces insuficientes para identificar individuos.

Hemos muestreado cinco poblaciones naturales de *O. stentina*: Barbate, Santi-Petri, Cádiz, Puerto de Sta. María y Chipiona; y una en Vilanova de Milfontes en Portugal
Para la caracterización genética de estas poblaciones se ha utilizado la técnica de *electroforesis en gel de almidón* con la que se han analizado 8 loci alozímicos: *Lap-I, Lap-II, Pgi, Xdh, Em, Mdh-I, Mdh-II* y *Pgm.*

Se ha encontrado un alto nivel de variabilidad en las poblaciones de *O. stentina* estudiadas, así se ha detectado un mínimo del 75% de loci polimórficos cuando se siguió el criterio de 95%; un número medio de alelos por locus que osciló entre 3,13 y 3,5 y una heterocigosidad media con valores entre 0,333 y 0,417.

Además se ha observado un déficit de heterocigotos en la mayoría de las poblaciones para los loci *Xdh, Em* y *Lap-I*. Se ha detectado un alto nivel de identidad genética entre las poblaciones, debido probablemente al alto flujo genético que presenta esta especie por tener una fase larvaria móvil.

También se han encontrado diferencias significativas entre los patrones isoenzimáticos de los loci *Lap-II, Mdh-I* y *Mdh-II* de las especies *Crassostrea angulata* y *Ostrea stentina*, los cuales se comportaron como loci diagnóstico.

1 / 13

ANÁLISIS MEDIANTE FLUORESCENCIA E HIBRIDACIÓN IN SITU DE LA COQUINA Y DE LAS ALMEJAS FINA Y BABOSA

Sineiro, R.; Mariñas, L.; Rios, J.; González, A.; Martínez, A.; y Méndez, J.
Dep. de Bioloxía Celular e Molecular, Universidade da Coruña.

Hemos analizado los cariotipos de las almejas *Venerupis pullastra* y *Ruditapes decusata* y de la coquina *Donax trunculus* mediante tinción con los compuestos fluorescentes DAPI y Cromomicina A_3, así como mediante hibridación in situ fluorescente con la sonda ribosomal 18S-5.8S-28S.

En la coquina existe un loci ribosomal situado en el brazo cortod del un par cromosómico submetacéntrico de tamaño medio. En las dos especies de almeja, también existe un único loci ribosomal situado, en ambos casos, en posición intercalar en el brazo largo de un cromosoma submetacéntrico/subtelocéntrico mediano.

La tinción con la cromomicina A_3 pone de manifiesto que en la coquina existen 11 regiones ricas en pares de base GC situadas en posiciones intercalares y teloméricas de 10 pares cromosómicos diferentes. En la almeja fina existen dos regiones cromomicina A_3 positivas situadas en dos cromosomas submetacéntricos/subtelocéntricos, una en posición intercalar en el brazo largo de un par y otra en posición telomérica en el brazo corto. En la almeja babosa también existe una región cromomicina A_3 positiva en posición telomérica del brazo corto de un cromosoma submetacéntrico/subtelocéntrico, pero la otra región se encuentra situada en posición pericentromérica en un cromosoma submetacéntrico/subtelocéntrico.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10302B97)

1 / 14

ESTUDIO DEL STATUS TAXONÓMICO DEL MEJILLÓN MEDIANTE AMPLIFICACION DE MARCADORES NUCLEARES

Rodríguez, F.; González, A.; Fernández, J.; Martínez, A.; y Méndez, J.
Dep. de Bioloxía Celular e Molecular, Universidade da Coruña.

Los mejillones son los moluscos bivalvos más explotados comercialmente. Su status taxonómico y filogenético ha sido extensamente estudiado con diferentes técnicas y, recientemente, mediante el análisis de ciertos marcadores moleculares nucleares. En nuestro laboratorio, mediante PCR, hemos amplificado un intrón de la calmodulina, las fracciones PHI-1 y PLII de la protamine-like y el extremo 5' del intrón gigante de la proteína polifenólica adhesiva del biso. Así, hemos estudiado 7 poblaciones pertenecientes a tres especies diferentes: cuatro europeas de las cuales dos son españolas, dos de la costa Este y una de la costa Oeste de Canadá.

Los resultados confirman la inadecuada adscripción de los mejillones del Mar Báltico como *M. trossulus* y su pertenencia a la especie *M. edulis.* De la misma forma, reflejan la gran diferencia que existe a nivel molecular entre dicha población y las poblaciones de *M. trossulus* de ambas costas canadienses, lo cual equivaldría a la distancia existente entre especies distintas. La distancia obtenida con estos marcadores entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* es la correspondiente a subespecies.

Financiación: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología I+D (ALI 97-0434)

1 / 15

DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES COMERCIALES DE MEJILLÓN MEDIANTE RAPDs

Rego, I.[1]; Martínez, A.[1]; Rodríguez, F.[1]; González, A.[1]; Vieites, J.M.[2]; Leira, F.[2] y Méndez, J.[1]

(1) Dep. de Bioloxía Celular e Molecular, Universidade da Coruña.

(2) ANFACO - CECOPESCA

Los mejillones constituyen la especie comercial de bivalvo más importante tanto por el volumen como por los costes de producción. Sin embargo, los estándares de calidad varían mucho entre las diferentes regiones de productividad, ya que se comercializan diferentes especies con el mismo nombre comercial. Esto genera un fraude asociado a la ausencia de diferenciación en el etiquetado de los productos comercializados.

El alto nivel de polimorfismo que muestran los RAPDs los hace muy útiles para el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies congenéricas y entre poblaciones de la misma especie.

En nuestro laboratorio estamos desarrollando la técnica de RAPD para diferenciar especies de mejillón de diferentes zonas productivas: *Mytilus galloprovincialis* de Galicia y Delta del Ebro, *M. edulis* de Holanda y Costa Este de Canadá, *M. chilensis* de Chile y *Perna canaliculus* de Nueva Zelanda. Después de estudiar 20 primers, hemos seleccionado tres que nos permiten diferenciar los mejillones europeos del resto de las poblaciones. Además, el análisis de 28 bandas diferentes nos ha permitido realizar una aproximación al status filogenético de las poblaciones analizadas.

Financiación: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología I+D (ALI 97-0434)

1 / 16

DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓN ITS DE LOS BERBERECHOS *CERASTODERMA EDULE* Y *C. GLAUCUM*

Freire, R., Insua, A. y Méndez, J.
Dpto. Biología Celular y Molecular, Universidade de A Coruña, A Zapateira s/n, 15071 A Coruña

Cerastoderma edule y *C. glaucum* son dos especies de berberechos explotados comercialmente y que coexisten en las costas europeas. A nivel morfológico su diferenciación resulta dificultosa debido a que muestran una gran similitud y una considerable variabilidad intraespecífica.

En este trabajo, se analiza la variación en la secuencia nucleotídica de la región que separa los genes que codifican para el ARNr 18S y el 28S en *Cerastoderma edule* de la costa gallega y *C. glaucum* de la costa mediterránea, con el fin de identificar marcadores moleculares que permitan una fácil identificación de las dos especies.

La región de estudio se obtuvo mediante amplificación por PCR y comprende los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2 y el gen que codifica para el ARNr 5.8S (ADNr 5.8S), localizado entre ambos espaciadores.

Se secuenciaron dos clones de cada especie, observándose algunas diferencias entre los clones de *C. edule* pero no entre los clones de *C. glaucum*. Por otra parte, el alineamiento de las secuencias revela que la secuencia del ADNr 5.8S, deducida por comparación con secuencias de otros moluscos, es idéntica en los dos berberechos. Sin embargo, tanto en el ITS1 como en el ITS2 se encuentran numerosos gaps y sustituciones nucleotídicas. En base a la variabilidad detectada, se identifican varias dianas de enzimas de restricción que potencialmente podrían diferenciar ambas especies.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10302B97)

1 / 17

ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS DE LA ZAMBURIÑA *MIMACHLAMYS VARIA* Y SU RELACIÓN CON OTROS PECTÍNIDOS

López-Piñón M.J., Insua, A. y Méndez, J.
Dpto. Biología Celular y Molecular, Universidade de A Coruña, A Zapateira s/n, 15071 A Coruña

En la familia Pectinidae existe una treintena de especies que son explotadas o potencialmente explotables comercialmente. Sin embargo, en la mayor parte de ellas todavía se desconoce la dotación cromosómica y sólo en algunas se ha descrito el cariotipo.

Con el fin de caracterizar los cromosomas de los pectínidos de la costa española, obtener ideogramas para el mapeo de genes y contribuir a la evaluación de la relación genética, recientemente hemos analizado los cromosomas de *Aequipecten opercularis* y *Chlamys distorta* mediante diferentes técnicas citogenéticas.

Este trabajo se centra en la zamburiña, *Mimachlamys varia*, una especie que atendiendo a las características de la concha se asignó tradicionalmente al género *Chlamys*.

A partir de cromosomas metafásicos obtenidos del tejido branquial, elaboramos el cariotipo de acuerdo con los parámetros morfométricos longitud relativa e índice centromérico, y determinamos la localización cromosómica de los genes que codifican para los ARN ribosómicos 18S-28S y 5S mediante hibridación in *situ* fluorescente. Las características cariotípicas de *M. varia* se comparan con las de las especies analizadas previamente.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10302B97)

workshop
modelos genéticos cuantitativos y heterosis

MODELOS MULTIPLICATIVOS PARA EL ANALISIS DE ENSAYOS DE VARIEDADES EN AMBIENTES MULTIPLES

José Crossa
Unidad de Biometría y Estadística
CIMMYT, México
y
Paul Cornelius
Dep. de Agronomía y Dep. de Estadística
Universidad de Kentucky, USA

En los últimos 10 años ha habido avances teóricos en el uso de los modelos estadísticos multiplicativos (también llamados modelos lineales-bilineales generales) para el análisis de ensayos de variedades en ambientes múltiples. Los modelos multiplicativos, en el contexto de ensayos de variedades, son útiles para: 1) estudiar patrones de respuesta de genotipos evaluados a través de ambientes (estabilidad), 2) separar, de la interacción total genotipo × ambiente, la interacción opuesta (IO) (crossover) de la interacción no-opuesta (non-crossover) y 3) estimar la producción real the los genotipos en ambientes de tal forma que proporcione una mejor estimación que el tradicional promedio de rendimiento de un genotipo en un ambiente.

En general, los modelos multiplicativos tienen un componente aditivo (lineal) y un componente que consiste en la suma de términos multiplicativos (bilineal). Las pruebas de hipótesis sobre la significancia de los componentes multiplicativos tratan de determinar el numero optimo de componentes multiplicativos que logren capturar, lo mas posible, los patrones de respuesta reales (mas signo que ruido) y que dejen en un "residual" los componentes multiplicativos que representen mas ruido que signo. Los modelos multiplicativos usados para el análisis de ensayos de variedades son los modelos AMMI (Additive Main effect and Multiplicative Interaction), COMM (Completely Multiplicative), SREG (Sites Regression), GREG (Genotypes Regression) y SHMM (Shifted Multiplicative).

Desde 1992 hasta la fecha ha habido estudios teóricos que explican como los modelos SHMM y SREG pueden ser usados para agrupar ambientes similares e identificar mega-ambientes. Se ha encontrado que si el ajuste de estos modelos con solo un componente multiplicativo ($SHMM_1$ y $SREG_1$) es adecuado, entonces estos modelos tienen la propiedad de predecir diferencias entre genotipos en un ambiente cualquiera que son *proporcionales* a las diferencias entre esos genotipos en cualquier otro ambiente. Si $SHMM_1$ y $SREG_1$ no ajustan los datos adecuadamente entonces estos modelos predicen diferencias entre genotipos en un ambiente cualquiera que son *desproporcionales* (desviación de *proporcionalidad*) de a las diferencias entre esos genotipos en cualquier otro ambiente. Usando SHMM y SREG se pueden identificar sub-conjuntos de ambientes (mega-ambientes) donde los genotipos no presentan interacción opuesta (IO). Usando el modelo SHMM también se pueden formar sub-conjuntos de genotipos sin interacción opuesta (IO) y de esta forma observar patrones de respuesta similares para ciertos genotipos.

Otro objetivo importante de los ensayos de variedades es predecir la producción de un genotipo en ambientes. Recientemente ha habido estudios que han mostrado que los modelos multiplicativos con estimadores “encogidos” (shrinkage) pueden ser usados para predecir la performance de genotipos en ambientes. Se ha encontrado que en muchos casos estos modelos predicen mejor la producción de un genotipo en un ambiente que los conocidos estimadores BLUP (Best Linear Unbiased Predictors) de los promedios de las celdas. En casi todos los casos se ha encontrado que los peores predictores son los promedios aritméticos de producción de un genotipo en un ambiente.

QTLs: Modelos Estadísticos en la Genética de Caracteres Cuantitativos en Plantas

Emilio A. Carbonell y María José Asíns
Unidad de Biometría e Informática y Laboratorio de Genética
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia

Muchos caracteres de interés en Mejora Vegetal muestran variación continua y se les denominan caracteres cuantitativos (QTs). Los principios genéticos que regulan su herencia son básicamente los mismos que afectan a los caracteres cualitativos (o, tradicionalmente llamados, mendelianos). Sin embargo, la genética de los QTs ha usado modelos específicos basados en el hecho de que la segregación de los genes responsables de su variación no podía ser seguida de forma individualizada. Sería interesante poder trasladar el marco mendeliano a los QTs de modo que se pudieran examinar directamente los efectos individuales de los factores (¿genes?) responsables de su variación. Este es un problema que ya empezó a estudiarse en los años 20 pero los intentos sistemáticos para analizar los QTs en sus componentes genéticos individuales estuvieron limitados por la falta de marcadores cualitativos polimórficos que cubrieran una parte importante del genoma. Estas limitaciones fueron parcialmente superadas por el uso de isoenzimas y prácticamente resueltas con la llegada de los marcadores a nivel de ADN. Así pues, la disponibilidad de mapas genéticos detallados, ha hecho posible diseccionar los caracteres cuantitativos en factores discretos llamados QTLs de modo que se pueden obtener estimaciones de su posición dentro del genoma y del efecto de los genes que en él segregan. Naturalmente, para poder obtener estas estimaciones ha sido necesario el desarrollo paralelo de modelos estadísticos “ad hoc”.

Los diseños experimentales que se emplean en Mejora Vegetal dependen del sistema reproductivo de la especie a mejorar; consecuentemente, los métodos estadísticos para la detección de QTLs también serán diferentes en ambos casos.

Con respecto a plantas autógamas, el análisis de QTLs se ha enfocado desde diferentes estrategias dependiendo del número de marcadores estudiados simultáneamente. Los modelos iniciales consideraban un marcador cada la vez, repitiendo el análisis de forma independiente para cada marcador. En estos modelos se estudia la media del carácter dentro de cada clase genotípica del marcador mediante un enfoque de comparación de medias o de análisis de varianza. Si las medias del carácter cuantitativo son diferentes, es una indicación de la presencia de un QTL asociado al marcador en cuestión. Más tarde, los modelos consideran parejas de marcadores que definen un intervalo, estudiando si el QTL se encuentra o no dentro de ese intervalo. Paralelamente, los modelos estadísticos dirigieron su atención a estudiar todo el grupo de ligamiento conjuntamente mediante métodos de regresión múltiple. Finalmente, los dos últimos enfoques se han combinado mediante un análisis de covarianza de modo que, siguiendo una metodología de intervalo, se emplean otros marcadores fuera del intervalo como covariables. La ventaja de la

estrategia de un solo marcador es que no necesita la obtención previa de un mapa de ligamiento; sin embargo, las estimaciones de los efectos de los QTLs están sesgadas.

Aunque el mapeo de QTLs en poblaciones alógamas tiene muchas similitudes con el de autógamas, existen diferencias fundamentales que deben ser tenidas en cuenta en los modelos estadísticos. Así, mientras que en autógamas los parentales son genéticamente uniformes, los que se emplean en alógamas pueden ser muy variables por lo que solo una parte de ellos son informativos con respecto al ligamiento de un QTL segregante. Para que un parental sea informativo debe ser heterozigoto tanto para el marcador como para el QTL. Por otro lado, solo hay dos alelos segregando en autógamas mientras que debe tenerse en cuenta la posibilidad de alelos múltiples segregando en alógamas. Por último, en poblaciones alógamas, los individuos pueden diferir en la fase de ligamiento entre el marcador y el QTL; ello obliga a que los métodos empleados en autógamas (principalmente en lo que se refiere a los de un marcador a la vez) deban ser estudiados dentro de cada parental. En la charla se discutirán algunos métodos para cruces entre poblaciones o para poblaciones de genealogía conocida.

El estudio de QTs tiene dos tipos de aplicaciones concretas. Por un lado para ser utilizados en programas de mejora como un elemento más en el criterio de selección para el carácter de interés. Otra aplicación no menos importante es poder interpretar la naturaleza de fenómenos fundamentales en Genética tales como la interacción genotipo-ambiente, heterosis, pleiotropía, etc.; en definitiva, poder diseccionar un carácter cuantitativo. De todas formas, dado el elevado costo que conlleva el análisis de QTLs (establecimiento de una población segregante, evaluación del carácter cuantitativo y "genotipado" de sus individuos para los marcadores), es necesario que los análisis puedan ser elaborados en poblaciones o estructuras familiares desarrolladas en las propias poblaciones de mejora.

Para poder emplear los diferentes modelos es necesario conocer cuales son las suposiciones de base de cada uno de ellos. Por desgracia, es frecuente observar que en algunos artículos publicados se hace un mal uso de los métodos y de los programas de cálculo desarrollados al efecto. Por tanto, se pondrá énfasis en los problemas que se encuentran en la utilización de los diferentes métodos.

MODELOS DE VALORACIÓN GENÉTICA DE CANDIDATOS A LA SELECCIÓN

J. Altarriba
Dep. Anatomía, Embriología y Genética Animal, Univ. Zaragoza

El problema fundamental de la selección artificial puede contemplarse como un problema de predicción del mérito genético, que por naturaleza es una parte no observable del fenotipo. El desarrollo de la metodología necesaria para alcanzar este fin ha ocupado, con intensidades desiguales, el siglo actual y ha permitido producir importantes transformaciones en los sistemas biológicos productores de alimentos, atendiendo a los distintos objetivos de selección.

El elemento esencial fue la definición de las bases teóricas de la genética cuantitativa (modelo infinitesimal). A continuación, tomando como principal punto de apoyo el coeficiente de parentesco, para comprender los componentes causales del parecido entre parientes, se formula el índice de selección mediante regresión aleatoria.

Por tanto, el análisis genético y el análisis estadístico se confunden y se impone la necesidad de exigir cualidades estadísticas determinadas a las valoraciones genéticas. Además, de forma coherente, se definen los criterios óptimos para realizar la predicción del mérito genético en el sentido de maximizar la esperanza del progreso genético.

Por otra parte, la asunción en todos los modelos de perturbaciones que sobre la expresión fenotípica de un carácter cuantitativo ejercen los efectos ambientales planteó la necesidad de eliminar dichas perturbaciones. En un principio se pensó en la posibilidad de ejercer un control físico ubicando los animales en estaciones con ambiente controlado. Siguiendo esta estrategia se realizaban las valoraciones genéticas en base a grupos de animales tomados al azar con un determinado grado de parentesco con los candidatos a la selección. Sin embargo, los costes eran elevados, el número de animales valorables era bajo, era difícil comparar animales de tandas distintas y la existencia de interacción genotipo-ambiente provocaba que los resultados en estación presentaran una baja correlación con los resultados en campo. La selección era poco eficaz.

En 1973 Henderson presentó formalmente la metodología del modelo mixto aplicada a la evaluación de reproductores y la estimación de la tendencia genética, metodología conocida genéricamente como BLUP (Best Linear Unbiased Prediction). Esta metodología permite superar algunos de los problemas planteados en el análisis de datos de campo: gran desequilibrio del número de descendientes por rebaño, los reproductores no se distribuyen al azar entre los rebaños, los reproductores pertenecen a más de una población y existencia de tendencia genética y ambiental. Este planteamiento ha permitido cambiar de estrategia general; sustituir el control físico, ejercido en estaciones de control, por el control estadístico, lo que supone recoger un volumen más elevado de información, aunque más *contaminada*, en su ambiente productivo.

Este cambio de enfoque ha puesto de manifiesto con mayor intensidad una característica importante de la evaluación genética; los resultados individuales para que posean capacidad predictiva deben calcularse con los componentes de varianza y covarianza de la población, y esto no siempre se conoce. Por este motivo, los últimos años se han dedicado a desarrollar métodos de estimación de componentes de varianza, destacando los basados en máxima verosimilitud (Hartley y Rao, 1967) y máxima verosimilitud restringida (Patterson y Thompson, 1971).

Igualmente han avanzado los procedimientos operativos que desarrollan las bases teóricas. Entre estos cabe destacar el método propuesto por Henderson (1976) para obtener directamente la inversa de la matriz de parentesco o de relaciones aditivas. Esta contribución ha sido clave en el desarrollo de los criterios de selección ya que permite incorporar de forma sencilla toda la información disponible de parentescos, lo que, a su vez, ha permitido desplazar a los índices clásicos de selección. Esta tarea se ha visto facilitada por el gran avance de los ordenadores y su posibilidad de utilización, sin lo cual algunos de los métodos estadísticos propuestos seguirían sin poder aplicarse prácticamente. Por estos motivos, en la actualidad, el modelo generalizado de valoración genética es el modelo animal.

Finalmente han surgido nuevos planteamientos metodológicos de carácter estocástico, tanto para la estimación de mérito genético de los candidatos a la selección como, simultáneamente, para la estimación de componentes de varianza y covarianza, que abren nuevas perspectivas en el campo de la genética cuantitativa y la mejora animal. Estos métodos están basados en técnicas de inferencia bayesiana. Sus principales características son: gran versatilidad para resolver distintos modelos, facilidad de programación y aportan no sólo los momentos centrales de las distribuciones, sino también las distribuciones empíricas (posteriores marginales) de los parámetros y de las predicciones (Gianola y Fernando, 1986). Otras ventajas de estos planteamientos residen en poder trabajar con modelos más complejos que permitan describir mejor los datos: modelos umbral, funciones de producción, de Poisson para prolificidad, robustos (distribución t en lugar de normal) para corregir el tratamiento preferencial, inclusión de Qtls, efectos de dominancia, maternos, etc., no solo desde la inferencia bayesiana sino desde la modelización.

Funciones de producción

Los ciclos biológicos del ganado suelen modelizarse usando curvas de producción (crecimiento, lactación...). Estas curvas se utilizan para predecir el rendimiento y comparar los distintos animales en momentos determinados del ciclo. El modelo matemático de una función de producción se define generalmente mediante pocos parámetros. En algunos casos, éstos parámetros pueden tener una interpretación biológica, en cuya situación pueden considerarse como variables biológicas subyacentes, mostrando variabilidad tanto en relación a efectos ambientales como variabilidad genética individual. En consecuencia pueden construirse criterios de mejora para seleccionar los animales en función de los parámetros de las funciones de producción de tales variables subyacentes.

El análisis genético de estas variables se basa en la función de probabilidad $f(y \mid \theta, \phi)$, que es la probabilidad de los registros de producción (y) dadas las variables subyacentes θ y los parámetros relativos a las relaciones aditivas y ambientales en las funciones de producción ϕ. En el contexto bayesiano, la distribución posterior conjunta de los datos y los parámetros, $f(\theta, \phi \mid y)$ es proporcional a la verosimilitud $f(y \mid \theta, \phi)$ multiplicada por la distribución a priori de los parámetros $f(\theta, \phi)$. Utilizando el algoritmo Gibbs sampling (Geman y Geman 1984; Gelfand y Smith, 1990), se realiza la marginalización de cada variable del modelo en la distribución multivariada posterior, obteniéndose los parámetros poblacionales y los valores genéticos de cada individuo.

Este análisis utiliza bajo un único modelo toda la información disponible y ha mostrado claras ventajas en relación al procedimiento tradicional basado en dos etapas: a) ajustar los rendimientos productivos de cada animal aisladamente a un momento determinado del ciclo, y b) aplicar un modelo de análisis genético convencional a los datos ajustados previamente.

Estas cuestiones han sido estudiadas en caracteres de crecimiento de ganado vacuno de carne, considerando una función lineal entre 100 y 300 días de edad (Varona et al., 1997) y una función de Von Bertalanffy (Varona et al., 1999). Asimismo, ha sido tratado en ganado vacuno lechero ajustando el ritmo de producción a la función de Wood (Varona et al., 1998).

La generalización de este planteamiento para analizar cualquier función de producción requiere la definición de la distribución posterior conjunta a partir de la densidad de probabilidad de los registros productivos dadas las variables subyacentes de las funciones de producción y su distribución a priori.

Modelo Umbral

Otro ejemplo del uso de estas metodologías es su aplicación al carácter prolificidad en ganado ovino, asumiendo que los datos se ajustan al modelo umbral clásico. Este modelo permite relacionar la respuesta observada en la escala categórica con una variable continua subyacente. La relación entre ambas escalas se establece mediante un umbral.

El correspondiente modelo animal con efectos ambientales permanentes se aborda asumiendo distribuciones a priori normales multivariantes (Altarriba et al., 1998) y se resuelve mediante Gibbs sampling con aumento de datos (Albert y Chib, 1993; Sorensen et al. 1995)) para construir la variable subyacente.

Referencias

Albert JH y S Chib (1993) *J. Am. Stat. Assoc.* 82: 669
Altarriba J, Varona L, García-Cortés LA y C Moreno (1998) *J. Anim Sci.* 76: 23
Geman S y D Geman (1984) *IEEE Trans. Pattn. Anal. Mach. Intell*. 6: 721

Gelfand A y AFM Smith (1990) *J. Am. Stat. Assoc*. 85: 398
Gianola D y RL Fernando (1986) *J. Anim. Sci*. 63: 217
Henderson CR (1973) En *Proc. Anim. Breed. Genet. Symp. in Honor of Dr. J.L. Lush,* Amer. Soc. Anim. Sci. & Amer. Dairy Sci. Assoc.: 10
Henderson CR (1976) *Biometrics* 32: 69
Hartley HO y JNK Rao (1967). *Biometrika* 59: 93
Patterson HD y R Thompson (1971). *Biometrika* 58: 545
Sorensen D, Andersen S, Gianola D y I Korsgaard (1995*) Genet. Sel. Evol.* 27: 229
Varona L, Moreno C, Garcia-Cortés LA y J Altarriba (1997) *Lives. Prod. Sci.* 47: 201
Varona L, Moreno C, García-Cortés LA y J Altarriba (1998) *J. Dairy Sci*. 81:1460
Varona L, Moreno C, García-Cortés LA, Yagüe G y J Altarriba (1999) *J. Anim. Breed. Genet.* (aceptado)

POLIPLOIDÍA Y HETEROSIS: LA TRIBU TRITICEAE COMO MODELO

Antonio Martín
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España

El mejorador genético de plantas modifica la estructura genética de las poblaciones con el objetivo final de maximizar el rendimiento. Uno de los métodos más eficaces, que revolucionó la industria de las semillas, ha sido la producción de variedades híbridas. Esta es la forma comercial de explotar la heterosis, ya que estos cultivares híbridos poseen un elevado nivel de heterocigosis puesto que para muchos loci la planta dispone de dos alelos distintos. El inconveniente, para el agricultor, es que la simiente tiene que ser producida a partir de las líneas puras parentales cada generación.

La Naturaleza ha encontrado una solución equivalente para utilizar la heterosis sin necesidad de reproducir el híbrido en cada generación: los aloploides. Un aloploide reúne en su núcleo los genomas de dos o más especies con lo que se consiguen heterocigotos intergenómicos. La heterosis se fija en homocigosis y se mantiene de generación en generación.

La poliploidía es el proceso citogenético de mayor impacto en la Evolución de las plantas superiores. Según Stebbins [8] cerca del 50% de las Angiospermas son de origen poliploide. El incremento del contenido en ADN que conlleva la poliploidización es un elemento de la macroevolución al proporcionar material para la diferenciación génica. Por tanto, la aloploidía (y el incremento en ADN asociado con ésta) debe proporcionar una heterosis preadaptativa positiva. Sin embargo, al nivel específico se acepta lo contrario, que este contenido está inversamente relacionado con el avance filogenético y la especialización ecológica. Los cambios en contenido en ADN son más rápidos en el repetitivo que en las secuencias génicas, entre las que se conserva incluso la organización cromosómica. Así, el mapeo comparativo en cereales ha puesto de manifiesto que salvo para un reducido número de traslocaciones intergenómicas en las que están implicados muchos cromosomas, los genes en los cromosomas homeólogos muestran colinealidad y entre diferente especies un elevado nivel de sintenia. Se ha propuesto que el genoma de los cereales podría alinearse, en cuanto a las secuencias génicas en base a bloques de un ancestro común[6].

Mucho menos se conoce sobre la evolución y las relaciones genómicas de las secuencias repetitivas. Es evidente que existe un proceso de homogeneización en gran parte del genoma que da lugar a mayor diversidad entre especies que dentro de especies. Este modelo de variación se describe por primera vez en la familía de genes y espaciadores del ARNr en anfibios[2]. Los espaciadores presentan mutaciones diferentes entre especies y evolucionan libremente. En cambio dentro de especie no existen prácticamente diferencias entre los cientos de copias de la unidad gen-espaciador. Existe pues una evolución concertada que resulta en que estas secuencias repetitivas (independientemente del número de copias, función o distribución) conserven su identidad dentro de una especie frente a la variación entre especies [4].

La heterosis fijada en los aloploides (y tambien de los autoploides) podría deberse a bloques cromosómicos, como la seudo-superdominancia en diploides [1]. Los efectos subvitales de la ploidía, se deberían al cambio brusco del contenido en ADN, fundamentalmente al repetitivo.

En el híbrido, la regularidad meiótica, y por tanto la fertilidad, estará favorecida por la similitud cromosómica. Sin embargo, tras la duplicación cromosómica la regularidad meiótica estará favorecida por la diferenciación entre los genomas de ambos parentales, y no debería existir esterilidad por esta causa, si esta diferenciación es total. La distancia filogenética es un factor positivo tanto en la regularidad meiótica como en la heterosis. El proceso evolutivo progresa hacia la diploidización del poliploide mediante diversas estrategias, génicas y cromosómicas.

Entre los complejos poliploides de mayor importancia agronómica destacan las gramíneas y dentro de ellas la tribu Triticeae con cultivos tan importantes como el trigo (duro y harinero) la cebada o el centeno. El trigo harinero (*Triticum aestivum* L. em. Thell., 2n=6x=42, **AABBDD**), el cultivo más importante, por superficie cultivada en el mundo, para alimentación humana es una especie muy joven. Apareció recientemente (considerando la escala evolutiva) cuando el trigo duro (*T. turgidum* Desf. em. M.K., 2n=4x=28, **AABB**) se cruzó en la Naturaleza con un pariente silvestre (*Aegilops tauschii* Coss., 2n=2x=14, **DD**). La incorporación del genoma **D** supuso un cambio en la adaptabilidad y en el uso del trigo duro. La nueva especie expandió su distribución ecogeográfica y pasó de ser una planta de clima mediterráneo a cultivarse en todo el mundo templado. El mejorador imitó este proceso y ha obtenido una nueva especie cultivada, el triticale hexaploide (×*Triticosecale* Wittmack, 2n=6x=42, **AABBRR**), cruzando dos plantas cultivadas, el trigo duro (*T. turgidum*, 2n=4x=28, **AABB**) y el centeno (*Secale cereale* L., 2n=2x=14, **RR**) y duplicación cromosómica del híbrido.

En el trigo los genomas **A**, **B** y **D** retienen la suficiente homeología para aparear en meiosis y la regularidad meiótica, el comportamiento en meiosis como diploides, es resultado de la selección natural. En trigo existen sistemas génicos responsables de la regularidad meiótica el más importante de ellos es el gen *Ph*1 localizado en el cromosoma 5**B**. En ausencia de este gen (o mutantes inactivos) se observan multivalentes y reducción de fertilidad, cuando está presente, tanto los trigos tetraploides (**AABB**) como los hexaploides (**AABBDD**) se comportan como diploides, observandose exclusivamente bivalentes en la MI de la meiosis. La homeología en trigo permite la sustitución de pares homeólogos, los tres genomas se complementan, permitiendo la serie de nuli-tetrasómicos. Ésta es la base de la heterosis estructural, el hecho de que el mismo carácter está controlado potencialmente por tres loci homeólogos.

Como se dijo anteriormente se conserva la colinealidad génica entre los tres genomas. Sin embargo la aloploidía en trigo ha ido acompañada de eliminación rápida y no aleatoria de DNA de bajo número de copias [5]. El caso de la secuencia pAs1 es digno de mención. Esta secuencia fue aislada de *A. squarrosa* (syn. *A. tauschii*)[7] y

en principio se consideró una secuencia específica del genoma **D**. Sin embargo Cabrera et al. [3] comprobaron que producía hibridación cruzada en *Hordeum chilense* y además el patrón de bandas cromosómicas que se obtenía era casi idéntico al obtenido en *A. tauschii* y muy similar al patrón de bandas C. El paralelismo con la conservación de los bloques de secuencias génicas en toda la tribu Triticeae probablemente sea casual pero necesitamos profundizar en esa dirección hasta llegar a un conocimiento de las relaciones que existen entre la localización en el cromosoma de las secuencias repetitivas y su función.

Referencias

1. Bingham ET: Role of chromosome blocks in heterosis and estimates of dominance and overdominance. In: Lamkey KR, Staub JE (eds) Concepts and breeding of heterosis in crop plats, pp. 127. Crop Science Society of America, Madison, USA (1998).
2. Brown DD, Wensink PC, Jordan E: A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*; the evolution of tandem genes. J. Mol. Biol. 63: 57-73 (1972).
3. Cabrera A, Friebe B, Jiang J, Gill BS: Characterization of *Hordeum chilense* chromosomes by C- banding and in situ hybridization using highly repeated DNA probes. Genome 38: 435-442 (1995).
4. Dover G: Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature 299: 111-117 (1982).
5. Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA, Vega JM: Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differenciation of homoeologous chromosomes. Genetics 147: 1381-1387 (1977).
6. Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD: Grasses, line up and form a circle. Current Biology 5: 737739 (1995).
7. Rayburn AL, Gill BS: Isolation of D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. Plant Mol. Biol. Rep. 4: 102-109 4: 102-109 (1986).
8. Stebbins GL: Chromosomal Evolution in Higher Plants. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts (1971).

MÉTODOS PARA DETECTAR HETEROSIS CON MARCADORES MOLECULARES

J. Moreno-González
Centro de investigaciones Agrarias de Mabegondo, Apartado 10, 15080 A Coruña

La explotación de la heterosis ha sido y es ampliamente usada en la mejora genética de plantas y animales para obtener híbridos F_1 superiores a los padres. El análisis de la heterosis se basaba en la utilización de diseños genéticos clásicos que permitían la detección de cruzamientos específicos entre líneas parentales. Las nuevas técnicas de genética molecular son herramientas valiosas que pueden ayudar y complementar los procedimientos convencionales de la mejora genética. Los marcadores moleculares han sido usados extensivamente para estimar distancias genéticas entre poblaciones, líneas o estirpes (Dudley et al. 1991, Llauradó et al. 1993, Dudley 1994, Link et al. 1996, Melchinger 1999) y para estimar el grado de heterocigosis, variabilidad y polimorfismo de las poblaciones (Llaurado et al. 1993, Pereira-Lorenzo et al. 1996). Se ha encontrado un cierto grado de asociación entre distancias genética entre dos líneas y el grado de heterosis. Los marcadores moleculares pueden también ayudar al mejorador de plantas a asignar líneas puras a grupos heteróticos diversos (Melchiger 1999).

Los objetivos de este estudio han sido: (1) Desarrollar modelos genéticos que puedan detectar efectos heteróticos en poblaciones o líneas. (2) Investigar el efecto de algunos parámetros de las poblaciones en la estimación de heterosis en los cruzamientos con un probador o *tester*. (3) Crear dos poblaciones F_2 que muestren heterosis y a las que se pueda aplicar la selección recurrente recíproca asistida con marcadores moleculares (SRRAM). (4) Comparar mediante la teoría de genética cuantitativa y estudios de simulación, la selección recurrente recíproca (SRR) clásica, la selección combinada SRRAM y la selección exclusivamente basada en predicciones moleculares (SPM).

El método de regresión iterativo (MRI) consistía en lo siguiente: una vez que un QTL (locus de un carácter cuantitativo) con efecto heterótico significativo había sido detectado, el modelo buscaba por iteraciones sucesivas la localización del QTL en el intervalo del mapa genómico acotado por dos marcadores consecutivos. El MRI localizaba mejor el QTL en el genoma, producía un menor error residual y explicaba una mayor proporción de la varianza genética que el método clásico de regresión propuesto por Moreno-González (1993). La estrategia para crear dos poblaciones F_2 heteróticas consistía en: (1) Separar las líneas puras en dos grupos heteróticos de acuerdo con marcadores moleculares. (2) Predecir la mayor varianza genética que existe en poblaciones F_2 derivadas del cruce de dos líneas basándose en marcadores moleculares (Charcosset and Essioux 1994, Moreno-González 1999). (3) Predecir la ganancia genética de la selección SRR basándose en la teoría clásica y en los parámetros antes estimados. (4) Aplicar la selección asistida basada en marcadores moleculares a las dos poblaciones creadas (SRRAM).

En un estudio de simulación, la selección combinada de comportamiento de los fenotipos y los marcadores moleculares SSRAM resultó mejor en todas situaciones que la selección recurrente recíproca (SRR) clásica basada en los fenotipos. A su vez la selección exclusivamente basada en la predicción de los marcadores moleculares (SPM) es muy sensible al número de familias o genotipos evaluados y marcados. Si el número de genotipos es pequeño, la SRR es mejor que la SPM, pero si e número es grande, la SPM es mejor que la SRR y se aproxima a la SRRAM. Un programa de selección con un numero alto de familias a evaluar y una intensidad de selección alta es de esperar que mantenga la ganancia genética y el equilibrio de ligamiento necesario para la utilización de marcadores moleculares durante varias generaciones.

Referencias:

Charcosset, A., and L. Essioux. 1994. The effect of population structure on the relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci. Theor. App. Gent. 89:336-341.

Dudley, J.W.; M.A. Saghai Maroof and G.K. Rufener. 1991. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. Crop Sci. 31:718-723.

Dudley: J.W. 1994. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. *In* Analysis of molecular marker data. Joint Plant Breeding Simposia Series. American Society for Horticultural Science/Crop Science Society of America; pp.3-7.

Link, W., H. Shill, A.C. Barbera, J.I. Cubero, A. Filippetti, L. Stringi, E. von Kittlitz, and A.E. Melchinger. 1996. Comparisons of intra- and inter- pool crosses in faba beans (*Vicia faba* L.). I. Hybrid performance and heterosis in Mediterranean and German environments. Plant Breeding 115:352-360.

Llauradó, M., J. Moreno-González, and P. Arús. 1993. Classificacion of northern Spanish populations of maize by methods of numerical taxonomy. II. Isozyme variation. Maydica 38:249-258.

Melchinger, A.E. 1999. Genetic diversity and heterosis. *In* The Genetics and exploitation of heterosis in crops. American Society of Agronomy, Inc./Crop Science Society of America, Inc. pp. 99-118.

Moreno-González, J. 1993. Efficiency of generations for estimating marker-associated QTL effects by multiple regression. Genetics 135:223-241.

Moreno-González, J. 1999. Molecular markers and heterosis. *In* The Genetics and exploitation of heterosis in crops. American Society of Agronomy, Inc./Crop Science Society of America, Inc. pp. 257-268.

Pereira-Lorenzo, S., J. Fernández-López, and J. Moreno-González. 1996.Variability and grouping of chesnut cultivars. II. Isoenzyme variation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121(2):190-197.

2 / 01

PARAMETROS GENETICOS EN AJONJOLI (Sesamum indicum L.)

Laurentin Táriba, Hernán, y Montilla, Daniel
Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, apartado postal 400, vía Agua Viva, Barquisimeto, Venezuela. e-mail: helauren@telcel.net.ve

En una población de ocho líneas promisorias de ajonjolí (Sesamum indicum L.) se evaluó durante tres años el rendimiento/parcela, el rendimiento unitario y diez de sus componentes, con el objetivo de determinar para cada una de las variables sus varianzas fenotípicas y genotípicas, heredabilidad en sentido amplio, coeficiente de variación genético y avance de selección esperado con una intensidad de 2,06. La interacción GenotipoxAño fue altamente significativa ($p<0,01$) para todas las características evaluadas, siendo de gran magnitud para número de ramas/planta, longitud de carga/ramas, longitud de carga/planta, número de cápsulas/ramas y número de cápsulas/planta, a tal punto, que la varianza genética estimada para ellas resultó en cero. La heredabilidad osciló entre valores de 0 para las variables ya mencionadas, hasta 72, 76 y 87% para altura de planta (AP), rendimiento unitario (RU) y rendimiento por parcela (REND) respectivamente. Los coeficientes de variación tuvieron máximos valores para número de cápsulas/eje principal (CEP), (12,65%), RU (16,46%) y REND (17,00%). Los mayores avances de selección esperados correspondieron a CEP, AP, RU y REND con valores de 14, 16, 30 y 33% de sus respectivos promedios. Los resultados obtenidos sugieren respuestas favorables a la selección para estas últimas cuatro características, sin embargo, hay que considerar que las evaluaciones se hicieron en solo 1 localidad, por lo tanto en la varianza genética calculada pueden confundirse efectos de interacción GenotipoxLocalidad y GenotipoxLocalidadxAño. Una situación similar se evidenció al calcular reducciones de hasta 100% de la varianza genética estimada al analizar los datos en forma combinada vs. análisis en sólo 1 año.

2 / 02

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE GERMOPLASMA FORÁNEO DE *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Montero, I.[1], Magallanes, J.[2], Ron, A. M. de[1]
[1] MBG-CSIC. PONTEVEDRA. ESPAÑA, [2] UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA. ICA. PERÚ

Tras haberse realizado en la MBG-CSIC, Pontevedra, desde 1987, evaluaciones y caracterizaciones de germoplasma de judía de la Península Ibérica, comenzó también la evaluación de material exótico de otras procedencias (en la actualidad existen variedades de 10 países), para completar la caracterización de la colección de germoplasma y obtener información acerca del valor agronómico y cualitativo de ese material genético.

Los objetivos del presente trabajo son:
-Evaluación de caracteres cuantitativos de interés agronómico e indicadores de calidad para consumo de grano y vaina.
-Evaluación de la adaptación a las condiciones ambientales del Noroeste de España.
-Clasificación taxonómica de las variedades estudiadas.

Se evaluaron 13 variedades griegas y 5 peruanas, en las fincas experimentales del CIAM (La Coruña) y la MBG-CSIC (Pontevedra), según un diseño completamente aleatorizado.

Para el análisis de la variación de los caracteres estudiados, se realizó la media, el error de la media y el intervalo de variación. Para estructurar la variación se realizó un análisis de grupos o *cluster* empleándose el método UPGMA.

Las variedades estudiadas pueden separarse en 4 grupos. De acuerdo al origen geográfico, las variedades peruanas aparecen separadas en el grupo II, excepto una variedad (PHA-0946) que aparece con variedades griegas en el grupo III.

En caracteres relacionados con la adaptación, la variedad más precoz es PHA-0945 con 42 días, con mayor proporción de semilla viable fueron las variedades PHA-0688, PHA-0943, y PHA-0942 (98,22, 98,20 y 97,70 %), y destacando por su rendimiento de grano las PHA-0702 y PHA-0946 (30,98, 29,13 g/planta), mientras que para masa de 100 semillas destacan las PHA-0688 y PHA-0695 con 96,4 y 83,6 g.

2 / 03

IDENTIFICACIÓN ISOENZIMÁTICA DE LÍNEAS PURAS DE *Phaseolus* PROCEDENTES DE POBLACIONES GALLEGAS

Ron, A. M. de, Rodiño, A. P., Lindner, R., Santalla, M.
MBG-CSIC. Pontevedra. España

La caracterización de líneas de judía común (*Phaseolus vulgaris*, L.) basada en caracteres morfoagronómicos está sujeta a errores por los cambios en las condiciones ambientales ya que hay diferencias fenotípicas poco discriminatorias. Así, técnicas bioquímicas, como la electroforesis, que usan marcadores moleculares, como los isoenzimas, proporcionan un método más adecuado para el estudio de la variación genética y pueden servir como Ahuella@ de los rasgos morfológicos, de composición y fisiológicos. Además, son importantes para poner en marcha un plan de mejora genética que trate de obtener variedades mejoradas genéticamente por medio de selección artificial.

Se han usado en este estudio 10 líneas de mejora obtenidas a partir de 3 poblaciones gallegas de judía común. La población PHA-0020 da lugar a las líneas PMB- 0003 y PMB-0005; la PHA-0272 a PMB-0063, PMB-0064, PMB-0067, PMB-0069 y PMB-0070 y la PHA-0306 a PMB-0075, PMB-0078 y PMB-0082. La electroforesis se realizó en gel de almidón y se usaron 6 isoenzimas que son: Shikimato deshidrogenasa, Enzima málica y Rubisco realizadas en hoja trifoliar joven y Peroxidasa, Malato deshidrogenasa y Diaforasa en puntas de meristemo de raíz.

Se obtuvieron las frecuencias génicas para cada alelo en cada línea y población y se observa así la diversidad existente. La PHA-0272 presenta una frecuencia del 58% del alelo ME98 y del 42% del ME100 y las líneas a las que da lugar presentan con una frecuencia del 100% uno de los alelos. Se observa entonces que las poblaciones presentan una mayor diversidad ya que son muestras más heterogéneas que las líneas de mejora que presentan un 100% de individuos homocigóticos y donde se ha fijado un alelo para cada isoenzima, como era de esperar y confirmando así la pureza de la línea.

2 / 04

LÍNEAS PURAS DE GUISANTE SELECCIONADAS PARA DIFERENTES USOS

Magallanes J.[1], Hernández J.[2], Varela M.[2], Amurrio J. M. [2], Ron A M. de[3]
[1] Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica. Perú, [2] Universidad de Santiago de Compostela. Lugo. España, [3] MBG-CSIC. Pontevedra. España

El guisante (*P. sativum*), es un cultivo muy habitual en diversas áreas de la Península Ibérica. El cultivo del guisante presenta un elevado valor de mercado, tanto por el aprovechamiento en vaina inmadura (tirabeque), como en grano (fresco o seco). En Galicia, su cultivo para consumo de vaina inmadura,apenas tiene incidencia, pues, su uso principal es para consumo de grano fresco o seco. En la Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC, Pontevedra), se ha llevado a cabo la recolección de variedades de guisante desde 1987 y actualmente se conservan 228 poblaciones, las cuales incluyen variedades aptas para consumo en fresco, vaina immadura y grano seco.

Desde 1989, han sido evaluadas todas las poblaciones locales de la colección de germoplasma, sobre la base de caracteres agronómicos, cualidad física de la semilla y vaina y en diferentes ambientes.

De acuerdo con los resultados de estas evaluaciones,se han seleccionado 324 líneas de guisante,procedentes de 47 poblaciones, destacando las poblaciones PSM-0112 y PSM-0114, con 35 y 21 líneas. La población PSM-0112 presenta valores: longitud y ancho de vaina (94,8 y 20,07 cm), número de vainas por planta (46), dureza de la vaina (21,09 kg/cm^2. 72), masa de 100 semillas (55,97 g), días a la floración (75,5), días a fin de floración (108,9), sin pergamino y flor púrpura. La población PSM-0114 presenta valores: número de vainas por planta (38), días a la floración (90). De éstas, 124 líneas presentan los mejores valores para consumo de grano fresco y 210 líneas para consumo de vaina inmadura.

En función de su valor agronómico, estas líneas puras serán usadas en los diferentes programas de mejora en la MBG-CSIC, para la obtención de nuevas variedades, mediante hibridación y selección.

2 / 05

ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES DE VARIACIÓN FENOTIPICA EN POBLACIONES DE *Pisum sativum* DE ESPAÑA

Magallanes J.[1], Amurrio J. M.[2], Ron A. M.de.[3]
[1] Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica. Perú, [2] Universidad de Santiago de Compostela. Lugo. España, [3] MBG-CSIC. Pontevedra. España

El objetivo del presente trabajo es la estimación de los componentes de varianza e interacciones genotipo-medio, de caracteres importantes en la mejora genética de poblaciones de guisante de diversas procedencias españolas.

La evaluación del material biológico se hizo en la finca experimental de la MBG-CSIC (Pontevedra) y "Mouriscade" de la Diputación de Pontevedra (Lalín, Pontevedra).El Diseño experimental fue de bloques al azar, con 2 repeticiones, cada unidad experimental con 115 tratamientos, en 2 ambientes y 2 períodos de cultivo.

Los análisis de varianza realizados sobre 105 variedades locales y 10 testigos comerciales, mediante el modelo general, mostraron diferencias altamente significativas entre poblaciones para la mayoría de los caracteres estudiados. Además, se destaca la importancia de las interacciones genotipo-medio, para los caracteres siguientes: inicio de floración (**), longitud de vaina (*), madurez para vaina y para grano(**), período de fructificación para vaina y para grano (**), sólidos solubles (**), masa de vaina verde (*) y dureza de la vaina (*).

2 / 06

CONTROL GENÉTICO DE LA RESISTENCIA AL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TOMATO SPOTTED WILT VIRUS) EN LA LÍNEA DE TOMATE UPV1

Roselló, S., Díez, M.J., Nuez, F.
mdiezni@btc.upv.es
Dpto. Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

El tomato spotted wilt virus es el agente causal de la enfermedad comúnmente conocida como bronceado del tomate. Este tospovirus se encuentra ampliamente extendido a nivel mundial, causando graves daños en numerosos cultivos hortícolas y ornamentales. Las medidas preventivas no son suficientes para frenar la enfermedad, por lo que el desarrollo de variedades resistentes es la solución más idónea.

La línea de mejora UPV1,resistente al bronceado, ha sido desarrollada en el Dpto. de Biotecnología a partir de la entrada resistente de Lycopersicon peruvianum PE-18, colectada por el propio equipo en Huallanca, (Departamento de Ancash, Perú). El estudio de la genética de la resistencia en esta línea se ha llevado a cabo mediante inoculaciones mecánicas y por medio del vector transmisor del virus, Frankliniella occidentalis.

La resistencia de UPV1 está controlada por un gen dominante, con penetración completa cuando se realizan inoculaciones mecánicas e incompleta si la transmisión se lleva a cabo mediante vector. El test de alelismo entre el gen de resistencia de UPV1 y el gen Sw5, proveniente de L. peruvianum, indica que ambos genes no segregan independientemente. En condición heterocigótica, el nivel de resistencia conferido por el gen de resistencia de UPV1 es superior al del gen Sw5, sugiriendo que en la región cromosómica introgresada desde L. peruvianum en UPV1 hay variabilidad genética útil para el desarrollo de híbridos comerciales.

Se desarrolla un modelo genético que permite el análisis de casos en los que se observa una superación parcial de la resistencia. Los parámetros de este modelo permiten cuantificar efectos como penetración y dosis génica. Ello permite un estudio con mayor profundidad de este tipo de resistencias.

2 / 07

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA APOMIXIS EN *CITRUS* Y *PONCIRUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

GARCÍA Mª ROSARIO, ASÍNS Mª JOSÉ, FORNER JUAN Bª, CARBONELL EMILIO
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra Moncada-Náquera
Km 4.5 46113 Moncada (Valencia)

La uniformidad y calidad de la producción de cítricos depende de la propagación de los patrones a partir de plántulas nucelares. Esto implica que la apomixis sea uno de los caracteres más importantes en los programas de mejora de patrones de cítricos. El control genético de la apomixis fue estudiado, en una progenie de cincuenta árboles obtenidos a partir de un cruce entre *C. volkameriana* x *P. trifiliata*, mediante análisis de 69 marcadores moleculares y la estrategia de segregación masal. El porcentaje de plántulas nucelares fue estimado mediante análisis isoenzimáticos de 25 plántulas por árbol, en dos años consecutivos. También fue estudiado, en los árboles que fructificaron, el tipo de embrionía (semillas poliembriónicas frente a semillas monoembriónicas).

Se han desarrollado mapas de ligamiento para cada especie parental por separado, detectándose diferencias en la organización genómica entre ambas especies. Mediante análisis de QTLs (quantitative trait loci) se han identificado seis posiciones genómicas (dos en *P. trifoliata* y cuatro en *C. volkameriana*) que explican hasta un 24% de la variación total para apomixis. Por lo tanto, el control genético de la reproducción apomíctica, en los cítricos (embrionía nucelar) es un carácter complejo. Los marcadores moleculares ligados a los QTLs que controlan la reproducción apomíctica serán útiles para asistir la selección de patrones de las variedades de cítricos.

2 / 08

VARIABILIDAD GENOTÍPICA PARA EL DESARROLLO FENOLÓGICO EN LA COLECCIÓN CORE DE CEBADAS ESPAÑOLAS.

Santiveri Morata, Paquita; Sole Riera, Joan Carles
Area de Conreus Extensius. Centre UdL-IRTA. Rovira Roure 177. 25198 LLEIDA.

Las colecciones CORE fueron desarrolladas como herramientas para investigadores y mejoradores con el fin de conocer y utilizar la diversidad presente en las colecciones de germoplasma. En España, la colección CORE de cebadas españolas está formada por 160 entradas representativas de las cerca de 2.000 preservadas por el Banco Nacional de Germoplasma. En el presente trabajo se pretende conocer la variabilidad existente en dicha colección para la fecha de espigado, carácter de vital importancia para ajustar el ciclo fenológico a las condiciones óptimas de cultivo y, de esta manera, maximizar el rendimiento.

Durante la campaña 1997-98, la colección CORE de cebadas españolas se sembró en Gimenells (Lleida), bajo condiciones de regadío. Cada entrada estaba representada por una repetición de dos surcos de 1 m de longitud, con un surco de trigo entre cada parcela como separación. Se determinaron las fechas de inicio de encañado, espigado y madurez.

Los resultados indicaron la existencia de una amplia variabilidad tanto para la fecha de inicio de encañado como para espigado. Los distintos genotipos comenzaron a encañar entre el día 91 y el 111 después de la siembra. En las cebadas más precoces el período siembra-antesis duró 117 días, prolongándose hasta 154. Sin embargo, estas diferencias se acortaron en la maduración (7 días).

La evaluación de la colección CORE contribuirá a ampliar el conocimiento de la diversidad genética existente en las cebadas españolas y permitirá una mayor utilización de este germoplasma en los programas de mejora.

2 / 09

HIBRIDIZACIÓN Y CULTIVO IN VITRO DE LA LENTEJA

Richard Fratini, Mª Luisa Ruiz
Area de Genética, Facultad de Biología
Universidad de León, 24071 León, España.

El bajo polimorfismo morfológico y molecular de la lenteja (*Lens culinaris* Medik.) resulta tanto un impedimento para la mejora clásica como para los métodos biotecnológicos. Cruces intra y inter-específicos permiten la introgresión de características de interés y aumentan la variabilidad genética existente, abriendo la posibilidad a la selección de nuevas combinaciones génicas. A nivel molecular, el incremento de polimorfismo y el estudio de generaciones recombinantes permite la elaboración de mapas moleculares con marcadores estrechamente ligados y flanqueantes a loci de interés.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, como el rescate de embriones y la micropropagación de híbridos, incrementan la eficiencia de cruces y aumentan la producción de semilla de individuos segregantes, permitiendo por lo tanto una más amplia selección y un análisis genético más detallado.

Los datos sobre las eficiencias de cruces intra-específicos de variedades españolas con otras variedades cultivadas de procedencia tanto nacional como extranjera se situan entre un 20 y un 70 %, dependiendo de las combinaciones parentales. Las eficiencias de cruces inter-específicos no superan el 3 %.

El rescate de embriones es necesario en el caso de cruces inter-específicos, en los cuales aborta el cigoto a una temprana edad, alrededor de 14 días después de polinización, un estudio sobre los factores que influyen en el proceso ha dado lugar a un protocolo de rescate de embriones con una eficiencia superior al 30 %. Se presenta un método rápido y eficaz de micropropagación de híbridos con una eficiencia superior al 80 %.

2 / 10

CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE LA TRIBU *TRITICEAE* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES (RAPDs)

P. García[1], J.V. Monte [2], C. Casanova[2] y C. Soler[2]
[1]Instituto Madrileño de Investigación Agraria (IMIA). 28 800-Alcalá de Henares
[2]Dpto. de Mejora Vegetal y Biotecnología (INIA). 28 800-Alcalá de Henares

La tribu *Triticeae* comprende un gran número de especies silvestres de gran interés por su utilización como forrajeras así como para la revegetación de suelos erosionados y degradados. En los últimos años la clasificación taxonómica basada en las relaciones genómicas de estas especies ha sido objeto de gran controversia.

Un mayor conocimiento de estas especies referente a sus relaciones genómicas y filogenéticas, sistemas de reproducción, variabilidad genética, su estructura y relaciones con factores ecogeográficos, aumentaría sus posibilidades de aplicación en los programas de mejora convencional.

En este trabajo se analiza la diversidad genética de 48 poblaciones naturales pertenecientes a las especies *Elymus caninus*, *E. hispanicus*, *Agropyrum cristatum*, *Thinopyrum intermedium*, *T.junceum*, *T. curvifolium* y *Elytrigia repens*, recolectadas en distintas localidades de la Península Ibérica, mediante la aplicación de los polimorfismos de ADN amplificados al azar con 20 oligonucleótidos

Los resultados del análisis de agrupamientos reflejan una clara diferenciación entre unidades taxonómicas, el distinto grado de polimorfismo interespecífico, así como la separación de estas especies en dos grupos, donde se discuten las relaciones genómicas entre estas especies basadas en el nuevo sistema de asignación genómica.

2 / 11

ESTUDIO DEL CONTROL GENÉTICO DE LA RESPUESTA AL FOTOPERIODO Y A LA TEMPERATURA EN LA CEBADA (HORDEUM VULGARE L.)

Rodríguez Medina, Alicia[1]; Montoya, Jose Luis[2]; Carrillo Becerril, José María[3].
(1) Departamento de Mejora Genética y Biotecnología. SGIT-INIA (Alcalá de Henares); (2) SIA (Valladolid); (3) Unidad de Genética Agraria. ETSIA (Madrid)

El fotoperiodo y la temperatura son dos de los principales factores ambientales que influyen en el desarrollo de la cebada. El conocimiento de los genes que en respuesta a estos factores controlan las distintas fases del desarrollo es fundamental para adaptar variedades a ambientes particulares y por lo tanto, para maximizar los rendimientos. Actualmente se conocen tres tipos de genes que controlan el tiempo a espigado en los cereales: los que controlan la respuesta al fotoperiodo, los que controlan la respuesta a la vernalización y los de precocidad que actuan con independencia del fotoperiodo y/o la temperatura. El estudio de la herencia de caracteres de desarrollo tales como el número de hojas del tallo principal (NHTP) y/o el tiempo a espigado (TE) permite avanzar en el conocimiento del control genético de la respuesta a estos factores ambientales. En ensayos realizados en invernadero, con diferentes parentales, F_1s y F_2s y bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, se ha visto que el TE es un carácter altamente heredable y que está controlado por un número reducido de genes mayores; siendo posible explicar su herencia mediante genes de vernalización, de sensibilidad al fotoperiodo y/o de precocidad. El NHTP también es altamente heredable y, aunque está fuertemente correlacionado con el TE, no parece que esté controlado por los mismos genes, por lo que parece probable la existencia de dos sistemas génicos diferentes. Ambos caracteres pueden ser utilizados como criterios de selección indirecta a la hora de obtener variedades adaptadas a zonas de cultivo concretas.

2 / 12

INFLUENCIA DE LOS LOCI DE PROTEÍNAS DE RESERVA DE TRIGO HEXAPLOIDE EN LOS PORCENTAJES DE PROTEÍNA TOTAL, POLIMÉRICA Y POLIMÉRICA NO SOLUBLE DE SUS HARINAS

Gómez Sánchez, Martín y Carrillo Becerril, José María
Unidad de Genética Agraria. E.T.S. Ingenieros Agrónomos.
Universidad Politécnica de Madrid.Avda Complutense. 28040 Madrid.

La determinación de la calidad de las harinas de trigo hexaploide pasa en la actualidad por la caracterización alélica de los 9 loci que codifican para las proteínas de reserva de endospermo. En la evaluación de esta calidad ha tenido siempre gran peso el contenido en proteína total, deseándose trigos de alto contenido en proteína para los procesos de panificación y de bajo contenido para la industria galletera. Estudios recientes atribuyen un mayor papel en calidad a las características de los polímeros formados por las subunidades de proteína. En el presente trabajo se estudian parámetros de calidad harinera para 126 líneas recombinantes procedentes de un cruzamiento entre un cultivar de alta calidad panadera y otro con aptitud galletera. Se determina electroforéticamente la composición alélica en los loci que codifican proteínas de reserva y se analizan los efectos aditivos y epistáticos de los alelos presentes sobre los contenidos en proteína total, proteína polimérica y proteína polimérica no soluble, obtenidos por SE-HPLC. Mientras ninguna de las variantes alélicas afecta al porcentaje de proteína total, el contenido en poliméricas está determinado por los alelos de los loci *Glu-A3, Glu-B1* y *Glu-A1*. Para el procentaje de poliméricas no solubles todos los loci que codifican para subunidades de gluteninas aportan variación, especialmente el *Glu-D1*, detectándose interacciones de alelos para gluteninas de alto peso molecular (HMW) con aquellos de bajo peso molecular (LMW). Tanto los alelos como los porcentajes de proteína fueron determinantes en los parámetros de calidad estudiados.

2 / 13

HERENCIA DE LA RESISTENCIA DEL MAÍZ DULCE A LA PLAGA DE TALADRO

Velasco, P., Soengas, P., Cartea, M.E.
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado 28, 36080 Pontevedra

El maíz dulce (*Zea mays*, L.) es un producto hortícola cuyo consumo aumenta día a día. El cultivo del maíz dulce en Galicia se ve afectado intensamente por la plaga de taladro, constituida por los lepidópteros *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*. Las larvas de estas especies atacan la caña y la mazorca, produciendo importantes pérdidas de rendimiento. Al ser un producto de consumo humano, el nivel de calidad exigido es mucho mayor que en el caso del maíz grano, desechándose las mazorcas aunque presenten pocos daños.

El conocimiento de la herencia de la resistencia a esta plaga ayudará en el diseño de un programa de mejora. Para ello se realizó un dialelo de 7 líneas puras de maíz dulce que diferían en su resistencia al ataque del taladro. Este dialelo se sembró en tres ambientes y se infestó con huevos de *Sesamia nonagrioides* y de *Ostrinia nubilalis*. La interacción genotipo × ambiente no fue significativa en la mayoría de los caracteres. Las diferencias significativas que se detectaron cuando se infestó con *Sesamia* fueron debidas a la aptitud combinatoria general de las líneas. Hubo más diferencias cuando se infestó con *Ostrinia*. La aptitud combinatoria general fue significativa para todos los caracteres, mientras que pocos caracteres mostraron aptitud combinatoria específica significativa. Las líneas EP61, EP59 y V7726 mostraron las mejores aptitudes combinatorias generales para los caracteres de daño, por lo que podrían ser utilizadas en un programa de mejora para resistencia a *Ostrinia nubilalis.*

2 / 14

HERENCIA DE LA ANTIBIOSIS A *SESAMIA NONAGRIOIDES* EN MAÍZ

Cartea, M.E., Butrón, A., Malvar, R.A..
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado 28, 36080 Pontevedra

Sesamia nonagrioides es la principal plaga del maíz (*Zea mays* L.) en el Noroeste de España. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la herencia de la antibiosis en la caña de maíz frente a *Sesamia*. Se realizaron dos cruzamientos a partir de tres líneas puras: CM109 × EP31 (resistente × resistente intermedia) y CM109 × EP42 (resistente × susceptible). Para cada uno de los cruzamientos, se evaluaron durante dos años seis generaciones: P_1, P_2, F_1, F_2, y los retrocruzamientos (BC_1 y BC_2). Mediante un análisis de medias generacionales se estimaron los efectos aditivos, dominantes, epistáticos, ambientales y la interacción genotipo × medio. Los coeficientes de correlación entre los caracteres de daño en la caña mostraron que la longitud de galerías es un buen indicador de la resistencia en la caña. La resistencia fue dominante a la susceptibilidad y la línea CM109 podría utilizarse como donante de resistencia en la caña. La herencia de la resistencia a Sesamia es un carácter cuantitativo, y los caracteres de resistencia en la caña se ajustan a un modelo aditivo-dominante y no presentan, en general, epistasia. Para el cruzamiento CM109 × EP31, los efectos genéticos aditivos y dominantes fueron significativos y, en general, tuvieron similar importancia, mientras que para el cruzamiento CM109 × EP42, el control genético es fundamentalmente aditivo. Un método de selección recurrente intrapoblacional sería el adecuado para obtener genotipos resistentes, combinando efectos aditivos y dominantes o considerando solamente los efectos aditivos, dependiendo del cruzamiento evaluado.

2 / 15

ANTIBIOSIS EN MAÍZ FRENTE A *SESAMIA NONAGRIOIDES*

Malvar, R.A., Ordás, B., Velasco, P.
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado 28, 36080 Pontevedra

Sesamia nonagrioides constituye la principal plaga del maíz en la zona mediterránea. Produce daños tanto en hojas juveniles, como en el tallo y en la mazorca. Con el fin de estudiar el mecanismo de resistencia del maíz a la plaga se eligieron 13 líneas puras, con diferentes grados de resistencia a la plaga. Se trataba de comprobar si la resistencia se debía a una sustancia química localizada en la médula de la planta. Para ello se alimentaron larvas de *Sesamia* con médula de las diferentes líneas puras de maíz. Cada cuatro días se pesaron, hasta alcanzar el estado de pupa, para ver como afectaba la alimentación al crecimiento de las larvas. Paralelamente para relacionar los datos obtenidos en el laboratorio con datos de campo se sembraron las líneas puras elegidas y se infestaron artificialmente con huevos de *Sesamia*.

Se observó que el tipo de crecimiento de las larvas durante el primer mes varió de unas líneas a otras, en unos casos el crecimiento fue lineal y en otros cuadrático.

En cuanto al peso de las pupas las larvas alimentadas con las líneas A509, CM151 y CO125 pesaron menos, además estas líneas en el campo tuvieron menos daño y para A509 y CM151 hubo menos larvas por planta.

Como conclusión puede haber en la médula de las líneas CM151, A509 y CO125 una sustancia antibiótica que afecta al desarrollo de las larvas.

2 / 16

EFECTO DEL ENDOSPERMO DE MAÍZ EN LA VIABILIDAD DE *SUGARY*

Ordás, A., Abuin, M.C. y Revilla, P.
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado 28, 36080 Pontevedra.

En las conversiones de germoplasma de maíz grano (*Su*) en maíz dulce (*su*), la supervivencia del mutante *sugary1* (*su*) depende del entorno genético del receptor *Su*. Se ha detectado selección direccional contra *su* y un efecto significativo de la baja germinación de los homocigotos *su* en la frecuencia de *su*. Los objetivos de este trabajo fueron determinar el efecto del entorno genético donante (*su*) y receptor (*Su*) en la viabilidad del mutante *su* y la importancia de la germinación en su viabilidad. Tres poblaciones homocigóticas *su* [Country Gentleman (CG), Stowell's Evergreen (SE) y Golden Bantam (GB)] y tres sintéticos homocigóticos *Su* [EPS6(S)C3, (EPS6); EPS7(S)C3, (EPS7); y EPS10] fueron cruzados y sus cruzamientos recombinados tres veces. La frecuencia de *su* disminuyó linealmente con las recombinaciones para todos los cruzamientos, pero la regresión no fue significativa en los cruzamientos EPS7 × SE, EPS7 × CG, y EPS10 × CG. Los coeficientes de regresión lineal fueron negativos y homogéneos. Los coeficientes de determinación estuvieron por encima de 0,9 excepto para EPS7 × SE y EPS7 × CG. La viabilidad de *su* fue máxima en EPS10 × SE, mientras que la menor ocurrió en EPS7 × SE y EPS10 × CG. En la mayoría de los cruzamientos se explica la disminución en la frecuencia del alelo *su* por la reducida germinación de los homocigotos *su*. No obstante, en algunos cruzamientos como EPS10 × SE, EPS7 × SE, EPS6 × SE y EPS10 × CG, otros factores, además de la germinación, deben estar implicados en la viabilidad de *su*.

2 / 17

PATRONES HETERÓTICOS EN EL GERMOPLASMA DE MAÍZ LISO

Soengas, P., Revilla P. y Ordás A.
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado 28, 36080 Pontevedra

El patrón heterótico de maíz más usado en las zonas templadas del planeta es 'Reid × Lancaster'. En Europa también ha sido ampliamente usado el patrón 'dentado americano × liso europeo'. Sin embargo, no se conocen las relaciones heteróticas entre el material liso. El objetivo de este trabajo es estudiar las relaciones heteróticas entre variedades de maíz liso incluyendo siete poblaciones españolas, una norteamericana y dos variedades argentinas. Para ello se cruzaron las diez variedades en un dialelo completo sin recíprocos. Los cruzamientos, las variedades parentales y nueve testigos, se ensayaron en dos localidades, en un diseño en látice 8 x 8. Se llevó a cabo un análisis de varianza conjunto con las medias ajustadas por tratamiento del carácter rendimiento. Las diferencias entre ambientes y genotipos fueron significativas. Varios cruzamientos con Relámpago tuvieron un rendimiento similar a los híbridos testigos. La fuente de variación debida a los genotipos se dividió de acuerdo con el modelo de Gardner y Eberhart (1966). Fueron significativos los efectos debidos a las variedades y a la heterosis. Los mejores efectos varietales los presentaron las variedades Tremesino y Relámpago. La heterosis a su vez se subdividió en heterosis varietal, específica y media. Las dos primeras no presentaron diferencias significativas. A la vista de estos resultados no se observa la presencia de patrones heteróticos en el material liso; sin embargo, estos resultados no son definitivos debido a que las condiciones ambientales en las que se desarrollaron ambos ensayos no fueron favorables para un desarrollo óptimo de las plantas.

2 / 18

GESTIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESQUEMAS DE SELECCIÓN UTILIZANDO PROGRAMACIÓN MATEMÁTICA

Fernández, J.[†], Basurco, F.[‡], Soria, F. [‡]
[†]Departamento de Mejora Genética. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
[‡]Centro de Investigaciones Forestales. Empresa Nacional de Celulosas

Cualquier programa de selección implica aumento de la consanguinidad y de la deriva genética, sobre todo con censos pequeños, intensidades de selección grandes o si la heredabilidad del carácter es baja y usamos estimas del valor genético con información de parientes. Esto es perjudicial por la depresión consanguínea sobre el carácter a mejorar, los efectos pleiotrópicos deletéreos sobre eficacia y la reducción en variabilidad genética que compromete la respuesta a largo plazo y la selección sobre caracteres u objetivos de mejora diferentes a los actuales.

En el presente trabajo se ha desarrollado un sistema de control simultáneo de la ganancia esperada y el nivel de consanguinidad en una población bajo selección artificial a través de programación matemática. El objetivo es minimizar el parentesco medio global de los individuos seleccionados (considerado la medida más adecuada de la variabilidad genética potencial de la población) para un diferencial de selección determinado.

Como ejemplo se presentan los resultados de aplicar el sistema sobre 30.506 árboles de *Eucaliptus globulus* australianos incluidos en un ensayo de la Empresa Nacional de Celulosas. Esta especie forestal se mantiene en régimen de polinización abierta y por tanto no se dispone del pedigree completo para calcular los parentescos sino que únicamente se dispone de 260 familias maternas distribuidas en diferentes localizaciones geográficas. Se presentan distintas estrategias variando el número de individuos por familia o procedencia seleccionados y para cada una de ellas se calcula la ganancia genética esperada y la variabilidad genética mantenida. Se concluye que pueden encontrarse estrategias que sacrificando un pequeño porcentaje (5 %) de la respuesta mantienen hasta un 60% mas de variabilidad genética que la que produce la máxima respuesta genética.

2 / 19

MAPA DE LIGAMIENTO DE QTLs (QUANTITATIVE TRAIT LOCI) PARA RESISTENCIA A JOPO (*OROBANCHE CRENATA*) Y TAMAÑO DE GRANO EN *VICIA FABA*.

Román, B.[1] , Torres, A.M. [1], Rubiales, D. [2] , Macas, J. [3], Pozarkova, D. [3] y Cubero, J.I.[4].

[1] Departamento de Mejora y Agronomia CIFA "Alameda del Obispo" Apdo 4240 (14080) Córdoba, Spain

[2] CSIC-IAS, Apdo. 4084, (14080) Córdoba, Spain.

[3] Instutute of Plant Molecular Biology. Braniskova 31. Ceske Budejovice. CZ-37005. Czech Republic.

[4] Universidad de Córdoba. Departamento de Genética. ETSIAM. Apdo. 3048. 14080 Córdoba (Spain)

Los mapas de ligamiento han sido muy útiles para la identificación de marcadores ligados a genes de importancia agronómica, permitiendo igualmente la localización de dianas que puedan ser usadas como diagnóstico en Mejora Genética Vegetal. Así mismo, estos mapas facilitan el estudio de caracteres de herencia cuantitativa QTLs. El objetivo de este trabajo ha sido la detección de genes implicados en el carácter de resistencia a jopo (*Orobanche crenata*), planta parásita que causa graves daños en el cultivo, así como del tamaño de grano, carácter de gran importancia agronómica. Con este fin se ha desarrollado un mapa molecular de una población F2 segregante (Vf6xVf136) procedente del cruzamiento entre parentales con valores extremos para ambos caracteres.

Los análisis moleculares han consistido en el estudio de 196 individuos F2 con 3 isoenzimas, 115 RAPD, 2 SCARS y 1 SSR. Los estudios de resistencia en campo se llevaron a cabo con las familias F3 en terrenos infestados con semillas del parásito. El diseño experimental fue un alfa-látices de dos repeticiones y cuatro entradas de testigo susceptible por cada una de las familias.

En este mapa molecular se ha utilizado la línea Vf6, que ha sido previamente empleada en numerosos estudios destinados al desarrollo del mapa genético de la especie. El empleo de dicha línea en el trabajo que nos ocupa, permitirá realizar nuevas inferencias en dicho mapa mediante el uso de marcadores comunes.

2 / 20

UTILIZACIÓN DE *HORDEUM CHILENSE* EN LA MEJORA GENÉTICA DE LA CALIDAD DE LOS CEREALES

Alvarez Cabello, J.B., Martín Martín, L.M.
Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Hordeum chilense es una especie originaria de Chile y Argentina que ha mostrado alta cruzabilidad con especies de diversos géneros de triticineas. Su cruzamiento con trigo duro ha dado lugar al anfiploide denominado tritórdeo, que presenta características prometedoras como nueva especie cultivada.

Desde 1990 hemos efectuado estudios orientados a evaluar su capacidad para utilizarse en la mejora genética de la calidad de los cereales. Estos trabajos indican que *H. chilense* puede ser un recurso de la máxima importancia para la mejora genética de la calidad de los cereales, ya que:

1. Es un importante reservorio de variabilidad para proteínas de almacenamiento de la semilla, que han mostrado tener efecto sobre las propiedades del gluten obtenido a partir de la semilla de tritórdeo. Es esperable que estas proteínas tengan efectos en el fondo genético de otras triticíneas.
2. Esto puede suponer una ampliación en la gama de calidades del gluten y resultar positivo en una industria agroalimentaria tan dinámica como la presente, donde la innovación tecnológica demanda nuevas características en las materias primas de los productos tradicionales y que diseña continuamente nuevos productos. También podría ocurrir que esta ampliación de gama de calidades llegue a tener repercusión en la utilización no alimentaria de los cereales.
3. Lo dicho para las proteínas puede aplicarse también en lo que respecta a pigmentos. Podría ser muy interesante intentar la introgresión a trigo duro del gen localizado en *H. chilense*.

2 / 21

LAS D-PROLAMINAS EN TRITÓRDEO HEXAPLOIDE: GENÉTICA Y RELACIÓN CON LA CALIDAD HARINO-PANADERA

Caballero García, L., Alvarez Cabello, J.B., Martín Martín, L.M.
Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

El tritórdeo hexaploide es el anfiploide derivado del híbrido interespecífico entre *Hordeum chilense* y trigo duro. Este anfiploide presenta un patrón electroforético para proteínas de reserva resultante de la adición de las proteínas de reserva de ambos parentales. Los estudios hasta ahora realizados han mostrado una gran variabilidad para las prolaminas de *H. chilense*. Una de las zonas que han mostrado mayor variabilidad es la zona de D-prolaminas, situada entre las zonas de alto y bajo peso molecular en geles SDS-PAGE.

Un total de 89 líneas F_7 de una población de tritórdeo hexaploide han sido evaluadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Las relaciones de ligamiento, alelismo o independencia entre las bandas detectadas en el patrón de la zona de D-prolaminas han sido analizadas. Así mismo, las líneas han sido evaluadas para la fuerza del gluten mediante el test de sedimentación en SDS-láctico.

Los resultados han mostrado la existencia de ligamientos entre las bandas detectadas. También han sido detectadas relaciones de alelismo entre algunos grupos de bandas. En lo referente a la calidad, la presencia de determinas bandas ha mostrado una clara relación con una mayor fuerza del gluten.

2 / 22

INFLUENCIA RELATIVA DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO CODIFICADAS EN LOS LOCI *Glu-B1* Y *Glu-H^{ch}1* SOBRE LA CALIDAD HARINO-PANADERA DEL TRITÓRDEO HEXAPLOIDE

Barth Pinto, R.J., Alvarez Cabello, J.B. y Martín Martín, L.M.
Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Se trató de analizar la posible influencia sobre la calidad harino-panadera de las alternativas alélicas en los loci *Glu-B1* y *Glu-H^{ch}1*. Para ello, 19 líneas de la población HTC227, portadoras de distintas subunidades de gluteninas de alto peso molecular codificadas en dichos loci, fueron evaluadas para diferentes parámetros relacionados con dicha calidad, así como para rendimiento y sus componentes, en ensayos con repeticiones efectuados durante dos años.

Los resultados obtenidos han sugerido que:

1. Existe una amplia variación genética para los distintos parámetros de la calidad entre las diferentes líneas de HTC227.
2. Dicha variabilidad genética está influenciada por la variación, así mismo genética, para el rendimiento, posiblemente a través de la relación entre este carácter y el contenido proteico.
3. No obstante, los elevados valores obtenidos para la heredabilidad de los componentes de la calidad, frente a la moderada magnitud de las correlaciones anteriormente señaladas, hace pensar en la existencia de importantes diferencias en sistemas genéticos que específicamente actúan sobre los componentes de la calidad.
4. Estas diferencias genéticas para la calidad no han podido asociarse a los dos loci estudiados. Consideramos que esta falta de asociación podría ser consecuencia del elevado «ruido» introducido por las diferencias genéticas anteriormente mencionadas.

2 / 23

VARIABILIDAD GENETICA Y RESPUESTA REALIZADA DE VARIABLES DE COMPORTAMIENTO EN GANADO BOVINO DE LIDIA

J. Cañón, J.P. Gutierrez, M. Vallejo
Unidad de Genética y Mejora. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid.

Se utilizaron 7.331 animales bovinos de lidia y 4.872 registros recogidos desde el año 1979 hasta el 1998 en una base de datos genealógicos muy completa. El procedimiento de estimación de parámetros genéticos fue el REML (Restricted Maximum Likelihood) ajustando un modelo animal multicarácter que incluía como caracteres las calificaciones (de 1 a 10) de ***bravura***, ***toreabilidad*** y ***fiereza***, así como las variables de comportamiento ***meter la cara***, ***movilidad*** y ***emplearse***. El modelo lineal mixto contemplaba como efectos fijos, el año de nacimiento, el sexo y el tipo de lidia, reducido este último a dos categorías, y como único efecto aleatorio además del residuo, el efecto genético aditivo. Las heredabilidades obtenidas se encontraron en general en valores medios (0,15 a 0,46), aunque podrían considerarse elevadas si se tiene en cuenta el carácter subjetivo de las variables utilizadas. Todas las correlaciones genéticas resultaron positivas o nulas (hasta 0,79). Para el cálculo de la tendencia genética se tuvieron en cuenta los valores medios de los méritos genéticos, obtenidos después de resolver el modelo lineal mixto mediante la metodología BLUP, dentro del año de nacimiento, resultando respuestas genéticas positivas para todos ellos excepto para la fiereza cuya tendencia es nula.

2 / 24

MANOSA FOSFATO ISOMERASA COMO MARCADOR DE LA RESISTENCIA A *BACILLUS THURINGIENSIS* EN *P. XYLOSTELLA*.

Herrero Sendra, S., Escriche Soler, B., Ferré Manzanero, J.
Departament de Genètica, Universitat de València, Dr Moliner, 50,
46100 Burjassot, Valencia, España. sherrero@uv.es

El actual incremento en el uso de insecticidas basados en las toxinas de *Bacillus thuringiensis* está provocando la aparición de resistencias en algunos insectos plaga contra los cuales se ha utilizado. La caracterización a todos los niveles de cepas de insectos resistentes se presenta como un paso necesario para mantener la eficacia de los productos derivados de estas toxinas.

En este trabajo se ha estudiado el ligamiento entre los locus implicados en la actividad manosa-fosfato-isomerasa (MPI) – la cual se conoce ligado en un 80% a la resistencia a la toxina Cry1Ac en una cepa de Heliothis virescens – y la resistencia a las toxinas de la familia Cry1A en una cepa resistente de *Plutella xylostella*, plaga cosmopolita de las crucíferas.

Mediante electroforesis nativa en poliacrilamida se detectaron 5 isoenzimas distintos con actividad MPI, nombrados de A a E en función de su migración en el gel. Se analizaron individuos de una población sensible, de una población ligeramente resistente e individuos seleccionados de dicha población con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac.

El análisis de la frecuencia de cada banda entre los individuos de los distintos grupos no dio diferencias significativas entre los individuos sensibles y los resistentes. Tampoco aparecieron diferencias entre los seleccionados para Cry1Ab y los seleccionados para Cry1Ac. En cambio, la comparación entre los no seleccionados (resistentes y sensibles) y los seleccionados dio un aumento estadísticamente significativo para las bandas A, D y E. En especial, la banda E no aparecía en las muestras de individuos no seleccionados.

2 / 25

POTENCIAL GENETICO DE POBLACIONES DE MAIZ LISO EUROPEO Y DENTADO PRECOZ AMERICANO.

Brichette Mieg, I., Martínez Yañez, I., Moreno-González, J., Castro P.
Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Apdo. 10. 15080 A Coruña

El uso de híbridos comerciales de maíz liso x dentado seleccionado para precocidad (Zea mays L.) está muy extendido en las zonas templadas de Europa. La base genética de este material es muy reducida debido a que procede de pocos parentales, por ello es importante el desarrollo de nuevos híbridos comerciales adaptados a estas condiciones climáticas. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial del germoplasma liso y dentado como poblaciones base para el desarrollo de híbridos de maíz temprano con calidad y producción forrajera y determinar el comportamiento y la heterosis de este germoplasma.

El material base estaba formado por ocho poblaciones: cuatro eran europeas, lisas y tempranas, y cuatro de origen americano y seleccionadas para precocidad. Se evaluó el comportamiento desde el punto de vista de la calidad forrajera de las ocho poblaciones, sus cruzamientos dialélicos y topcrosses con las líneas puras A632 y EC18. Las poblaciones lisas presentaron una digestibilidad de materia orgánica pobre frente a las dentadas, pero ésta aumentó considerablemente en los cruzamientos dialélicos. La heterosis en los cruzamientos liso x liso en este carácter fue positiva, aunque no significativa. Se encontró un efecto significativo de la heterosis en los cruzamientos liso x dentado, para la producción total de materia seca. Así mismo, se encontraron efectos de dominancia para la producción de materia seca de la mazorca, pero no para la de la parte verde, por lo que las estrategias de selección serían diferentes para estos dos caracteres.

2 / 26

ANALISIS GENETICO Y MOLECULAR DE MUTANTES HALOTOLERANTES EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L.
División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante

Estamos siguiendo una aproximación genética al problema agronómico que representa el estrés abiótico causado por la salinización de las tierras de regadío, eligiendo como objeto experimental al sistema modelo *Arabidopsis thaliana*, por su utilidad para el análisis genético y molecular. Hemos realizado una búsqueda de mutantes con germinación halotolerante, empleando varios fondos genéticos y diferentes procedimientos de mutagénesis, como el tratamiento con metanosulfonato de etilo, el bombardeo con neutrones rápidos y las inserciones del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*.

A partir del escrutinio de 675.500 semillas derivadas de mutagénesis, hemos aislado y sometido a análisis genético 17 líneas mutantes, presentando todas ellas, salvo una, tasas de germinación superiores al 25% en NaCl 250 mM, concentración que inhibe completamente la germinación de las estirpes silvestres. El modo de herencia de su fenotipo mutante es monogénico y recesivo, aunque parece influido por el fondo genético de cada estirpe. Su análisis de complementación indicó que correspondían a 10 mutaciones genuinamente distintas, probablemente hipomorfas o nulas, que fueron asignadas a 5 genes, que hemos denominado *SALOBREÑO* (*SAÑ*).

Los mutantes afectados en los genes *SAÑ1* a *SAÑ4* son tolerantes al estrés iónico causado por los iones Na^+ y Cl^-, y al osmótico debido al manitol. El mutante *sañ5* es además resistente al K^+ e insensible al ácido abscísico. Nuestros resultados genéticos y moleculares demuestran que *sañ5* es un alelo nulo del gen *ABI4*, presentando una deleción de un par de bases que genera un cambio de pauta de lectura que destruye buena parte de la proteína ABI4, incluido el dominio APETALA2 de unión a ADN.

workshop
mutagénesis ambiental

PAPEL DE LAS ADN-ALQUILTRANSFERASAS EN LA MUTAGÉNESIS POR HALOALCANOS

Carmen Pueyo de la Cuesta
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

Agentes alquilantes que dañan el ADN tienen un uso extensivo en la terapia contra el cáncer, pero también poseen capacidad mutagénica y carcinogénica. Estos compuestos inducen distintos tipos de lesiones, destacando el potencial mutagénico y carcinogénico de la O^6-alquilguanina. La principal protección frente a la O^6-alquilguanina es la actividad ADN-alquiltranferasa (ATasa) que repara la lesión por transferencia del grupo alquilo del aducto a un residuo de cisteína de la propia proteína, en una reacción estequiométrica y suicida. El nivel de resistencia de las células tumorales a los tratamientos con agentes alquilantes se relaciona normalmente con los niveles intracelulares de la proteína reparadora, por lo que dicha resistencia se combate con un inhibidor de la ATasa, la O^6-benzilguanina (BG). No obstante, estos tratamientos quimioterapeúticos están limitados por la extraordinaria sensibilidad de la médula ósea, que posee bajos niveles de ATasa. Por terapia génica se intenta incrementar los niveles de ATasa de la médula ósea mediante la expresión de genes procarióticos o eucarióticos.

Las ATasas procarióticas mejor estudiadas son las de *Escherichia coli*. Esta bacteria tiene una ATasa (Ogt) de expresión constitutiva y otra (Ada) que se induce tras la exposición a agentes metilantes potentes como la *N*-nitroso-*N*-metil-*N´*-nitroguanidina (MNNG). Recientemente se han identificado proteínas homólogas en *Salmonella typhimurium* (Ogt_{ST} y Ada_{ST}). Las células de mamífero tienen una sola ATasa. Todas las ATasas, sean de origen procariótico o eucariótico, comparten la secuencia (P<u>C</u>HRV/I) del sitio activo (<u>C</u>, residuo aceptor del grupo alquilo).

En *E. coli*, Ogt protege frente a la acción mutagénica de agentes metilantes, etilantes o cloroetilantes. En contraposición, Ada protege sólo de los efectos mutagénicos de aquellos agentes metilantes que inducen su síntesis. En *S. typhimurium*, la única ATasa que protege de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes es Ogt_{ST}; Ada_{ST} no ofrece ninguna protección porque su expresión no se induce por MNNG.

Los haloalkanos forman una clase importante de carcinógenos industriales con un mecanismo de acción poco conocido. Miembros representativos de este grupo son los dibromoalcanos (DBAs), 1,2-dibromoetano (DBE) y dibromometano (DBM). La formación de aductos de ADN por estos compuestos depende de la conjugación con glutatión. La importancia *in vivo* de esta vía de activación metabólica poco usual se pone de manifiesto al comparar en *E. coli* la respuesta mutagénica de bacterias deficientes en GSH con el correspondiente parental silvestre. En nuestro laboratorio se ha descrito también un papel inusual para la ATasa en relación a los efectos genotóxicos inducidos por los dibromoalcanos. Esta proteína reparadora no protege sino que promueve los efectos letales y mutagénicos de dichos compuestos.

Bacterias mutantes (*ada*$^-$ *ogt*$^-$) de *E. coli* totalmente deficientes en ATasa se han transformado con plásmidos multicopia portadores de los genes o ADNc que codifican distintas ATasas con el objeto de comparar la capacidad protectora de estas proteínas frente a los agentes alquilantes y, contrariamente, la capacidad de sensibilización a los DBAs. La ATasa Ogt de *E. coli* es menos eficiente que la humana (46 veces) y la de ratón (117 veces) promoviendo los efectos mutagénicos de los DBAs. A este respecto la ATasa de rata es aún menos eficaz (2 veces) que la ATasa Ogt de *E. coli*, pero su capacidad de protección frente a los efectos mutagénicos de la droga anticáncer CCNU (lomustina) es también claramente inferior (7 veces) a la de la proteína bacteriana. La ATasa Ogt_{ST} de *S. typhimurium* se asemeja a la ATasa Ogt de *E. coli* en la total protección frente a los efectos mutagénicos de agentes metilantes, etilantes y cloroetilantes (como la droga anticáncer BCNU, carmustina), y su extraordinaria resistencia a la inhibición por BG. Ogt_{ST} tiene la ventaja adicional de que es menos efectiva (10 veces) que la de *E. coli* promoviendo la acción mutagénica de los DBAs.

Asimismo se han llevado a cabo comparaciones entre la ATasa humana silvestre y dos variantes mutantes de dicha proteína. El mutante simple V139F se aisló por su incrementado efecto protector frente a la acción letal y mutagénica de la MNNG, y el mutante triple V139F/P140R/L142M por su resistencia a BG. El mutante triple es algo peor (2,5 veces) que el silvestre protegiendo de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes, pero frente a éste tiene la enorme ventaja de su resistencia al inhibidor BG. La incrementada protección del mutante simple a los efectos genotóxicos de la MNNG no es extrapolable a otros agentes alquilantes (incluyendo la CCNU), siendo su sensibilidad a la BG equivalente a la de la proteína silvestre. El mutante simple muestra una capacidad equivalente a la del silvestre promoviendo los efectos mutagénicos de los DBAs. Dicha capacidad se anula en presencia de BG. El mutante triple (resistente a BG) es mucho menos (32 veces) eficiente que el silvestre en la sensibilización de las bacteria a la acción genotóxica de los DBAs.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la activación de los DBAs promovida por las ATasas implica una reacción directa de estos compuestos con el residuo cisteína del sitio activo. Este proceso parece específico de las ATasas, dado que otras proteínas, como tiorredoxina y glutarredoxina, con residuos de cisteína funcionales en su sitio activo no tienen capacidad de activación. La eficiencia en la activación de DBAs parece depender de la presencia de prolina en la posición 140 (próxima al sitio activo) de la ATasa humana; su sustitución por arginina en el triple mutante (V139F/P140R/L142M) provocaría un cambio conformacional del sitio activo que dificultaría la entrada de BG (confiriéndole resistencia) y de los DBAs (disminuyendo su capacidad de activación). De acuerdo con esta hipótesis, la resistencia a BG y la escasa capacidad de activación de DBAs de las ATasas Ogt de *E. coli* y *S. typhimrium* se fundamentaría en que dichas proteínas tienen un resíduo de serina (en vez de prolina) en la posición equivalente a la 140 de la ATasa humana.

(financiación: P95-0557-CO2-01 y CVI 0187)

REFERENCIAS

Abril et al (1995) **Mol. Carcinogen., 12**: 110-117
Abril et al (1996) **Carcinogenesis, 17**: 1609-1614
Abril et al (1997) **Carcinogenesis, 18**: 1883-1888
Christians et al (1997) **Cancer Res., 57**: 2007-2012
Encell et al (1998) **Cancer Res., 58**: 1013-1020
Yamada et al (1997) **Mutat. Res., 381**: 15-24.

TOPOISOMERASAS DE DNA: MECANISMO DE ACCIÓN Y SU POSIBLE PAPEL EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO

Felipe Cortés, Nuria Pastor y Joaquín Piñero
Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla.
Avda Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.
Tel.: 95-4557039. Fax: 95-4610261. E-mail: cortes@cica.es

Las topoisomerasas (topos) de DNA son enzimas nucleares que modifican el estado topológico de dicha molécula a través de procesos perfectamente coordinados de rotura de cadenas y su posterior reunión. Las topos se han clasificado en dos grandes categorias: las topos de tipo I (topo I), que llevan a cabo la rotura de sólo una cadena de DNA y permiten el paso de la otra cadena intacta a través de la mella para luego sellarla, y las topos de tipo II (topo II), que rompen ambas cadenas de la molécula de DNA y, antes de volver a unir, facilitan el que una doble cadena intacta pase a través de la "puerta proteica" establecida. A diferencia de la topo I, la topo II requiere gasto de ATP para llevar a cabo su función (Wang, 1985).

La actuación de las topoisomerasas de DNA se requiere durante procesos celulares vitales tan importantes como la replicación, transcripción (principalmente la topo I) y recombinación homóloga (Wang, 1991). Por otra parte la topo II parece jugar un papel fundamental en la condensación cromosómica así como en la segregación de las cromátidas hijas (Di Nardo y col., 1984; Uemura y col., 1987).

Dado el mecanismo molecular de actuación de las topoisomerasas antes mencionado, algunos autores han propuesto la atractiva hipótesis de un posible papel de estas enzimas nucleares en la reparación del DNA dañado por diversos agentes fisicos o químicos de probada genotoxicidad. En este sentido, no obstante, los estudios realizados hasta la fecha han dado como resultado una gran diversidad de opiniones y no pocas controversias (Downes y Johnson, 1988; Friedberg y col., 1995).

Por un lado, están aquellos autores que han llegado a proponer un papel directo de las topoisomerasas en la reparación (Wilkins, 1983; Synder, 1987), mientras que otros, basándose en estudios llevados a cabo con inhibidores de estas enzimas así como en otras observaciones, han descartado tal posible papel de las topoisomerasas en la reparación del daño causado en el DNA por las radiaciones o por compuestos químicos (Sternglanz y col., 1981; Oberbye y col., 1983; Webster y Bhattacharya, 1995).

Los mutantes han sido tradicionalmente fundamentales para el estudio de los mecanismos de reparación del DNA, y en los ultimos veintitantos años se ha experimentado un gran avance en el desarrollo y aislamiento de líneas celulares mutantes de mamíferos (fundamentalmente roedores) con anormalidades en la reparación del DNA. Si nos centramos en los mutantes sensibles a la radiación ionizante, existe una variedad de los mismos, procedentes de diferentes laboratorios, que muestran diversos grados de capacidad de reparación y, por tanto, de hipersensibilidad a los rayos X ó gamma (Zdzienicka, 1995). Una característica

común, aunque no general, de los mutantes radiosensibles es un defecto en su eficacia de reparación de las roturas de cadena en el DNA (Collins, 1993).

Por nuestra parte, nos propusimos estudiar las actividades topoisomerasas, asi como en algunos casos la cantidad relativa de dichas enzimas nucleares, en líneas radiosensibles de roedores, concretamente de hámster (EM9, *xrs5, irs2*) así como en sus correspondientes líneas parentales que son normales en cuanto a su sensibilidad a la radiación ionizante (AA8, CHO-K1, V79). Las actividades y niveles de expresión de las topoisomerasas se analizaron tanto en condiciones control (células no irradiadas) como en células que habían sido sometidas a un tratamiento con rayos X.

Nuestras líneas radiosensibles las podemos separar en dos grupos, en base a su capacidad de reparación de las roturas de cadena del DNA. Por una parte están las líneas EM9 (Thompson y col., 1982) y *xrs5* (Jeggo y Kemp, 1983), cuya cinética de reparación es inferior a la de la línea parental correspondiente, en este caso AA8 y CHO-K1, respectivamente, y por otra parte está la línea celular *irs2* (Jones y col., 1987), la cual presenta una cinética de reparación similar a la de su línea parental V79. Mientras que EM9 y *xrs5* padecen algún defecto en la correcta reunión de las roturas de cadena del DNA, la línea *irs2* presenta una síntesis de DNA radioresistente, es decir, es defectiva en responder al daño en el DNA que normalmente inhibe la iniciación del replicón, dándose con ello lugar a la replicación de lesiones en el DNA no reparadas (Jones y col., 1990).

Una posible explicación para la disparidad en los resultados a los que nos hemos referido antes, relativos al posible papel de las topoisomerasas en la reparación del DNA, es que dichos resultados se han obtenido empleando cultivos celulares asincrónicos, sin tener en cuenta los cambios en actividad y en cantidad que sufren estas enzimas (principalmente la topo II) dependiendo de la fase del ciclo celular y del estado proliferativo del cultivo (Duguet y col., 1983).

Nosotros, con el objetivo de tratar de clarificar esta cuestión de una posible implicación de las topoisomerasas en reparación del material genético, hemos obviado el inconveniente de la asincronía analizando la influencia de la radiación cuando se tratan poblaciones celulares sincronizadas, centrándonos fundamentalmente en el periodo G1, dada su importancia por la existencia en el mismo de "*checkpoints"* de cuyo funcionamiento dependen tanto la reparación como la decisión de desarrollar un programa de muerte celular (*apoptosis*).

Para poder sincronizar todas las líneas celulares (fibroblastos) se diseñaron dos protocolos distintos, dependiendo de la adherencia al sustrato de las células, de tal manera que unas líneas se sincronizaron mediante la selección de células en mitosis ("*shaking off*"), mientras que en el caso de otras que mostraban una mayor adherencia al sustrato se permitió que alcanzasen en cultivo el estado de confluencia, con lo que obtuvimos poblaciones detenidas en G1. En todos los casos, el progreso de las poblaciones sincrónicas a lo largo del ciclo de división celular se estudió mediante

citometría de flujo, empleando como fluorocromo para teñir el DNA el ioduro de propidio.

Para el análisis de las actividades topo I y topo II, se obtuvieron extractos nucleares de células no irradiadas, así como de aquellas sometidas a una irradiación con 5 Gy de rayos X, cuantificándose en los mismos las proteínas totales con objeto de incubar dichos extractos con los sustratos de DNA correspondientes. La topoisomerización de dichos sustratos se estudió en cada caso (topo I y topo II) mediante electroforesis de DNA en geles de agarosa.

En el caso de la topo I, el ensayo de la actividad está basado en la capacidad de dicha enzima de relajar DNA plasmídico superenrollado en ausencia de ATP, mientras que para detectar la actividad topo II nos basamos en la actividad específica de la misma para desencadenar DNA de doble cadena de cinetoplasto (DNA mitocondrial de tripanosoma), que se encuentra en forma de círculos cerrados encadenados, formando una red. Para esta última reacción (topo II) son necesarios ATP y Mg^{++}.

En general, podemos decir que como resultado del tratamiento con radiación ionizante se produce una modulación de las actividades topoisomerasas en las líneas celulares que hemos estudiado. Comparando en los geles de agarosa la actividad topo I y topo II de la línea parental con su correspondiente línea mutante, en condiciones de no irradiación, y a los 15 min.y una hora despues de irradiar, las diferencias más significativas las hemos encontrado al comparar las líneas AA8 (parental) y EM9 (mutante radiosensible), y esto tanto para la topo I como para la topo II. La citada diferencia consiste en que la línea parental AA8 muestra un claro incremento en las actividades topoisomerasas después del tratamiento con rayos X, incremento no observado por el contrario en las células radiosensibles de la línea mutante EM9. Estas diferencias en cuanto a las actividades relativas de las topoisomerasas se vieron corroboradas, de manera singular para la topo I, cuando estudiamos las cantidades relativas de dichas enzimas mediante técnicas inmunocitoquímicas, es decir, los niveles de expresión parecían incrementarse como resultado de la irradiación en la linea AA8 pero no en la radiosensible EM9.

En cuanto a las otras líneas celulares estudiadas, podemos decir que los incrementos en actividades topoisomerasas no fueron tan significativos como en la AA8, pero en general se observa una más clara respuesta en las líneas parentales, en el sentido de que responden con un incremento de las actividades topoisomerasas (topo I, topo II, ó ambas) despues del tratamiento con rayos X.

En nuestra opinión, estas observaciones parecen de interés en cuanto a que podrían apoyar la hipótesis de una posible participación de las topoisomerasas en la reparación del DNA dañado. En este sentido, podría tratarse de un papel en la descondensación de la cromatina, preparatorio para el mejor acceso de la maquinaria enzimática reparadora, o bien de un papel directo en la reparación, dada la capacidad de estas enzimas nucleares de cortar y unir cadenas de DNA.

A pesar de lo atractivo de estas hipótesis, aún está por demostrar esa presunta relación directa de las topoisomerasas con la reparación, de tal manera que no puede hoy por hoy descartarse que sean un grupo más de proteínas que responden al "estrés" celular provocado por la radiación ionizante. En nuestro laboratorio, estamos llevando a cabo experimentos en la actualidad para tratar de clarificar esta cuestión.

Referencias

-Collins A.R., Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics, **Mutat. Res. 293** (1993) 99-118.

-Di Nardo S., K. Voelkel, R. Sternglanz, DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae:* topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81** (1984) 2616-2620.

-Downes C.S., R.T. Johnson, DNA topoisomerases and DNA repair, **BioEssays 8** (1988) 179-184.

-Duguet M., C. Lavenot, F. Harper, G. Mirambeau, A.-M. De Recondo, DNA topoisomerases from rat liver: physiological variations, **Nucleic Acids Res. 11** (1983) 1059-1075.

-Friedberg E.C., G.C. Walker, W. Siede, **DNA repair and Mutagenesis**, ASM Press, Washington, D. C.(1995).

-Jeggo P.A., L.M. Kemp, X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents, **Mutat. Res. 112** (1983) 313-327.

-Jones N.J., R. Cox, J. Thacker, Isolation and cross-sensitivity of X-ray sensitive mutants of V79-4 hamster cell, **Mutat. Res. 183** (1987) 279-286.

-Jones N.J., S.A. Stewart, L.H. Thompson, Biochemical and genetic analysis of the Chinese hamster mutants *irs 1* and *irs 2* and their comparison to cultured ataxia telangiectasia cells, **Mutagenesis 5** (1990) 15-23.

-Overbye K.M., S.K. Bax, P. Margoli, Loss of DNA topoisomerase I activity alters many cellular functions in *Salmonella typhimurium*, **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47** (1983) 785-791.

-Sternglanz R., S. Di Nardo, K.A. Voelkel, Y. Nishimura, YL. Hirota, K. Becherer, L. Zamstein, J.C. Wang, Mutations in the gene coding for *E. coli* topoisomerase I affect transcription and transposition, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78** (1981) 2747-2751.

-Synder R.D., Is DNA topoisomerase involved in the UV excision repair process?. New evidence from studies with DNA intercalating and non-intercalating anti-tumor agents, **Photochem. Photobiol. 45** (1987) 105-112.

-Thompson L.H., K.W. Brookman, L.E. Dillehay, A.V. Carrano, J.A. Mazrimas, C.L. Mooney, J.L. Minkler, A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange, **Mutat. Res. 95** (1982) 427-440.

-Uemura T., H. Ohkura, Y. Adachi, K. Morino, K. Shiozaki, M. Yanagida, DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*, **Cell 50** (1987) 917-925.

-Wang J.C., DNA topoisomerases, **Annu. Rev. Biochem. 54** (1985) 665-697.

-Wang J.C., DNA topoisomerases: Why so many?, **J. Biol. Chem. 266** (1991) 6659-6662.

-Webster R.P., R.K. Bhattacharya, Activity of some nuclear enzymes associated with DNA repair following hepatocarcinogen administration to rats, **J. Biochem. Toxicol. 10** (1995) 33-40**.**

-Wilkins R.J., Failure of the intercalating agent m-AMSA to induce DNA repair replication in cultured mammalian cells, **Mutat. Res. 122** (1983) 211-216.

-Zdzienicka M.Z., Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage, **Mutat. Res. 336** (1995) 203-213.

MEJORAS METODOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO EN POBLACIONES HUMANAS EXPUESTAS A AGENTES GENOTÓXICOS

Ricardo Marcos
Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

La evaluación del riesgo genético de los distintos agentes ambientales a los que el hombre está expuesto se obtiene, normalmente, a partir de estudios *in vitro* en los que se analiza su posible interacción con el DNA y la consecuente producción de daño genético, tanto a nivel génico como cromosómico. Sin embargo, los resultados de estos estudios tienen un valor relativo al realizar las estimas del riesgo en las poblaciones expuestas debido, fundamentalmente, a los problemas inherentes a la extrapolación, problemas que son tanto mayores cuanto más alejado, desde un punto de vista evolutivo, esté el sistema utilizado del hombre. Los estudios de monitorización biológica humana tienden a obviar los problemas de extrapolación dado que es el hombre, expuesto a los agentes potencialmente genotóxicos, el principal sujeto de estos estudios. Además, este tipo de estudios tiene en cuenta la importancia que los distintos factores individuales endógenos puede llegar a tener en la modulación de la respuesta genotóxica.

Dada la gran variedad de efectos posibles que un determinado agente puede llegar a ejercer sobre el material genético de las personas expuestas, un buen diseño en los estudios de biomonitorización humana ha de contemplar la inclusión de distintos ensayos de manera que, en conjunto, puedan cubrir la detección de un amplio abanico de tipos de daño genético. Es por tanto, que el diseño de nuevas metodologías asociadas a la detección del daño genético es un campo en creciente expansión que busca sistemas cada vez más rápidos y sensibles. Así, a los clásicos ensayos de aberraciones cromosómicas (AC) y de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE), a finales de los ochenta se introdujo el ensayo de micronúcleos (MN) que pueden medir tanto actividad clastogénica como aneugénica. Esta diferenciación puede conseguirse cuando el ensayo MN se complementa con el uso de sondas que marcan la región centromérica de todos los cromosomas humanos. Esta aproximación está basada en la suposición de que los MN que contengan fragmentos cromosómicos acéntricos no se marcarán con la sonda, mientras que los MN portadores de cromosomas enteros se marcarán positivamente. Así, el ensayo de MN junto con la técnica FISH permite una identificación rápida y fiable tanto de la exposición a agentes clastogénicos como de los aneugénicos (pérdida cromosómica).

Hay que señalar que si la técnica FISH se lleva a cabo con sondas centroméricas específicas de cromosomas, nos permite también la detección de la no disyunción cromosómica. El hecho que la técnica FISH pueda aplicarse a células en interfase, permite la utilización de cualquier tipo de célula sin que la incapacidad de proliferar en cultivo sea un impedimento, lo que supone una mejora muy importante en los estudios de biomonitorización.

En los núcleos interfásicos, la técnica FISH también permite detectar otros diversos tipos de daño genético, entre los que cabe destacar la rotura en puntos cromosómicos especialmente sensibles a la acción de los agentes genotóxicos. Uno de estos puntos frágiles corresponde a la banda 1q12 de heterocromatina constitutiva, involucrada en distintas anomalías cromosómicas observadas en distintos tipos de células tumorales, y que ha mostrado ser muy sensible a distintos agentes mutagénicos físicos y químicos. La detección de roturas en esta zona se logra utilizando un doble marcaje (*tandem labelling*) en el que una sonda de esta región se marca con un fluorocromo determinado, mientras que la otra sonda, correspondiente a la secuencia alfa satélite del centrómero del cromosoma 1, que es contigua, se marca con otro fluorocromo diferente.

Estas metodologías FISH permiten que, con un protocolo similar, se puedan aplicar al marcado simultáneo del centrómero de cromosoma 17 y del gen p53. Esta metodología permite así, una fácil detección de las deleciones del brazo corto del cromosoma 17, de las translocaciones que involucran al gen p53 y otros genes supresores de tumores situados en dicho brazo cromosómico, y de otras anormalidades cromosómicas numéricas que afectan a dicho cromosoma.

Si en lugar de utilizar sondas de regiones específicas se utiliza un cóctel de sondas que cubren todo un cromosoma entero, tendremos marcado todo un cromosoma con un fluorocromo, específico, lo que permitirá diferenciarlo del resto de los cromosomas. Esta técnica se denomina *pintado cromosómico* y puede marcar simultáneamente varios cromosomas con idéntico o diferente fluorocromo. Esta técnica permite detectar fácilmente translocaciones cromosómicas, que son, imposibles de detectar en el ensayo clásico de AC.

Otro ensayo novedoso en la detección de daño genético en poblaciones humanas expuestas, es el que utiliza la electroforesis en gel de agarosa y en medio alcalino de células aisladas (SCGE), también denominado ensayo del COMETA. Esta técnica permite detectar diferentes tipos de daño genético, desde roturas en el DNA de cadena simple y de doble cadena a lesiones álcali-lábiles. Esta técnica usa tinción específica del DNA (DAPI o bromuro de etidio) y el daño se analiza, con un microscopio de fluorescencia, en función de la cantidad de DNA que migra del núcleo. Este método es muy sensible en la detección del daño genético inducido por diferentes agentes genotóxicos tales como la radiación, los pesticidas, y los metales pesados, además de mostrar ser muy útil en el estudio de la reparación del DNA bajo una amplia variedad de condiciones experimentales.

Estas, entre otras, son potentes y novedosas herramientas que nos permiten valorar los niveles de daño genético en poblaciones expuestas. Hay que recordar que la interpretación de estos niveles no debe expresarse tan solo en función de la exposición, sino que las características genéticas individuales pueden modular estos valores. Así pues, el conseguir sistemas rápidos de identificar las características genéticas relevantes de la población estudiada (como la capacidad de metabolizar

xenobióticos) constituye un reto con el que se enfrentan los estudios de biomonitorización humana.

ESPECTROS DE MUTACIÓN, MECANISMOS DE REPARACIÓN Y DROSOPHILA: INFORMACIÓN PRIVILEGIADA

L. María Sierra
Dpto. Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo. 33006 Oviedo.

Drosophila melanogaster ha sido durante bastante tiempo el organismo de referencia en estudios de Mutagénesis, como lo demuestra el hecho de que el test de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) ocupara, durante años, una posición central y decisoria en las baterías de ensayos de genotoxicidad recomendadas para ensayar nuevos agentes. Sin embargo, el auge de distintos ensayos bacterianos y el desarrollo de ensayos con cultivos celulares de mamíferos, ha hecho que Drosophila haya sido desplazada de ese lugar central que ocupaba.

A pesar de todo, Drosophila sigue siendo un organismo ideal dentro del campo de la Mutagénesis, porque además de ser un organismo eucariótico superior, posee un metabolismo xenobiótico muy similar al de mamíferos, unos procesos de gametogénesis equivalentes a los de mamíferos, y unos sistemas de reparación de lesiones en el DNA homólogos, no sólo en funcionalidad, sino también en secuencias génicas, a los de mamíferos (Würgler et al., 1984; Dusenbery y Smith, 1996). Si a todo esto se une la facilidad de su manejo, el conocimiento de su genoma, y la disponibilidad de una larga colección de loci mutantes, tanto marcadores como mutantes para varios sistemas de reparación, se comprueba la utilidad de este organismo.

Por todas estas razones, y puesto que los ensayos de mutación somática y recombinación, SMAR (Würgler y Vogel, 1986), como test generales de detección de genotoxicidad, son difícilmente mejorables, a lo largo de los años 80, se ha intentado diseñar ensayos que permitieran estudios más precisos sobre mecanismos de acción de mutágenos/carcinógenos. En este sentido, la mayor información sobre mecanismos de acción de un agente genotóxico la proporciona la obtención de un espectro molecular de mutación, que consiste en la caracterización molecular de mutaciones inducidas en un locus específico por ese agente. Un espectro molecular de mutación permite relacionar daños en el DNA con los tipos de mutaciones que esos daños provocan, cuando se analizan agentes que se sabe como reaccionan con el DNA.

De todos los loci de los que se ha estudiado su utilidad en el aislamiento de mutaciones inducidas, el único que realmente se ha utilizado ampliamente es *vermilion*, ya que se han diseñado unas líneas que permiten aislar mutaciones inducidas en este locus, al mismo tiempo que se lleva a cabo un test SLRL.

Con este sistema, se han obtenido los espectros moleculares de mutación inducidos, en condiciones normales de reparación y en células postmeióticas masculinas, por varios tipos de agentes genotóxicos: i) alquilantes monofuncionales, etilnitrosourea (ENU, Pastink et al., 1989), etilmetanosulfonato (EMS, Pastink et al., 1991), metilmetanosulfonato (MMS, Nivard et al., 1992), dietilsulfato (DES, Sierra et al., 1993), metilnitrosourea (MNU), metilnitronitrosoguanidina (MNNG) y

dimetilnitrosamina (DMN, Nivard et al., 1996); ii) dihaloalcanos, dibromoetano (DBE) y dicloroetano (DCE, Ballering et al., 1994); iii) productores de enlaces cruzados, cisplatina (cis-DDP, Cizeau et al., 1994), hexametilfosforamida (HMPA, Aguirrezabalaga et al., 1995a), hexametilmelamina (HMM, Aguirrezabalaga et al., 1995b) y biscloroetilnitrosourea (BCNU, Nivard et al., 1998); iv) formadores de aductos eténicos, vinil carbamato (Ballering et al., 1997).

La obtención de estos espectros puso de manifiesto la utilidad de este sistema en estudios mecanísticos, ya que dichos espectros no sólo reflejaban de manera directa el patrón de reacción de esos compuestos con el DNA, sino que además, en ellos se recuperaban todo tipo de mutaciones, incluídos todos los posibles cambios de base, mutaciones por cambio de pauta de lectura y deleciones intralocus y multilocus. Hasta entonces, los espectros inducidos por agentes alquilantes monofuncionales en genes de *Escherichia coli* estaban compuestos mayoritariamente por transiciones GC-AT (Horsfall et al., 1990), independientemente del agente estudiado. Por otro lado, algunos de estos trabajos fueron las primeras demostraciones de que, en células eucarióticas superiores, las consecuencias de los enlaces cruzados eran deleciones, lo que probablemente explica la potencia carcinogénica de los compuestos productores de este tipo de daños.

A pesar de toda la información relevante proporcionada por el sistema *vermilio*n, el hecho de que los datos de espectros de mutación inducidos en células germinales de mamíferos (ratones), para el único agente para el que se dispone de ellos, ENU (Marker et al., 1997), mostraran diferencias considerables con el obtenido en Drosophila (Pastink et al., 1989), hizo que de nuevo se pensara en que la utilidad de este organismo era relativa. Sin embargo, poco tiempo después, se publicó el espectro de mutación inducido por ENU en células premeióticas masculinas de *D. melanogaster* (Tosal et al., 1998). El parecido entre los espectros obtenidos en ratones y Drosophila, inducidos en ambos casos en espermatogonias, indica claramente que el factor determinante en el tipo de mutaciones recuperadas no es la especie, sino el tipo o estadío celular analizado, y restaura plenamente la utilidad de este sistema frente a otros mucho más costosos en tiempo y dinero.

Pero es que además de todo esto, Drosophila es probablemente el único organismo con el que *in vivo* se puede estudiar la influencia de distintos sistemas de reparación en la inducción de los espectros de mutación, gracias a la reparación materna. En concreto, se han analizado dos sistemas diferentes: a) el sistema de reparación por escisión de nucleótido, NER, utilizando una línea mutante *mus201*, deficiente en el paso de incisión (Boyd et al., 1987); b) un sistema del que forma parte el locus *mus308* implicado en reparación post-replicativa; Si bien mus308 se relacionó originalmente con la reparación de enlaces cruzados (Boyd et al., 1990), posteriormente se ha comprobado que más bien está relacionado con la reparación de daños persistentes (Aguirrezabalaga et al., 1995c).

El análisis de la influencia del sistema NER sobre el espectro de mutación en unos casos ha permitido comprobar que este sistema realmente repara daños en átomos de

nitrógeno, ya que con distintos agentes capaces de dañar esas posiciones, se observa un incremento en transversiones y deleciones, que son el tipo de mutaciones consecuencia de esos daños (Pastink et al., 1991; Nivard et al., 1993,1996; Ballering et al., 1994). En otros casos, ha permitido descubrir que se necesita la existencia de un sistema NER funcional para que se generen deleciones multilocus a partir de enlaces cruzados en el DNA (Aguirrezabalaga et al., 1995a). Muy recientemente, hemos podido demostrar que NER es capaz de reparar daños en el oxígeno 4 de la timina puesto que, en el espectro inducido en condiciones deficientes por DES (Sierra et al., 1999) y ENU (Tosal et al., 1999a), se observa un incremento de transiciones AT-GC respecto al obtenido en condiciones eficientes.

Por su parte, el análisis de la influencia del locus *mus308* en el espectro inducido por ENU (Tosal et al., 1999b), en el que aumenta también la frecuencia de transiciones GC-AT y AT-GC, y de transversiones AT-TA, nos permite hipotetizar que *mus308*, que parece codificar una proteína con funciones de DNA polimerasa y de helicasa (Harris et al., 1996), jugaría un papel importante en un proceso de bypass recombinacional de lesiones de difícil reparación, como son las alquilaciones de los oxígenos de las pirimidinas.

A la vista de toda la información suministrada en estos estudios, se concluye que la obtención de espectros moleculares de mutación en células germinales de *D. melanogaster* proporciona una información privilegiada, ya que no sólo es información obtenida *in vivo* en un eucariota superior, sino que permite el estudio de la influencia del tipo celular analizado y, fundamentalmente, de los distintos sistemas de reparación, siendo el único organismo eucariótico superior en el que, hasta el momento, esto es posible.

Referencias

Aguirrezabalaga, I. et al. (1995a). *Genetics* **139**: 649-658.
Aguirrezabalaga, I. et al. (1995b). *Carcinogenesis* **16**: 2679-2683.
Aguirrezabalaga, I. et al. (1995c). *Mutat. Res*. **336**: 243-250.
Ballering, L.A.P. et al. (1994). *Carcinogenesis* **5**: 869-875.
Ballering, L.A.P. et al. (1997). *Environ. Mol. Mutagen*. **30**: 321-329.
Beranek, D. T. (1990). *Mutation Res*. **231**, 11-30
Boyd, J.B. et al. (1987). *J.Cell Sci. Suppl*. **6**: 39-60.
Boyd J.B. et al. (1990). *Genetics* **125**: 813-819.
Cizeau, J. et al. (1994). *Mutat. Res*. **311**: 31-38.
Dusenbery, R.L. y P.D. Smith (1996). *Mutat. Res*. **364**: 133-145.
Harris, P.V. et al. (1996). *Mol. Cell. Biol*. **16**: 5764-5771.
Horsfall, M.J. et al. (1990). *Environ. Mol. Mutagen*. **15**: 107-122.
Marker, P.C. et al. (1997). *Genetics* **145**: 435-443.
Nivard, M. J. M. et al. (1992). *Genetics* **131**, 673-682.
Nivard, M. J. M. et al. (1993). *Carcinogenesis* **14**, 1585-1590.
Nivard, M. J. M. et al. (1996). *Mutat. Res*. **352**, 97-115.
Nivard, M.J.M. et al. (1998). *Acta Biochim. Pol*. **45**: 545-559.
Pastink, A. et al. (1989). *Genetics* **123**, 123-127.

Pastink, A. et al. (1991). *Mol. Gen. Genet*. **229**, 213-218.
Sierra, L. M. et al. (1993). *Mol. Gen. Genet*. **237**, 370-374.
Sierra, L. M. et al. (1999). Influence of nucleotide excision repair and of dose on the types of *vermilion* mutations induced by diethyl sulfate (DES) in postmeiotic male germ cells of Drosophila. Enviado para su publicación.
Tosal, L. et al. (1998). *Mutagenesis* **13**, 375-380.
Tosal, L. et al. (1999a). The nucleotide excision repair mechanism (NER) repairs O^4-ethylthymine adducts in *Drosophila melanogaster*. Enviado para su publicación.
Tosal, L. et al. (1999b). The *mus308* locus of Drosophila melanogaster is implicated in the bypass of ENU-induced O-alkylpyrimidine adducts. Enviado para su publicación.
Würgler, F.E. et al. (1984). En: *Handbood of Mutagenicity Test Precedures*. (Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., y Ramel, C. eds.) Elsevier Science. Amsterdam, pp. 555-601.
Würgler, F.E. y E.W. Vogel (1986). En: *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection*, **vol. 10**. (de Serres, F.J., ed.). Plenum Press, New York, pp. 1-59.

GENETIC DAMAGE BY ANTICANCER DRUGS IN GERM CELLS: CORRELATIONS WITH THEIR ACUTE TOXICITY AND CARCINOGENICITY

Ekkehart W. Vogel & Madeleine J. M. Nivard
Leiden University Medical Centre, Dept. Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, MGC, Wassenaarseweg 72, 2300 RA Leiden, Netherlands

To learn about "potency" of genotoxic agents and to use this information for hazard evaluation and risk assessment, there is a need to develop methodologies for potency ranking of genotoxic carcinogens and germ-line mutagens. During the past years, several attempts have been made into this direction: (1) The EPA/IARC genetic activity profile (GAP) database [1] consists of a profile display of mutagenicity data which illustrates graphically the positive and negative results for a chemical. (2) Another approach that uses the GAP database, the ICPEMC Agent Score system [2], combines all major parameters of mutagenicity testing (dose, metabolic activation, type of test, sign of response) into a composite score for a chemical. (3) Bartsch and co-workers [3,4] showed for alkylating agents quantitative structure-activity relationships (SARs) between types of DNA modifications and tumor incidence in rodents. (4) These SARs were further related to genetic activity spectra obtained from both *in vitro* and *in vivo* systems, using the 'relative efficiency approach' developed by Ehrenberg [5]. The ranking established by this method for individual members of groups of chemicals was then compared with their ranking position on the relative carcinogenic potency scale [6-9].

Since all approaches have their advantages and limitations with respect to qualitative and quantitative of information they can provide on heritable mutagenicity and/or carcinogenicity, the question was raised whether additional information might be gained from a combined application of these four concepts. This paper represents a brief overview of a joint effort recently made into this direction [10].

The covalent DNA-binding anticancer drugs seemed the most suitable and interesting group of genotoxins for such an exercise: (1) The nature of DNA modifications induced by these chemicals is well understood [11]. (2) There exists not only a substantial database on their tumorigenicity in rodents and humans, but anticancer drugs served extensively as model chemicals for studying inducible heritable genetic damage in the mouse and Drosophila, thus enabling trans-species comparisons of carcinogens and germ-cell mutagens. In fact, more than half of the known mouse germ cell mutagens are anticancer drugs. (3) Several drugs are implicated in causing secondary tumours in cancer patients. (4) There is additional concern about heritable genetic risk from exposure to anticancer drugs binding covalently to DNA. Anticancer drugs are among the oldest chemotherapeutics developed. [12].

A total database of 41 chemicals, composed of six sub-classes of covalent DNA-binding anticancer drugs (37 chemicals) and four alkyl-epoxides, was analyzed to identify common features in GAPs for heritable damage in male germ cells of mouse and Drosophila and carcinogenic potency in rodents. The strategy followed has been

the combined application of four approaches: (i) the analysis of experimental SAR's and AAR's observed for male germ cells of mouse and Drosophila; (ii) the comparison in rodents of TD_{50} and LD_{50} estimates, indicators of carcinogenic potency and acute toxicity, with structural features of the chemicals under evaluation [4,9]; (iii) the use of composite agent scores from a database developed by ICPEMC [13]; and (iv) the analysis of the DRF (dose-related function) parameter, obtained by pair-wise and group-wise matching of data on GAPs [14].

The analysis showed that the understanding and prediction of rank positions of individual genotoxic agents requires information on their mechanism of action. Based on SARs and AARs, the covalent DNA binding antineoplastic drugs were divided into three broad categories. Category 1 comprises mono-functional alkylating agents that primarily react with ring nitrogen moieties of purines in DNA. Efficient DNA repair is apparently the major protective mechanism for their low genotoxic effects in repair-competent germ cells, and the need of high exposure doses for tumor induction in rodents. Due to cell type related differences in the efficiency of DNA repair, a strong target cell specificity in various species regarding the potency of these agents for adverse effects is found. Three of the four evaluation systems ranked category 1 agents lower than those of the other two categories. Category-2 type mutagens produce O-alkyl adducts in DNA in addition to N-alkyl adducts. In general, certain O-alkyl DNA adducts appear to be slowly repaired, or even not at all, which make this kind of agents potent carcinogens and germ-cell mutagens. Agents of this category gave high potency scores in all four expert systems. The major determinant for the high rank positions on any scale of genotoxicity of category-3 agents is their ability to induce primarily structural chromosomal changes. These agents are able to cross-link DNA. A confounding factor among category-3 agents is that often the genotoxic endpoints occur close to or at toxic levels, and that the width of the mutagenic dose range, i.e., the dose area between the lowest observed effect level and the $LD_{50,}$ is smaller (usually no more than one log. unit) than for chemicals of the other two categories.

In conclusion, for all three categories of genotoxic agents strong correlations were observed between their carcinogenic potency, acute toxicity and germ-cell specificity.

References

[1] M. D. Waters, H.F. Stack, N.E. Garrett, M.A. Jackson, The genetic activity profile database, Envir. Health Perspect. 96 (1991) 41-45.

[2] M.L. Mendelsohn, D.H. Moore II, P.H.M. Lohman, A method for comparing and combining short-term genotoxicity test data: Results and interpretation, Mutation Res. 266 (1992) 43-60.

[3] H. Bartsch, B. Terracini, C. Malaveille, L. Tomatis, J. Wahrendorf, G. Brun, B. Dodet Quantitative comparisons of carcinogenicity, mutagenicity and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating agents and of the initial O^6:7-

alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic potency in rodents, Mutation Res. 110 (1983) 181-219.

[4] A. Barbin, H. Bartsch, Nucleophilic selectivity as a determinant of carcinogenic potency (TD_{50}) in rodents: a comparison of mono- and bi-functional alkylating agents and vinyl chloride metabolites, Mutation Res. 215 (1989), 95-107.

[5] S. Osterman-Golkar, L. Ehrenberg, and C.A. Wachtmeister, Reaction kinetics and biological action in barley of mono-functional methanesulphonic esters, Radiation Botany 10 (19970) 303-327.

[6] E.W. Vogel, A. Barbin, M.J.M. Nivard, H. Bartsch, Nucleophilic selectivity of alkylating agents and their hypermutability in *Drosophila* as predictors of carcinogenic potency in rodents, Carcinogenesis 11 (1990) 2211-2217.

[7] I. Quinto, M. Radman, Carcinogenic potency in rodents versus genotoxic potency in *E. coli*: a correlation analysis of bifunctional alkylating agents, Mutation Res. 181 (1987) 235-242.

[8] T. Roldn-Arjona, F.L. Luque-Romero, M. Ruiz-Rubio, C. Pueyo Quantitative relationship between mutagenic potency in the Ara test of *Salmonella typhimurium* and carcinogenic potency in rodents, Carcinogenesis 11 (1990) 975-980.

[9] E.W. Vogel, M.J.M. Nivard, L.A.B. Ballering, H. Bartsch, A. Barbin, J. Nair, M.A. Comendador, L.M. Sierra, I. Aguirrezabalaga, L. Tosal, L. Ehrenberg, R.P.P. Fuchs, R. Janel-Bintz, G. Maenhaut-Michel, R. Montesano, J. Hall, H. Kang, M. Miele, J. Thomale, K. Bender, J. Engelbergs, M.F. Rajewsky, DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of structure-activity relationships for cross-species extrapolation, Mutation Res.353 (1996) 177-218.

[10] E.W. Vogel, A. Barbin, M.J.M. Nivard, H.F. Stack, M.D. Waters, P.H.M. Lohman, Heritable and cancer risks of exposure to anticancer drugs: inter-species comparisons of covalent deoxyribonucleic acid-binding agents, Mutation Res., 400 (1998) 509-540.

[11] W.B. Pratt, R.W. Ruddon, W.D. Ensinger, J. Maybaum, The Anticancer Drugs, Oxford University Press, 1994, 1-352.

[12] I.H. Krakoff, Cancer chemotherapeutic agents, Ca- A Journal for Clinicians 37 (1987) 93.

[13] P.H.M. Lohman, M.L. Mendelsohn, D.H. Moore II, M.D. Waters, D. J. Brusick, J. Ashby, W.J.A. Lohman, A method for comparing and combining short-term genotoxicity test data: The basic system, Mutation Res. 266 (1992) 7-25.

[14] M.A. Jackson, H. F. Stack, M. D. Waters, Genetic activity profiles of anticancer drugs, Mutation Res. 355 (1996) 171-208.

3 / 01

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA REVERSIÓN DEL ALELO *white-ivory* DE *Drosophila melanogaster*

*Suárez Figueras, S., **Cabré Fabré, O., **Velázquez Henar, A., **Marcos Dauder, R., **Xamena López, N.

*Inst. Investig. Anál. Aliment. Univ. Santiago. 15706 S. Compostela.**Dept. Genèt. Microbiol. Univ. Autòn. Barcelona, 08193 Bellaterra. noel.xamena@uab.es

La inducción de la reversión del alelo *white-ivory* de *Drosophila melanogaster* se ha considerado como un buen indicador de actividad mutagénica. Sin embargo, no se conoce todavía el mecanismo molecular de dicha reversión.

El fenotipo *white-ivory* es debido a una duplicación de unos 2,96 kb de la región del locus *white* comprendida entre las posiciones +2795 y –173 (según coordenadas de Levis). Cabe esperar que la reversión al fenotipo salvaje vendrá dada por la escisión de una de las copias de la duplicación.

Con el fin de conocer la causa de la reversión y, en caso de pérdida de una de las copias, la precisión con que se da tal escisión, hemos aislado y analizado líneas revertientes obtenidas tras el tratamiento de una cepa mutante del alelo *white-ivory* con agentes alquilantes.

El análisis por *Southern blot* así como el resultado de la amplificación por PCR de tres regiones específicas, que incluyen el inicio y final de la región duplicada y la zona de unión de ambas copias, señalan que los revertientes han perdido una de las copias duplicadas características de *white-ivory*. No se han detectado alteraciones en el locus *white* tras ser analizadas por *Southern blot* otras regiones del locus.

La secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR pone de manifiesto que los revertientes analizados presentan la escisión precisa de una copia así como algunas diferencias respecto a la secuencia publicada del gen *white* en estas regiones y al tamaño del fragmento duplicado.

3 / 02

BIOMONITORIZACIÓN DE UN GRUPO DE TRABAJADORAS DE LA INDUSTRIA DEL CALZADO: EFECTOS GENOTÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN A DISOLVENTES ORGÁNICOS

Creus, A. [1], Pitarque M. [1], Vaglenov A. [1], Hirvonen, A. [2], Norppa H. [2], Marcos, R. [1]
[1] Grup de Mutagènesi, Dpt. Genètica i Microbiologia, UAB, Bellaterra;
[2] Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki.

Según la IARC, existe un aumento del riesgo de cáncer en los trabajadores de la industria de manufacturación del calzado, especialmente de leucemia, cáncer nasal y de pulmón. En cambio, los estudios de biomonitorización en poblaciones expuestas a disolventes orgánicos presentan resultados variables y poco concluyentes.

Para aportar nuevos datos sobre el potencial genotóxico de esta exposición, se ha efectuado un amplio estudio de biomonitorización en mujeres empleadas en la industria del calzado de Bulgaria. Para ello, se realizaron los ensayos del Cometa, micronúcleos (MN) e intercambios entre cromátidas hermanas (SCE), en linfocitos de sangre periférica. Además, se midieron los niveles de tolueno, gasolina, acetona, etilacetato y diisocianato en el lugar de trabajo, se hicieron análisis individuales de la concentración de hemoglobina (HG), de ácido hipúrico (HA) en orina, y se estudió la posible influencia de los polimorfismos genéticos de las enzimas glutatión-S-transferasas (M1 y T1), relacionadas con el metabolismo de diferentes carcinógenos.

Los marcadores estudiados demostraron la existencia de efectos biológicos asociados a la exposición laboral a disolventes orgánicos (incremento de la concentración de HA y disminución del nivel de HG). Sin embargo, utilizando los ensayos del Cometa y SCE no se observaron efectos significativos. Por el contrario, se detectó un notable incremento de la frecuencia de MN en las mujeres expuestas a disolventes orgánicos. Estos resultados nos permiten sugerir que la acción genotóxica de estos compuestos se debería, principalmente, a un mecanismo aneuploidogénico.

3 / 03

EFECTOS GENOTÓXICOS DEL BISFENOL A DIGLICIDIL ÉTER Y SUS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS EN LINFOCITOS HUMANOS

Suárez Figueras, S., Sueiro Benavides, R.A., y Garrido Vázquez, J.
Instituto de Investigación e Análises Alimentarias. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Sur s/n. 15706 Santiago de Compostela. ssuarez@usc.es

El Bisfenol A diglicidil éter (BADGE) se usa habitualmente, como recubrimiento interno de latas de conservas. Este monómero puede migrar del envase al alimento, lo que resulta un peligro potencial al que estarían expuestos los consumidores. En las investigaciones promovidas por el Scientific Committee on Food (SCF) de la UE se confirmó la migración del BADGE, y además se detectó que en simulantes acuosos de la UE, este compuesto se degradaba originando dos nuevos productos de los que no se tenía ninguna información sobre sus propiedades genotóxicas. A partir de los resultados obtenidos en ensayos de mutagenicidad con procariotas (ver comunicación acompañante), hemos ampliado este estudio a genotoxicidad en eucariotas. Para ello, hemos analizado la genotoxicidad del BADGE y de sus productos de hidrólisis mediante el ensayo de micronúcleos (MN), empleando cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, con y sin activación metabólica. Este ensayo permite la detección de lesiones, tanto inducidas por agentes clastogénicos como por agentes aneugénicos. Los resultados de este estudio, concuerdan con los ya obtenidos en los ensayos bacterianos de mutación reversa, ampliando a células eucariotas las propiedades genotóxicas encontradas en procariotas.

3 / 04

POTENCIAL MUTAGÉNICO DEL BISFENOL A DIGLICIDILÉTER (BADGE) Y SUS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS EN EL ENSAYO DE MUTACION REVERSA CON *E. COLI*

Sueiro Benavides, R.A.A., Suárez Figueras, S., Araujo Prado, M., Garrido Vázquez, J.

Instituto de Investigación e Análises Alimentarias. Universidad de Santiago. Campus Sur s/n. 15706. Santiago de Compostela. mproraan@usc.es.

Las resinas epoxídicas se emplean como recubrimientos plásticos interiores de materiales destinados a entrar en contacto con alimentos, con la finalidad de aumentar la inercia envase-alimento. En este tipo de aplicaciones, el BADGE es el monómero más empleado en la fabricación comercial de estas resinas epoxídicas. Sin embargo, se sabe que este compuesto puede llegar a migrar del envase al alimento y que es inestable en los simulantes acuosos de alimentos, originándose dos productos de degradación, que corresponden a la apertura de uno (primer producto de hidrólisis) o de sus dos anillos epoxídicos (segundo producto de hidrólisis). Teniendo en cuenta la ausencia de información sobre el potencial mutagénico de estos productos de degradación, y dada su importancia, se ha analizado el BADGE como compuesto de partida y sus dos productos de hidrólisis, empleando el ensayo de mutación reversa con las cepas de *E. coli* WP2, WP2*uvrA* e IC3327 (derivada *rfa* de la cepa WP2 uvrA, con el plásmido pKM101). El estudio se ha realizado tanto en presencia como en ausencia de la fracción microsomal S9, utilizando el método de incorporación directa en placa. Los resultados obtenidos confirman el potencial mutagénico del BADGE y asimismo demuestran la presencia de dicha actividad en su primer producto de hidrólisis.

3 / 05

ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE SECUENCIAS MICROSATÉLITES EN MUTANTES DEFICIENTES EN REPARACIÓN DEL DNA DE *Drosophila melanogaster*

López, A., Noel, X., Marcos, R. and Velázquez, A.
Grup de Mutagènesis, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España. Antonia.Velazquez@uab.es

Los mecanismos de reparación del DNA en *Drosophila* son poco conocidos. Sin embargo, debido a la elevada homología que existe entre dichos mecanismos en eucariotas, desde levaduras a mamíferos, en los últimos años se ha hecho un avance considerable en el conocimiento de los mecanismos de reparación en *Drosophila*.

Uno de estos mecanismos, la reparación de falsos apareamientos (*mismatch repair*), se ha asociado con la estabilidad del genoma por lo que la deficiencia en dicho mecanismo incrementa la inestabilidad de secuencias microsatélites, tanto en bacterias como en eucariotas. Recientemente se ha identificado en Drosophila un gen homólogo al gen *MSH2* de levaduras asociado con la inestabilidad de microsatélites.

En *Drosophila melanogaster* se han identificado unos treinta mutantes asociados con deficiencias de reparación del DNA, aunque se desconoce la función del producto génico de muchos de ellos. El objetivo de nuestro trabajo consiste en determinar si algunos de estos mutantes presenta inestabilidad de microsatélites, indicando así su implicación en la reparación de falsos apareamientos. Para ello, se analizan por PCR 10 secuencias microsatélites en los individuos descendientes de machos tratados con acetilaminofluoreno (AAF) y cruzados con hembras de las diferentes cepas deficientes en reparación del DNA. Se presentan los resultados obtenidos con las cepas: *mus-201, mus-205, mus-207, mus-308, mei-9, mei-41* y *spel1*.

3 / 06

EL ENSAYO DEL COMETA: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN DE USO LIBRE

Ferreiro J.A., Sierra, L.M., Comendador, M.A.
Area de Genética, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo.

El ensayo del cometa permite la detección rápida y eficaz en células eucariotas individualizadas de roturas del ADN, tanto de cadena sencilla como doble, de sitios sensibles a alcali, así como de sitios con reparación por escisión de nucleótido incompleta. En esta última década, este ensayo ha mostrado una creciente aceptación por parte de los investigadores, siendo ampliamente utilizado en diversos campos de estudio: genotoxicología, reparación del ADN, biomonitoreo ambiental y humano, etc.

A pesar de su amplia utilización, todavía no existe acuerdo sobre cuál es el parámetro más adecuado para cuantificar el daño inducido por un determinado tratamiento, siendo el método más utilizado la determinación del momento de la cola del cometa. Para la estimación de éste y de otros parámetros, se utiliza habitualmente alguno de los programas de análisis de imágenes disponibles comercialmente. Estos programas presentan la ventaja de que facilitan, aceleran y objetivizan en gran medida la obtención de resultados. Por el contrario, presentan la gran desventaja de su elevado coste. Con el propósito de solventar dicho inconveniente, se ha desarrollado un macro para el programa de análisis de imágenes "*Scion Image*", de libre distribución y disponible para PC y Macintosh. Este macro permite la determinación rápida y objetiva de los parámetros habitualmente utilizados: porcentaje de ADN en cabeza y cola, longitud de la cola, momento de la cola, etc. Además, presenta la ventaja adicional de que los parámetros inicialmente establecidos en el programa son fácilmente modificables por el usuario final atendiendo a sus preferencias y necesidades particulares.

3 / 07

GENOTOXICIDAD Y RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN *D. melanogaster*

Díaz-Valdés, N.; Sierra, M. y Comendador, M.A.
Departamento de Biología Funcional. Área de Génetica. Universidad de Oviedo.

El estudio de la influencia que distintos agentes genotóxicos pueden tener en el proceso de recombinación homóloga, en eucariotas superiores, se ha centrado casi exclusivamente en recombinación mitótica. Sin embargo, el análisis de esos efectos sobre la recombinación meiótica es igualmente importante y además permitiría una comparación más entre células somáticas y germinales. Para llevar a cabo este análisis, se han estimado las frecuencias de recombinación entre cinco marcadores del cromosoma X, fácilmente identificables. La utilización de un patrón de descendencias permite diferenciar la descendencia procedente de oocitos, en los que no se espera encontrar influencia del agente, puesto que estas células ya han superado la meiosis en el momento del tratamiento, y la descendencia que proviene de oogonias, células en las que se pueden estudiar los efectos del mutágeno sobre la recombinación meiótica.

Como agentes mutagénicos se están utilizando ENU, DES y HMPA, potentes mutágenos y carcinógenos con mecanismos de acción diferentes. Hasta el momento sólo se han obtenido resultados de oogonias tras el tratamiento con ENU. Las frecuencias de recombinación encontradas muestran diferencias significativas con el control únicamente en una región concreta del cromosoma comprendida entre los loci *yellow* y *white*, en la que se detecta una reducción significativa de la frecuencia de recombinación bajo los efectos del compuesto. Tal y como se esperaba los resultados obtenidos en oocitos con los tres compuestos no muestran diferencias significativas con el control. Estos resultados, que deben ampliarse, apuntan a que aunque hay daños en el ADN capaces de influir en la recombinación meiótica, la modificación de las frecuencias de recombinación probablemente dependerá también del grado de condensación cromosómica, puesto que existen diferencias entre distintas regiones del cromosoma.

3 / 08

EFECTOS DEL ESTIRENO-7,8-ÓXIDO SOBRE LA EXPRESIÓN DE P53, P21, BCL-2 Y BAX EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

Laffon, B., Beyer, K., Pásaro, E., Méndez, J.
Departamento de Biología Celular y Molecular. Area de Genética.
Universidad de A Coruña, A Zapateira s/n, 15071. E-mail: laffon@mail2.udc.es

La mayor parte de los efectos genotóxicos resultantes de la exposición a estireno han sido atribuídos al estireno-7,8-óxido (SO), un epóxido procedente de la metabolización del estireno por el complejo citocromo P450. Como agente que potencialmente daña el ADN, es posible que la presencia de estireno sea una causa de inducción de apoptosis de las células que entran en contacto con él.

Estudios recientes han demostrado que la proteína P53 desempeña un papel crucial en la preservación de la integridad del genoma, siendo capaz de inducir la muerte por apoptosis en las células que presenten un ADN severamente dañado. Por otra parte, en aquellas células que muestren lesiones reparables en su material genético, P53 activa la expresión del gen $p21^{WAF1/CIP1}$, que induce la detención del ciclo celular en la fase G_1 para permitir la actuación de los mecanismos reparadores antes de pasar a la fase S. La proteína P21 regula el ciclo celular mediante la inhibición de las quinasas ciclino-dependientes, proteínas necesarias para la progresión de la fase G_1 a la fase S. Además, diversos trabajos han reportado la regulación positiva del gen *bax* y la regulación negativa del gen *bcl-2* por P53.

Para estudiar la posible inducción de apoptosis por el SO, cultivos de linfocitos humanos fueron expuestos a esta sustancia (50 y 200 μM) 24 después de su inicio. A fin de monitorizar la expresión génica se extrajeron alícuotas de cada cultivo a las 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas. De cada una de ellas fue purificado el ARNm total, siendo estandarizadas RT-PCRs para *p53*, *p21*, *bcl-2* y *bax*, utilizando cebadores específicos para cada ARNm a cuantificar.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10605B98)

3 / 09

ANALISIS IN VITRO E IN VIVO DE LA CAPACIDAD GENOTOXICA DEL FARMACO ANTIHIPERTENSIVO ATENOLOL MEDIANTE TECNICAS DE CITOGENETICA CLASICA Y MOLECULAR (FISH)

Telez Sedano, M., Criado Alonso, B., Martinez Santiago, B., Lostao Zuza, C., Ortega Azpitarte, B., Peñagarikano Ahedo, O., Flores Elices, P., Ortiz Lastra, E., Jimenez Sanz, R., Alonso Rojas, R., Arrieta Saez, I.

Dpto. Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. Apdo. 644, 4080 Bilbao.

En este estudio se evaluaron los posibles efectos genotóxicos del fármaco antihipertensivo atenolol mediante el análisis de las aberraciones cromosómicas (CA), intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN) inducidos en linfocitos de sangre periférica tanto *in vitro* como *in vivo*. La utilización de las técnicas moleculares de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) fueron muy útiles a la hora de evaluar la capacidad clastogénica/aneugénica de la sustancia ensayada.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo, por una parte, en 4 pacientes hipertensos bajo tratamiento con atenolol y, por otra, en 4 controles sanos a los que se administró una dosis (50 mgr) de atenolol por vía oral. El estudio *in vitro* se realizó en los controles sanos añadiendo la sustancia a ensayar al medio de cultivo en una concentración final similar a la encontrada en plasma y, en segundo lugar, cultivando las células sin el fármaco.

Los resultados no revelaron aumentos significativos en la frecuencia de CA entre pacientes y controles, aunque en estos últimos se observó un ligero incremento después de añadir el atenolol al medio de cultivo y después de la ingesta oral. El análisis de SCE no mostró diferencias significativas en ningún caso. Por último, se detectó un aumento significativo en la frecuencia de MN en el grupo de pacientes. El alto porcentaje de MN con señales fluorescentes permitió señalar la actividad principalmente aneugénica del atenolol.

3 / 10

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE DISTINTOS COMPUESTOS DE CROMO UTILIZANDO EL ENSAYO *SMART* DE ALAS EN *Drosophila melanogaster*

Creus, A., Amrani, S., Rizki, M., Marcos, R.
Grup de Mutagènesi, Dept. Genètica i Microbiologia,Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra.

Se ha empleado el ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster* para verificar la actividad genotóxica de dos compuestos de cromo hexavalente (cromato potásico y dicromato potásico) y un compuesto de cromo tetravalente (cloruro de cromo), siguiendo los procedimientos estándar. Este ensayo permite detectar tanto los sucesos de recombinación mitótica como los debidos a distintos fenómenos mutacionales. Los efectos genotóxicos se han evaluado a partir de la incidencia de sectores mutantes en las alas de moscas trans-heterocigóticas para los marcadores recesivos del tercer cromosoma *multiple wing hairs* (*mwh*) y *flare-3* (*flr*^{3}), así como en moscas heterocigóticas para *mwh* y la inversión múltiple *TM3*. Los cambios genéticos inducidos en las células somáticas de los discos imaginales de las alas conducen a la formación de clones mutantes en las dos superficies de las alas. Los sectores sencillos se pueden producir por distintos mecanismos genotóxicos: mutación puntual, deleción, roturas cromosómicas y recombinación mitótica; mientras que los sectores dobles sólo pueden ser debidos a la recombinación mitótica.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprende que los dos compuestos de cromo (VI) evaluados incrementan claramente la incidencia de clones mutantes, induciendo elevados aumentos en la frecuencia de todos los tipos de clones analizados. Por el contrario, el cloruro de cromo (III) no aumenta la frecuencia de clones mutantes. Una elevada proporción de los clones inducidos es debida a la recombinación somática, lo que confirma la gran capacidad recombinagénica de los compuestos de cromo (VI).

3 / 11

BIOMONITORIZACIÓN DE TRABAJADORES AGRÍCOLAS EXPUESTOS A PLAGUICIDAS. NIVELES DE DAÑO GENÉTICO (MICRONÚCLEOS) Y SU RELACIÓN CON EL GENOTIPO GST

Marcos, R.[1], Lucero, L.[1], Pastor, S.[1], Suárez, S.[12], Parrón, T.[3], Gómez, C.[3], Durbán, R.[3], Creus, A.[1]

[1] Grup de Mutagènesi, Dept. Genètica i Microbiologia,UAB, 08193 Bellaterra; [2] Lab. Microbioloxia, Inst. Investig. Anal. Aliment. Univ. Santiago, 15706 Santiago de Compostela; [3] Delegación Provincial de la Consejería de Salud, Almería.

Para estimar el riesgo genético de la exposición a plaguicidas, se ha realizado un estudio de biomonitorización evaluando los niveles de daño citogenético en un grupo de 64 agricultores de la zona del Egido (Almería), expuestos a mezclas de plaguicidas. Las estimas del daño genético se han realizado determinando la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y en células de la mucosa bucal. Estos parámetros también se evaluaron paralelamente en un grupo control de 50 personas de la misma zona, sin antecedentes de exposición a plaguicidas u otros agentes genotóxicos. A partir de encuestas elaboradas para este tipo de estudios, se obtuvo una completa información de las características de los donantes sobre la exposición laboral, dieta, hábitos e historial médico, entre otras, con la finalidad de establecer relaciones entre los niveles de daño genético y aquellos factores moduladores de su expresión.

Teniendo en cuenta que el daño genético resultante puede estar relacionado con la capacidad individual de metabolización de los xenobióticos, también se determinaron, mediante PCR, los genotipos glutation-S-transferasa (GSTT1 y GSTM1).

Del análisis estadístico de los resultados se concluye que no existen diferencias significativas entre el grupo de trabajadores agrícolas y el control, y que ninguno de los factores de confusión parecen afectar los parámetros citogenéticos estudiados.

Respecto a la relación entre los distintos genotipos individuales y la expresión del daño genético, tan sólo se ha encontrado una asociación negativa entre el genotipo nulo GSTT1 y el índice (CBPI) de proliferación celular.

3 / 12

EFECTO DE LA LIGASA DE T4 EN LA MODULACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y AGENTES RADIOMIMÉTICOS EN CÉLULAS EN CULTIVO

T. Ortiz, J. Piñero, A. Edreira, M.A. Ledesma
Cultivos Celulares y Radiobiología. Dpto. Biología Celular. Universidad de Sevilla.
Avda. Reina Mercedes s/n, 41012- Sevilla. salles@cica.es

En estudios de reparación de ADN, la reunión de las cadenas es un paso crítico y último de todo el proceso. Algunos tipos celulares radiosensibles, defectuosos en reparación, han sido caracterizados como defectivos en ligación y en algunos incluso defectivos en la síntesis de alguna de las ligasas de ADN. Nuestro objetivo fue observar si la ligasa de ADN procedente del fago T4 era capaz de reparar, en células vivas, el daño inducido por agentes que inducen mayoritariamente o exclusivamente roturas de doble cadena en el ADN.

Hemos utilizado linfocitos humanos en Go tratados con bleomicina o un endonucleasa de restricción, Msp I, y el efecto de la ligasa de T4 ha sido medido por el ensayo del cometa.

Por otra parte, se ha testado el efecto de este enzima de reparación en dos lineas celulares de fibroblastos de hamster chino en cultivo, AA8 y EM9, siendo esta última radiosensible y defectuosa en ligación. En este caso, han sido utilizados como inductores de daño al ADN, tanto radiación ionizante como endonucleasas de restricción. Para medir reparación utilizamos ensayos clonogénicos y recuento de aberraciones cromosómicas en matafase.

En todo los casos, bleomicina, endonucleasas de restricción y ligasa de T4, fueron introducidos en células vivas por electroporación.

Los resultados obtenidos indican que la ligasa de T4 es capaz de reunir las roturas de doble cadena e incrementar la reparación en células vivas tratadas con radiomiméticos pero no modular el daño inducido por rayos X.

3 / 13

DAÑO EN EL DNA DETECTADO MEDIANTE EL ENSAYO "COMETA" EN AVES AFECTADAS POR EL VERTIDO TÓXICO DE AZNALCOLLAR

Pastor, N., Tella J., Hiraldo, F. y Cortés, F.
Facultad de Biología y Estación Biológica de Doñana, Sevilla

Nuestro objetivo ha consistido en evaluar el daño a nivel molecular en algunas de las especies y poblaciones que habitan en el Parque Nacional de Doñana y su entorno, presuntamente afectadas por el vertido tóxico de Aznalcollar.

El vertido minero tenía altas concentraciones de diversos metales -Fe, Zn, Pb, As, Cu, Sb, Tl, Cd, Hg-, algunos de éstos (arsénico y cadmio) conocidos genotóxicos, mutagénicos e incluso carcinogénicos (LeBlanc & Bain, 1997). Entre un 5-15% de estos metales se infiltraron en el suelo y mediante la oxidación aumentó su movilidad y biodisponibilidad. Algunos de estos metales participan en reacciones redox -Fe, As, Cu, Sb, Cd- induciendo estrés oxidativo y, si se supera la capacidad antioxidante de las células afectadas, distintas biomoléculas pueden resultar alteradas.

Con este objetivo se estandarizó el ensayo del “cometa” con el fin de evaluar el daño genotóxico producido por metales redox. Este ensayo permite detectar con gran sensibilidad las roturas en las cadenas del DNA debidas al estrés oxidativo. Como bioindicadores se emplearon células sanguíneas procedentes de dos especies de aves, milano y cigüeña, de zonas afectadas por el vertido tóxico.

La versatilidad del ensayo del “cometa” explica su aplicación en materiales y órganos tan diversos como raices de cebolla (Navarrete et al., 1997), branquias de mejillón (Wilson et al., 1998), diferentes tejidos de ratón (Miyamae et al., 1998), etc., adecuando las condiciones para las distintas especies.

Este tipo de valoración constituye una cuestión urgente dadas las implicaciones sociales, económicas, medioambientales y ecológicas que se derivan del accidente de la mina de Aznalcollar.

3 / 14

YIELD OF SCES AND TRANSLOCATIONS PRODUCED BY 3-AMINOBENZAMIDE IN CULTURED CHINESE HAMSTER CELLS

Cortés, F., Mateos, S., Pastor, N. and Dominguez, I.
Department of Cell Biology, University of Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain. Tel.: 954557039; Fax: 954610261; e-mail: cortes@cica.es

There is evidence that poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) plays an important role in cellular events such as DNA replication and DNA repair in which breaking and rejoining of DNA strand breaks may occur. Although the precise physiological role of PARP is still a matter of discussion, recent experimental approaches have clearly revealed the involvement of PARP in the maintenance of genomic integrity due to its role during base excision repair (BER).

The molecular mechanism leading to stable aberrations (translocations), sister chromatid exchanges (SCEs) and unstable aberrations (dicentrics) has not yet been clarified. The CHO mutant EM9 is especially useful for studying the mechanism of formation of SCEs

Different doses of 3 aminobenzamide (3AB), a strong inhibitor of PARP have been used to study their effect on the BrdU-substituted DNA of the Chinese hamster AA8 cell line. The frequencies of sister chromatid exchanges (SCEs) and translocations were determined using the fluorescence plus Giemsa (FPG) and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques, respectively. The results indicate that 3AB effectively induced a dose-dependent incresase in the frequency of SCEs, but this enhancement in the yield of SCEs is not paralleled by an increase in translocations. These results are discussed in terms of the as yet incompletely understood molecular mechanism of action of the enzyme PARP in relation with DNA damage.

3 / 15

EFECTO POTENCIADOR DEL BUTIRATO DE SODIO EN LA INDUCCION FOTOQUÍMICA DE ROTURAS DE DOBLE CADENA AL ADN

T. Ortiz, P. Chacón, R. Pleite, R. Toro y J. Piñero
Cultivos Celulares y Radiobiología. Dpto. de Biología Celular. Univ. de Sevilla.
Avda. Reina Mercedes s/n 41012-Sevilla E-mail:salles@cica.es

Gran parte de la investigación clínica sobre el cancer se centra en el problema de cómo matar selectivamente a las células cancerosas. En su mayoría los métodos actuales aprovechan diferencias relativamente sutiles existentes entre las células normales y las neoplásicas en referencia a la velocidad de proliferación , a su metabolismo y a la sensibilidad a la radiación. En particular los tratamientos de radioterapia matan a células cancerosas pero también son dañinos para las células normales , debido principalmente al efecto clastogénico indiscriminado que tienen sobre el ADN .

Este hecho ha potenciado la investigación de nuevos métodos para inducir roturas masivas de doble cadena al ADN, cada vez más selectivos para células proliferativas, y promover así la muerte celular. Uno de los métodos más interesantes, recientemente desarrollado, consiste en la inducción fotoquímica de rotura de ADN, mediante la exposición a pequeñas dosis de UV de cultivos celulares que previamente habían incorporado en su ADN 5'bromodesoxiuridina y Hoescht.

Aplicando este método fotoquímico y midiendo las roturas de ADN mediante electroforesis de campo pulsado, hemos comprobado la utilidad del método para inducir roturas de doble cadena al ADN dependiente de la dosis de radiación UV. Así mismo hemos encontrado que la intensidad del daño obtenido era comparable con la producida para altas dosis de rayos X. Por último , basándonos en el efecto que tiene el butirato de sodio como agente desestabilizador de la cromatina , hemos comprobado que la bromosustitución del ADN realizada en presencia de distintas concentraciones de butirato, aumenta considerablemente el número de roturas al ADN para bajas dosis de UV.

3 / 16

¿REPARA NER LOS DAÑOS EN LOS OXÍGENOS DEL DNA?

Álvarez, L., Sierra, L.M., Comendador, M.A.
Dpto. Biología Funcional, Área de genética. Universidad de Oviedo.

El sistema de reparación por escisión de nucleótido (NER) es, probablemente, el mecanismo de reparación de daños en el DNA más importante que existe debido al amplio rango de daños detectado y reparado. Se sabe que, en todos los organismos, repara eficientemente daños en los átomos de nitrógeno de las bases del DNA. Sin embargo, no está claro su papel en la reparación de daños en los átomos de oxígeno en organismos eucariotas superiores.

Con el fin de analizar la influencia del sistema NER en la reparación de daños en oxígenos del DNA, se ha utilizado N-etil-N-nitrosourea (ENU), un agente alquilante monofuncional que etila preferentemente los oxígenos del DNA (O^6-dG, O^4-dT y O^2-dT), en la obtención de un espectro molecular de mutación en células germinales femeninas deficientes en el sistema NER (locus *mus201*), utilizando el sistema *vermilion.* Este espectro se comparará con el obtenido previamente en condiciones eficientes para todos los sistemas de reparación.

Hasta el momento se han aislado 22 mutantes *vermilion*, de los que se han caracterizado a nivel molecular 6, encontrándose las siguientes mutaciones puntuales: 3 transiciones AT→GC (resultado del aducto O^4-EtT), y 3 transversiones, una AT→TA (consecuencia tanto de O^2-EtT como de N^3-EtA), otra GC→TA, y otra AT→CG, las cuales son resultado de lesiones en nitrógenos. Aunque este espectro es todavía provisional, contrasta con el obtenido en condiciones normales, en el que el 90% de las mutaciones son resultado de daños en el O^4 y O^2 de la Timina, y no se recuperan mutaciones con origen en daños en nitrógenos, que serían eficientemente reparados por el sistema NER.

3 / 17

MUTANTES DE *PHYCOMYCES* RESISTENTES A DIAMINOBUTANONA, UN INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE POLIAMINAS

Morera, B. (1), Flores, R. (1), Cohen, R.J. (2), Ruiz-Herrera, J. (3) y Cerdá Olmedo, E. (1)

(1) Dpto. Genética, Univ. Sevilla, España. (2) Dept. Biochem. Mol. Biol., Florida, USA. (3) Dpto. Ing. Genét., CINVESTAV, Irapuato, México.

Las poliaminas se encuentran en las células de todos los organismos y desempeñan funciones esenciales, como demuestran las observaciones con mutantes auxótrofos y la inhibición del crecimiento y la diferenciación por 2,4-diaminobutanona, un inhibidor de la descaboxilasa de la ornitina, primera enzima en la síntesis de poliaminas. En varios hongos la concentración de poliaminas aumenta antes de las transiciones del ciclo de vida vegetativo y estas transiciones se pueden bloquear con diaminobutanona a concentraciones que no inhiben el crecimiento del hongo. En *Phycomyces*, por el contrario, la diaminobutanona (1 mM) bloquea el crecimiento, sin afectar especialmente a las transiciones morfológicas. Para investigar el papel de las poliaminas en *Phycomyces* se han aislado cuatro mutantes *dab* que crecen a altas concentraciones de diaminobutanona. Todos los mutantes se diferencian normalmente y sus descarboxilasas de la ornitina no se distinguen *in vitro* de la silvestre, ni siquiera por su inhibición por diaminobutanona. Las concentraciones de poliaminas varían durante el ciclo de vida de *Phycomyces* de forma característica, diferente para el tipo silvestre y los distintos mutantes *dab*. Dos de los mutantes, uno dominante y otro semidominante, tienen unas quince veces más actividad enzimática que el tipo silvestre y superproducen putrescina. La enzima, de vida media muy corta en el silvestre, es muy estable en estos dos mutantes. La actividad enzimática y las concentraciones de poliaminas de los otros dos mutantes, uno semidominante y otro recesivo, son similares o menores que las del silvestre. Se ha clonado un fragmento del gen de la descarboxilasa de la ornitina de *Phycomyces* para investigar la regulación de su transcripción en los mutantes *dab*.

workshop
desarrollo y evolución

¿QUÉ APORTAN LAS FILOGENIAS BASADAS EN EL GEN RIBOSOMICO 18S Y LOS GENES HOX SOBRE EL ORIGEN Y RADIACIÓN DE LOS METAZOOS BILATERALES?

J. Tauler, I. Ruiz-Trillo, D. Pineda, E. Jimenez, J. Gonzalez-Linares, J.R. Bayascas, S. Carranza, M. Riutort, J. Garcia-Fernàndez, E. Saló & J. Baguñà
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

El origen y radiación de los organismos con simetría bilateral, o Bilateria, es aún el gran enigma de la filogenia de los Metazoos. Durante casi 150 años morfólogos y embriólogos han debatido intensamente acerca de la naturaleza del ancestro de los bilaterales, sin llegar a una solución consensuada. Entre las hipótesis más aceptadas destaca la basada en un aumento de complejidad paulatino a lo largo de la historia de la vida, desde organismos triblásticos sencillos (acelomados), a sucesivamente más complejos (pseudocelomados), hasta llegar a los celomados. En consecuencia, todos los fílums de organismos acelomados, principalmente el fílum Platelmintos (gusanos planos), serían los descendientes actuales más próximos a los primeros bilaterales. Una hipótesis alterna sostiene que los primeros bilaterales serían organismos complejos, probablemente segmentados y celomados, siendo acelomados y pseudocelomados grupos derivados de aquellos por simplificación.

El registro fósil muestra que los bilaterales aparecieron y se diversificaron de una manera repentina (unos 10-20 millones de años) durante el inicio del período Cámbrico, fenómeno al que se ha denominado, por su rapidez, Explosión Cámbrica. Esta súbita aparición ha impedido saber cual fué y cómo era el primer organismo bilateral asi como determinar el orden cladogénico de los principales grupos bilaterales. Esta falta de definición ha sido parcialmente compensada por el uso creciente, desde la década de 1980, de métodos moleculares aplicados a la filogenia. Entre ellos, la secuenciación y análisis del gen ribosomal 18S, ha sido el más empleado. Pese a ello tampoco ha sido capaz de resolver los enigmas planteados. La razón básica es que la molécula del 18S no parece tener resolución suficiente para definir claramente la cladogénesis de los principales grupos bilaterales, lo que reforzaría la realidad de la denominada Explosión Cámbrica (Philippe y col, 1994).

En la mayoría de esquemas filogenéticos, los Platelmintos aparecen como los bilaterales más primitivos. Para determinar la validez de tal supuesto, secuenciamos el gen que codifica el RNA ribosomal 18S (rDNA 18S) de un gran número de especies pertenecientes a este fílum y lo comparamos con secuencias de un ámplio espectro de fílums de metazoos. Los resultados demostraron que los Platelmintos no eran un grupo basal dentro de los Bilateria, sino un grupo emparentado con los Protostomados Spiralia (p.ej. moluscos y anélidos, entre otros) (Carranza y col, 1997, 1998) y, más concretamente, con los Lophotrochozoa (sensu Aguinaldo y col, 1997). Sin embargo, un orden de Platelmintos muy simples, los acelos, aparecían en los análisis separados del resto de Platelmintos y en una posición basal respecto al resto de bilaterales. La consecuencia directa de este resultado sería que los acelos podrían ser los descendientes directos de los primeros bilaterales y que el fílum Platelmintos

sería polifilético. Sin embargo, los acelos secuenciados hasta entonces (2 especies) presentaban un ritmo de acumulación de cambios en su DNA muy superior al de la mayoría de metazoos. Esta característica da lugar a que los organismos afectados se ubiquen en posiciones basales, más ancestrales, de las que en realidad les correspondería. Para solventar este problema secuenciamos el 18S rDNA de 18 especies de acelos con la intención de encontrar alguno/s con una tasa moderada de cambio, y por tanto comparable, al resto de metazoos efectuando además un test de saturación. Dos especies presentaron una moderada tasa de cambio. Utilizando una de ellas en un análisis filogenético que incluía representantes de todos los fílums de metazoos, confirmamos que los acelos no pertenecen a los Platelmintos, y que serían los descendientes directos de los primeros metazoos con simetría bilateral, anteriores al resto de los Bilateria actuales (Ruiz-Trillo y col, 1999). Diversos caracteres embriológicos y morfológicos apoyan la separación de los acelos del resto de Platelmintos y de los Protostomados Spiralia; en particular, su segmentación de tipo espiral en duetos claramente distinta de la típica en cuartetos. A pesar de la solidez de estos datos, es necesaria cierta cautela dados el elevado grado de saturación del 18S rDNA y la considerable divergencia entre las secuencias de los acelos y las del resto de metazoos, que podrían traducirse en posicionamientos artefactuales.

Una aproximación complementaria a la cuantitativa del 18S rDNA es el uso de marcadores cualitativos, poco sujetos a saturación y convergencia. Entre ellos, los genes pertenecientes al complejo Hox son, por su papel clave en la determinación del eje antero-posterior y su elevado grado de conservación evolutiva, un marcador potencialmente idóneo. La búsqueda de genes con homeobox en platelmintos de los órdenes Tricladida y Policladida realizada en nuestro laboratorio ha resultado en la detección e identificación de un elevado numero de representantes de los genes Hox (Saló y col, 1995; Bayascas y col, 1997), ademas de otras familias como los genes gap cefàlicos Otx (Stornaiuolo y col, 1998), y Pax (Callaerts y col 1999). El analisis comparativo de los genes del complejo Hox en Platelmintos (Bayascas y col, 1998) ha confirmado su mayor proximidad a los de anélidos y nemertinos, todos ellos representantes de los protostomados Lophotrochozoa, que a los de Artrópodos y Nemátodos (protostomados Ecdysozoa) o anfioxos y Vertebrados (deuterostomados). Junto a los datos del 18S, estos resultados demuestran que los Platelmintos no son bilaterales primitivos sinó, muy probablemente, un grupo basal de lofotrocozoos. Dicha posición permite suponer que la simplicidad morfológica de los Platelmintos es real o, caso fuera derivada a partir de organismos más complejos, se habría originado por mecanismos progenéticos (adquisición de la madurez sexual en fases embrionarias o larvarias) a partir del ancestro de todos los lofotrocozoos (Carranza, 1997; Bayascas et al, 1998).

En la actualidad tratamos de identificar los genes de los complejos Hox y ParaHox en acelos asi como el orden de sus genes mitocondriales, como marcadores filogenéticos cualitativos para corroborar la posición basal de los acelos deducida de los datos del 18S rDNA. Paralelamente, estamos realizando el estudio comparado de genes con homeobox y sus redes génicas implicados en el desarrollo embrionario del políclado *Discocelis tigrina* y en la regeneración del tríclado *Girardia tigrina*. Discutiremos además los resultados de la expresión de los genes Hox durante el desarrollo y

regeneración, además de la red génica implicada en la determinación de las estructuras oculares. Finalmente, comentaremos una nueva estrategia para el análisis de la función génica: el RNAi (interferencia del RNA).

Referencias

Aguinaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., and Lake, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-493.

Bayascas, J. R., Castillo, E., Muñoz-Mármol, A. M., and Saló, E. (1997). Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration. *Development* 124, 141-148.

Bayascas, J. R., Castillo, E., and Saló, E. (1998). Platyhelminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Dev. Genes Evol.* 208, 467-473.

Callaerts, P., Muñoz-Marmol, A. M., Glardon, S., Castillo, E., Sun, H., Li, W. H., Gehring, W. J., and Salo, E. (1999). Isolation and expression of a *Pax-6* gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia(G)tigrina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press),

Carranza, S. (1997). Taxonomia molecular mitjançant la seqüenciació del DNA ribosomic 18S. Aplicació a l'origen i filogènia dels Platihelmints. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.

Carranza, S., Baguña, J & Riutort, M. (1997). Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group?. An assessment using 18SrDNA sequences. *Mol.Biol.Evol.*14(5):485-497

Carranza, S., Giribet, G, Ribera; C, Riutort, M & Baguñà, J. (1998). The phylogenetic status of Platyhelminthes, as inferred from 18S rDNA sequences.*Hydrobiologia* 383: 189-190.

Philippe, H., Chenuil, A and Adoutte, A. (1994). Can the Cambrian explosion be inferred through molecuar phylogeny?. *Development*, Suppl. 15-25.

Ruiz-Trillo, I, Riutort, M., Littlewood, D.T.J, Herniou, E.A & Baguñà, J. (1999). Acoel flatworms: earliest extant bilaterian metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* 283: 1919-1923.

Saló, E., Muñoz-Mármol, A. M., Bayascas-Ramírez, J. R., Garcia-Fernàndez, J., Miralles, A., Casali, A., Corominas, M., and Baguñà, J. (1995). The freshwater planarian *Dugesia (G) tigrina* contains a great diversity of homeobox genes. *Hydrobiologia* 305, 269-275.

Stornaiuolo, A., Bayascas, J. R., Saló, E., and Boncinelli, E. (1998). A homeobox gene of the *orthodenticle* family is involved in antero-posterior patterning of regenerating planarians. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1153-1158.

HOX, PARAHOX, PROTOHOX: EL GENOMA DE ANFIOXO EN LOS ESTUDIOS DE EVO-DEVO

Carolina Minguillón(1), David E. K. Ferrier(1,*), Nina M. Brooke(2), Peter W.H. Holland(2) & Jordi Garcia-Fernàndez(1)

(1) Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

(2) School of animal and Microbial Sciences, University of Reading, United Kingdom

*Dirección actual en (2)

La conservación de los genes del desarrollo y sus funciones en taxa divergentes es fascinante, y ha atraído la imaginación de los biólogos y genéticos del desarrollo de medio mundo. La norma general es que los genes estén conservados en los diferentes filums y desempeñen una función similar durante el desarrollo(1). La nueva disciplina de la Evolución del Desarrollo ("Evo-Devo") intenta explicar la evolución y diversidad de los seres vivos como resultado de cambios en los programas de desarrollo embrionario utilizando genes que en general están muy conservados en animales aparentemente muy diferentes. Así, se ha propuesto que cambios en el número de genes o en su dominio de expresión y función pueden haber estado en la base de la evolución morfológica: la duplicación génica, seguida de divergencia funcional, puede ser un tipo de mutación que permita importantes cambios evolutivos(2).

Los genes del complejo o *cluster* Hox están presentes en la mayoría sino todos los filums animales, y desarrollan un papel central en la determinación del patrón axial. El origen y evolución del cluster Hox, aún de la máxima importancia para la Evo-Devo, es sin embargo todavía obscuro(3). Junto a los canónicos genes Hox, presuntamente organizados en complejos génicos, y con un patrón de expresión en el eje antero-posterior colinear con la posición en el complejo, existe toda una serie de genes Hox-*like*, o Hox huérfanos, claramente emparentados con los genes Hox, y con una historia evolutiva que puede ser la clave para entender la génesis del complejo Hox.

El cefalocordado anfioxo ha emergido como un buen modelo embriológico y genético para estudiar la evolución del desarrollo, y particularmente las innovaciones morfológicas que dieron como resultado el origen de los vertebrados(4). Es el pariente vivo más cercano a los vertebrados, y la embrología y anatomia comparadas sugieren que es descendiente de un intermediario crítico en la evolución de los vertebrados. Además, su genoma parece reflejar el estado del genoma del ancestro de los vertebrados, por lo que ocupa una posición privilegiada en la evolución animal, como representante arquetípico del phylum Cordados, y tal vez como referencia de los animales deutoróstomos.

El aislamiento y estudio de genes Hox y genes Hox-*like* en anfioxo nos ha permitido generar una serie de resultados e hipótesis, que se resumen a continuación:

1) Anfioxo posee un solo complejo Hox, arquetípico respecto a los cuatro (o más) complejos Hox presentes en vertebrados(5). El extremo 5' del complejo (los genes más "posteriores") parece no ser tan arquetípico como el resto del complejo, reflejando el fenómeno que denominamos "tail flexibility", que indica cierta flexibilidad evolutiva en la parte posterior del plan corporal, *versus* una mayor constricción en regiones más anteriores

2) Los vertebrados se originaron tras extensivos fenómenos de duplicación génica, incluso incluyendo poliploidización(6). Los genes duplicados, tras un rápido periodo de divergencia y adquisición de nuevas funciones, pueden haber sido instrumentales en la génesis de innovaciones morfológicas propias de los vertebrados.

3) Los patrones de expresión de los genes Hox en anfioxo sugieren que la función primitiva del *cluster* Hox en Cordados, y tal vez en deuteróstomos, es la regionalización antero-posterior del sistema nervioso(7).

4) El genoma de anfioxo contiene tres genes Hox-like, de los denominados "huérfanos", intimamente ligados, que constituyen el que denominamos *cluster* ParaHox(8). El *cluster* ParaHox es un parálogo evolutivo del *cluster*Hox: los complejos Hox y ParaHox se originaron en algún momento de la evolución por duplicación de un hipotético complejo ProtoHox, que poseia tres o cuatro genes ProtoHox.

5) El complejo ParaHox también presenta el fenómeno de la colinearidad: los genes ParaHox se expresan en el eje antero-posterior según su posición en el complejo(8). Aunque los genes ParaHox se expresan en territorios principalmente de origen endodérmico en el embrión de anfioxo, en contraste con los genes Hox, que lo hacen en tejidos de origen ectodérmico, la división de funciones de Hox y ParaHox es sujeto de discusión y controversia.

6) El origen de los complejos Hox y ParaHox por duplicación de un complejo ProtoHox primitivo no está datado, pero podría puede haber facilitado la Explosión Cámbrica, en la que aparecieron la mayoría de filums bilaterales actuales. Alternativamente, la duplicación del complejo ProtoHox podría haber coincidido con otros eventos clave de la evolución animal.

7) Hemos aislado recientemente varios genes Hox-like o huérfanos en anfioxo, presuntamente no pertenecientes a los complejos Hox y ParaHox

REFERENCIAS

1. Gerhart, J & Kirschner, M. (1998) *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 95, 8420-8427
2. Carroll. S. (1995) *Nature* 376, 479-485
3. Finnerty, J. R. & Martindale, M. Q. (1998). *Curr. Op. Gen. Dev.* 8, 681-687
4. Gee, H. (1994) *Nature* 370, 504-505
5. Garcia-Fernàndez, J. & Holland, P. W. H. (1994). *Nature* 370, 563-566

6. Holland, P. W. H., Garcia-Fernàndez, J, Williams, N. A. & Sidow, A. (1994). *Development (suppl.)*, 125-133.
7. Holland, P. W. H. & Garcia-Fernàndez, J. (1996). *Dev. Biol.* 173, 382-395
8. Brooke, N. M., Garcia-Fernàndez, J. & Holland, P. W. H. (1998). *Nature* 392, 920-922

CYCLOIDEA Y LA EVOLUCION DE LA ASIMETRIA FLORAL

Pilar Cubas[#], Jose Miguel Martínez Zapater[#], Rosemary Carpenter[&], Da Luo[&], y Enrico Coen[&]

#. Centro Nacional de Biotecnología. Campus UAM, Cantoblanco, 28049, Madrid.
&. John Innes Institute. Colney Lane. Norwich NR4 7UH. UK.

De acuerdo con su simetría, las flores pueden ser regulares (con simetría radial) o irregulares (con simetría bilateral). Es generalmente aceptado que las plantas angiospermas ancestrales tenían flores regulares. Las flores irregulares surgieron más tarde en la evolución de las angiospermas como una adaptación a ciertos tipos de polinización especializada. La distribución filogenética dispersa de los taxones con flores irregulares sugiere que la asimetría floral se originó varias veces independientemente.

Estamos estudiando algunos aspectos de la evolución de la asimetría floral. Por un lado, queremos saber qué genes son los responsables de la generación la asimetría floral y si en especies filogenéticamente distantes estos mecanismos genéticos se conservan. Por otro, queremos estudiar cuál era la función ancestral de estos genes antes de que fueran reclutados para generar flores asimétricas.

Para estudiar las bases genéticas y moleculares de la asimetría floral se ha elegido un sistema modelo, *Antirrhinum majus* (Scrophulariaceae), cuya flor tiene una marcada asimetría dorsoventral que afecta al tamaño y forma de pétalos y estambres. En *Antirrhinum* existen mutantes que afectan esta asimetría. Por ejemplo, dobles mutantes para los genes *cycloidea* (*cyc*) y *dichotoma* (*dich*) tienen flores radialmente simétricas en las que todos los pétalos y estambres son como los correspondientes órganos ventrales de las flores silvestres. Esto sugiere que *cyc* y *dich* juegan un papel fundamental en la generación de la asimetría floral de *Antirrhinum* (1). Los genes *cyc* y *dich*, que han sido clonados (2), se expresan en la región dorsal del meristemo floral de *Antirrhinum* desde los primeros momentos de su desarrollo. Estos genes codifican para dos proteinas estructuralmente relacionadas que tienen características de factores de transcripción. Posiblemente *cyc* y *dich* ponen en marcha un programa genético que genera las diferencias morfológicas de los órganos dorsales de la flor.

Para estudiar si *cyc/dich* tienen una función similar en otras especies con flores asimétricas hemos aislado y caracterizado genes similares a *cyc/dich* en especies progresivamente menos relacionadas filogenéticamente con *Antirrhinum.* Estas especies son: *Linaria vulgaris* (Scrophulariaceae), *Saintpaulia ionantha* (Gesneriaceae), *Schyzanthus sp* (Solanaceae), *Chrysanthemum sp*. y *Senecio vulgaris.* En el caso de *Linaria*, hemos establecido que *Lcyc* (el ortólogo de *cyc* en *Linaria*) juega un papel fundamental en la generación de la asimetría floral de esta especie. Además, hemos demostrado que un mutante natural de *Linaria*, con flores radialmente simétricas, es un mutante epigenético para el gen *Lcyc* en el que dicho gen esta densamente metilado (3). En el caso de *Senecio vulgaris*, hemos relacionado la función de otro gene similar a *cyc*, *Scyc*-8, con la presencia/ausencia de flores asimétricas en el capítulo.

Por último, para estudiar cuál era la función de los genes *cyc/dich* ancestrales que posteriormente se reclutaron para la generación de flores asimétricas, hemos aislado genes similares a *cyc/dich* en *Arabidopsis*, una especie con flores simétricas y muy alejada filogenéticamente de *Antirrhinum*. Hemos encontrado una pequeña familia de genes relacionados con *cyc/dich* uno de los cuales es posiblemente el ortólogo de *cyc*. Para elucidar la función de estos genes estamos aislando mutantes de algunos de ellos y estudiando su patrón de expresion durante el desarrollo (4). El aislamiento de un gen de maiz homólogo a *cycloidea, teosinte branched*-1, cuya función está relacionada con el control de la dominancia apical (5) y la caracterización en *Oriza sativa* de unos factores de transcripción similares a *cyc* (6) han arrojado una nueva luz al orígen y función de *cyc* durante la evolución.

Referencias

1. Carpenter, R. and Coen, E. .(1990). *Genes Dev*. **4**: 1483-1493.
2. Luo D. *et al*. (1996). *Nature* **383**: 794-799.
3. Cubas P., Vincent, C. Coen, E. (1999). *Nature*. (in press).
4. Cubas *et al*. (1999). *Plant J*. **18**: 215-222.
5. Doebley, J. Stec, A. And Gustus, L. (1997). *Nature*, **386**: 485-488.
6. Kosugi, S. And Ohashi, Y. (1997). *Plant Cell*. **9**:1607-1619.

DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LOS APÉNDICES DE ARTRÓPODOS

Sergio González-Crespo
Institut de Biologia Molecular de Barcelona
CSIC
C/. Jordi Girona, 18-26
08034 - Barcelona

Estudios anatómicos (1) y paleontológicos (2) sugieren que los apéndices de los Artrópodos pueden dividirse en dos regiones: una región proximal o base, originada evolutivamente como una expansión de la pared corporal, y una región distal que representa el apéndice propiamente dicho. En un Artrópodo primitivo cada una de estas regiones estaría formada por un único segmento y, durante el transcurso de la evolución, ambas habrían ido adquiriendo sucesivas articulaciones hasta alcanzar la estructura plurisegmental característica de los apéndices presentes en los Artrópodos actuales.

Utilizando como modelo el insecto *Drosophila*, recientemente hemos obtenido evidencias genéticas que apoyan la existencia de estos dos dominios en los apéndices. Además, hemos comprobado la existencia de una interacción antagónica entre los mecanismos genéticos responsables de la especificación de cada uno de dichos dominios. Experimentos adicionales realizados en el crustáceo *Artemia* sugieren que el modelo puede hacerse extensible a todos los Artrópodos.

En *Drosophila*, la formación de patrón y polaridad en el eje proximo-distal (P-D) de la pata está bajo control de la vía de señalización de Hedgehog (Hh) (3, 4, 5). Hh es una proteína difusible que se sintetiza en el compartimento posterior de los primordios de las patas e induce en las células anteriores la síntesis de dos nuevos productos difusibles, Decapentaplegic (Dpp) en la región dorsal y Wingless (Wg) en la región ventral, los cuales son capaces de actuar sinergísticamente. El sinergismo Dpp-Wg se distribuye en forma de gradiente a lo largo del eje P-D (6) con niveles máximos en la región central del primordio, precursora de la parte más distal de la pata, y niveles decrecientes hacia los precursores proximales.

El sinergismo Dpp-Wg confiere información posicional en el eje P-D regulando la expresión de genes diana importantes para la formación de la pata (6, 7). Un ejemplo de gen activado por altos niveles de Dpp-Wg es *Distal-less (Dll)* que codifica un producto con homeodominio que se expressa y se requiere en los elementos más distales de la pata. Otro ejemplo lo constituye *dachshund (dac)*, capaz de ser activado por niveles más bajos de Dpp-Wg en un dominio más proximal que el de *Dll*.

Nosotros hemos encontrado que el gen con homeodominio *extradenticle (exd)* interactúa de manera antagónica con la vía Dpp-Wg durante el desarrollo de la pata en *Drosophila*. La función del gen *exd* se requiere para la formación de los elementos más proximales en un dominio complementario al dominio definido por *Dll* y *dac* (8, 9). La actividad del producto proteico Exd se regula post-traduccionalmente mediante un mecanismo modulable de translocación nuclear (10, 11). Gracias a dicho

mecanismo, Exd se localiza en el interior de los núcleos de las células proximales -donde se requiere- y en el citoplasma de las células distales -donde es prescindible-.

Por una parte, la actividad de Exd nuclear en el dominio proximal es capaz de prevenir la activación de genes que responden a los niveles más bajos de Dpp-Wg, como por ejemplo *dac* (12). Recíprocamente, el sinergismo Dpp-Wg es capaz de evitar que Exd se transloque eficientemente al interior del núcleo, anulando así su actividad en el dominio distal. Esta regulación de Exd por Dpp-Wg se lleva a cabo en parte por el producto Dll, el cual inhibe la translocación nuclear de Exd (12).

Estos y otros datos sugieren que durante la evolución de los apéndices de los artrópodos, la vía Dpp-Wg ha ido controlando el desarrollo de la regiones distales que representan el apéndice propiamente dicho, mientras que Exd controla la región basal derivada de la pared corporal. La interacción antagónica entre ambos sistemas de regulación establece la distinción entre los dos dominios proximal y distal del eje P-D sin que participen mecanismos de restricción clonal (12).

Utilizando el modelo de ratón, hemos encontrado que el producto de un gen homólogo de *exd*, el proto-oncogén *Pbx1*, también se regula a nivel post-traduccional y que su patrón de localización nuclear en el primordio de las extremidades en el embrión de ratón es similar al de Exd en la pata de *Drosophila*. Ello sugiere que la división de los apéndices en dos dominios antagónicos definidos por la función *exd* y el sinergismo Dpp-Wg puede representar una característica general del desarrollo de las extremidades en los animales (12).

Con la finalidad de identificar nuevos genes involucrados en el desarrollo de los apéndices, estamos realizando un *screening* basado en la movilización en el genoma de *Drosophila* de un elemento P que codifica para el activador transcripcional GAL4 de levadura, el cual reconoce específicamente las secuencias UAS, también de levadura (13, 14). La combinación con otro transposón que lleva una construcción UAS-GFP (*Green Fluorescent Protein*) permite detectar patrones de expresión específicos dependientes del lugar de inserción del elemento GAL4. Cuando la GFP se estimula con luz UV (488 nm) emite luz visible de color verde (511 nm). La detección se lleva a cabo inspeccionando visualmente larvas y adultos vivos con una lupa binocular acoplada a un sistema de fluorescencia. El sistema permite además la clonación directa de secuencias genómicas flanqueantes al punto de inserción del elemento GAL4 mediante la técnica de rescate plasmídico, así como la generación de mutaciones por excisión imprecisa del elemento. Hasta el momento hemos identificado varias líneas con un patrón de expresión específico de los apéndices y estamos procediendo a su caracterización genética y molecular.

Referencias

1.- Snodgrass, R. E. Principles of Insect Morphology. McGraw-Hill. New York. 1935.

2.- Kukalová-Peck, J. Fossil history and the evolution of hexapod structures. In *The Insects of Australia*, 2nd ed. Cornell University Press. New York. 1991.

3.- Campbell, G., Weaver, T. & Tomlinson, A. Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of *wingless*, *decapentaplegic* and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* **74,** 1113-1123 (1993).

4.- Basler, K. & Struhl, G. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. *Nature* **368,** 208-214 (1994).

5.- Tabata, T. & Kornberg, T. Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76,** 89-102 (1994).

6.- Lecuit, T. & Cohen, S.M. Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388,** 139-145 (1997).

7.- Díaz-Benjumea, F.J., Cohen, B., & Cohen, S.M. Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* **372,** 175-179 (1994).

8.- González-Crespo, S. & Morata, G. Control of *Drosophila* adult pattern by *extradenticle*. *Development* **121,** 2117-2125 (1995).

9.- González-Crespo, S. & Morata, G. Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* **122,** 3921-3928 (1996).

10.- Mann, R. & Abu-Shaar, M. Nuclear import of the homeodomain protein Extradenticle in response to Wg and Dpp signalling. *Nature* **383,** 630-633 (1996).

11.- Aspland, S.E. & White, R.A.H. Nucleocytoplasmic localization of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in *Drosophila*. *Development* **124,** 741-747 (1997).

12.- González-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martínez-A. C., Mann, R. S. & Morata, G. Antagonistic interactions between *extradenticle* function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* **394,** 196-200 (1998).

13.- Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118,** 401-415 (1993).

14.- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. & Morata, G. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274,** 252-255 (1996).

COMPARACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS HOMOPROTEÍNAS DE LA FAMILIA IROQUOIS EN VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS

José Luis Gómez Skarmeta
Dep. Biología, Univ. Santiago de Chile

El desarrollo del sistema nervioso periférico del adulto de Drosophila se inicia mediante una cascada de regulaciones génicas. Los genes achaete (ac) y scute (sc) del complejo génico achaete-scute (C-AS) participan en una de las etapas finales de dicha cascada. Estos genes son esenciales para la formación del sistema nervioso. Su falta de función elimina órganos sensoriales (OS) y su exceso de función produce la aparición de elementos nerviosos extra. Por este motivo, estos genes se denominan proneurales (1). ac y sc se expresan en los discos imaginales, los tejidos precursores de gran parte de las estructuras adultas, con patrones idénticos y restringidos a diversos grupos de células, los grupos proneurales, que se encuentran en posiciones muy constantes y que prefiguran la disposición de los OS. Entre las células de los grupos proneurales se determinan las células precursoras de los órganos sensoriales. La expresión de ac/sc depende de elementos reguladores localizados a lo largo de C-AS y que dirigen la expresión de ambos genes en los distintos grupos proneurales (2). Se ha propuesto los distintos elementos reguladores responderían a una combinatoria de factores de transcripción codificados por el conjunto de genes denominados genes del prepatrón. El prepatrón estaría formado por factores de transcripción con expresiones espaciales en grandes dominios cuya combinatoria subdividiría un tejido en regiones más restringidas, y con ello permitiría posicionar la expresión de otros genes en lugares precisos. La caracterización de los genes araucan (ara) y caupolican (caup), miembros del complejo iroquois (C-IRO) en Drosophila, ha permitido comprobar la hipótesis de la existencia de un prepatrón. ara y caup son factores de transcripción de la familia de las homeoproteínas necesarios para activar la expresión ac/sc en determinadas regiones de los discos imaginales. Ambos genes tienen patrones de expresión idénticos en amplios dominios que incluyen mucho de los grupos proneurales. La activación de ac/sc por ara/caup esta mediada por la unión directa de las proteínas codificadas por estos genes a algunos de los elementos reguladores del C-AS. Dicha unión es necesaria in vivo, puesto que la eliminación del sitio de unión de ara/caup en un determinado elemento regulador anula la capacidad de éste para activar a los genes ac/sc (3).

El desarrollo del sistema nervioso en vertebrados se produce como consecuencia de un fenómeno denominado inducción neural. En los últimos años se han logrado avances importantes en la comprensión de parte de los mecanismos moleculares involucrados en dicha inducción neural. Así, se han identificado algunas de las moléculas con capacidad de inducir tejido neural en el ectodermo. Estas son la proteínas secretadas Noggin, Chordina, el inhibidor de activina Folistatina (revisado en 4). Sin embargo todos los esfuerzos se han centrado en la identificación de las moléculas inductoras y muy poco se sabe de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta a la inducción neural en el ectodermo.

Los genes de Xenopus que codifican homeoproteínas homólogas a las codificadad por los genes del C-IRO de Drosophila, Xiro1 y Xiro2 se coexpresan desde muy temprano (estadio 10) en una amplia región que abarca la mayor parte de la futura placa neural. Durante el desarrollo, esta región se subdivide en dos dominios a cada lado de la línea media de la placa neural así como en los regiones anteriores fuera de la placa neural. La expresión de Xiro1 y Xiro2 en el neuroectodermo precede y engloba totalmente los dominios de expresión del gen proneural XASH-3 (5) y parcialmente el de los genes proneurales ATH-3 y neurogenina (6, 7). Esto podría indicar que, al igual que en Drosophila, las homeoproteínas de la familia iro podrían estar regulando a los genes proneurales en Xenopus. De hecho, la sobreexpresión de los genes Xiro por medio de la injección de ARNm produce una expresión ectópica de los genes proneurales XASH-3, ATH-3 y neurogenina, así como una expansión de la placa neural similar a la producida por la sobrexpresión de XASH-3 y ATH-3. Por el contrario, la sobreexpresión de un RNA antisense de Xiro disminuye la placa neural y la expresión de los genes proneurales. Además,los genes iroquois de Xenopus están regulado por Noggin y ácido retinoico. Por último, al igual que los genes del C-IRO de Drosophila (8), la sobreexpresión en Xenopus del gen de Drosophila cubitus interruptus (ci), activa ectópicamente la expresión de los genes Xiro, lo que sugiere una activación de estos últimos por los homológos en Xenopus de ci. Apoyando esta idea, recientemente se han aislado dichos homólogos y se ha visto que uno de ellos, Gli2, tiene un patrón de expresión que engloba el territorio donde se expresan los genes Xiro (9). En conjunto, estos datos indican que los genes Xiro son genes intermediarios entre los inductores neurales y los genes de patrón. Además, al igual que ocurre en Drosophila, sugieren la existencia de un conjunto de factores de transcripción con patrones de expresión en amplios dominios (prepatrón) cuya combinatoria podría subdividir el neuroectodermo en regiones más pequeñas donde se activarían genes con patrones más definidos como son los genes proneurales. Por último, se demuestra así la conservación entre invertebrados y vertebrados de la cascada génica que determina el posicionamiento de los genes proneurales en dominios altamente restringidos (10).

Referencias:

1. Campuzano, S. y Modolell, J. (1992). Patterning of the Drosophila nervous system: the achate-scute gene complex. Trends Genet., 8, 202-207.
2. Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culí, J., Ferrés-Marcó, M. D., Beamonte, D. y Modolell, J. (1995). Cis-regulation of achaete and scute: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. Genes Dev., 9, 1869-1882.
3. Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E. , Ferrés-Marcó, D. y Modolell, J. (1996). araucan and caupolican, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. Cell, 85, 95-105.
4. Sasai, Y. and De Robertis, E. M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. Dev. Biol., 182, 5-20.

5. Turner, D. L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. Genes Dev. ,8, 1434-1447.
6. Takebayashi, K., Takahasi, S., Yokota, C., Tsuda, H., Nakanishi, S., Asashima, M. and Kageyama, R. (1997). Conversion of ectoderm into neuronal fate by ATH-3, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to Drosophila proneural gene atonal. EMBO J., 16,384-395.
7. Ma, Q., Kitner, C.and Anderson, D. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. Cell, 87, 43-52.
8. Gómez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J. (1996). araucan and caupolican provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the Drosophila wing. Genes Dev., 10, 2935-2946.
9. Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P. and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. Development, 124, 2537-2552.
10. J. L. Gómez-Skarmeta , A. Glavic, E. de la Calle-Mustienes, J. Modolell and R. Mayor (1998). XIRO, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois-complex genes, controls development at the neural plate. EMBO J., 17, 181-190.

4 / 01

DESARROLLO PRENATAL DE LOS OVOTESTES EN HEMBRAS FÉRTILES DE *TALPA OCCIDENTALIS*

Barrionuevo Jiménez, F.J., Burgos Poyatos, M., Zurita Martínez, F. y Jiménez Medina, R.
Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071 Granada, España. fjbarrio@goliat.ugr.es

En los topos del género *Talpa* las hembras poseen ovotestes en lugar de ovarios normales. Esta peculiaridad, única entre los mamíferos, convierte a estos insectívoros en un modelo de gran interés para el estudio del determinismo genético del sexo. Un paso previo imprescindible para abordar este caso es el análisis del desarrollo embrionario de estas gónadas. En este trabajo presentamos los resultados de un estudio llevado a cabo en embriones macho y hembra de la especie *T. occidentalis*. Los distintos embriones analizados se clasificaron en un total de nueve estadíos de desarrollo prenatal, cada uno de los cuales se caracteriza por una serie de rasgos morfológicos predeterminados.

Hasta en el estadío 4, las gónadas fetales de machos y de hembras son indiferenciables desde el punto de vista morfológico. Es entonces cuando la gónada masculina comienza la diferenciación sexual, mediante la aparición cordones testiculares macizos que engloban a las células germinales. Por el contrario, la gónada femenina parece no sufrir cambios aparentes hasta el estadio 7, excepto el aumento paulatino de tamaño y cierta polaridad en la densidad de células germinales. En el estadio 8, la región cortical es rica en células germinales y no está organizada en cordones, mientras que la región medular presenta cordones poco conspicuos. En el estadío 9, esta región medular (precursora de la porción testicular del futuro ovoteste) se rodea de una cápsula de tejido conectivo, mientras que en la región cortical aparecen cordones bien diferenciados con abundantes células germinales en proliferación, que aun no han entrado en meiosis.

4 / 02

UN PASO MÁS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL GEN *MBL* Y DE SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE *DROSOPHILA.*

García-Casado,M.Z.; Navarro, P.; Terol, J.; Pérez-Alonso,M.
Fac. CC. Biológicas. Universidad de Valencia
C/Doctor Moliner,50. Burjassot (Valencia)

Nuestro grupo está realizando la caracterización genética y molecular del gen *muscleblind (mbl).*Durante el desarrollo embrionario *mbl* es necesario para la formación de un patrón muscular correcto, en concreto para la formación de las bandas Z de los sarcómeros y las uniones indirectas del músculo a la epidermis. Por otro lado, el gen *mbl* también es requerido para la diferenciación tardía de los fotorreceptores.

Estudios preliminares mostraron que, durante el desarrollo embrionario y larvario, *mbl* se expresa en la musculatura somática y visceral, en el sistema nervioso central y en todos los discos imaginales. Dando un paso más en este sentido, se ha realizado un estudio en profundidad del patrón de expresión del gen en discos imaginales en distintos estadios del desarrollo. Para ello se han utilizado distintas técnicas de detección de proteínas y mRNA:

- tinción con el sustrato X-Gal
- técnicas inmunológicas con el anticuerpo anti-βgalactosidasa y el anticuerpo específico anti-mbl
- hibridación *in situ* con sondas de DNA

Los resultados de estos estudios implican posibles relaciones de *mbl* con algunas rutas de transducción de señal y genes conocidos tales como *stripe, Dmef2,* la ruta Ras, la ruta de las integrinas,..etc. Esto nos ha llevado a plantearnos el estudio de posibles interacciones directas o indirectas entre *mbl* y estos genes ya descritos lo que ayudará a conocer la posición de *mbl* en la cascada de regulación que controla la determinación muscular.

4 / 03

UNA HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DEL TEJIDO TESTICULAR DE LAS HEMBRAS DE *TALPA*

Jiménez Medina, R., Barrionuevo Jiménez, F.,
Zurita Martínez, F. y Burgos Poyatos, M.
Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, España. rjimenez@goliat.ugr.es

En los topos del género *Talpa* todas las hembras de las especies analizadas hasta el momento poseen ovotestes en vez de ovarios. Estas hembras son fértiles a pesar de la gran porción de tejido testicular anormal (sin células germinales) de sus gónadas. La ausencia de correlación negativa entre el número de folículos ováricos y el número de cordones testiculares permite descartar un origen basado en la transdiferenciación de tejido ovárico preexistente en tejido testicular.

Proponemos aquí una hipótesis alternativa basada en el modelo del gen *DSS/DAX1* para la determinación genética del sexo en mamíferos. Según este modelo, el gen determinante testicular *SRY* inhibiría la acción del gen *DAX1 (DSS)*, que sería a su vez un inhibidor de la cascada génica (MPGs) implicada en el desarrollo del tejido testicular. Además, cuando *DAX1* cesa su expresión, la represión de los MPGs sería asumida definitivamente por los oocitos ya diferenciados. Durante el desarrollo embrionario de las gónadas de topo, el inicio de la diferenciación ovárica (meiosis de las células germinales XX) se retrasa hasta después del nacimiento, y una gran porción del primordio gonadal (precursor del tejido testicular) queda desprovisto de células germinales. Por tanto, si la expresión de *DAX1* cesa en la gónada XX de topo coincidiendo con la entrada en meiosis de las células germinales tras el nacimiento, entonces la porción gonadal desprovista de oocitos, hasta entonces indiferenciada, comenzaría el desarrollo testicular en ausencia que cualquier tipo de inhibición de los MPGs.

4 / 04

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *FALSIFLORA*, EL ORTÓLOGO DE *FLORICAULA* Y *LEAFY* EN TOMATE

Jamilena, M., Molinero-Rosales, N., Capel, J., Lozano, R.
Departamento de Biología Aplicada. Área de Genética.
Universidad de Almería. 04120 Almería.

El gen *FLORICAULA* (*FLO*) de *Antirrhinum majus*, o su ortólogo *LEAFY* (*LFY*) en *Arabidopsis thaliana*, juegan un papel central en el inicio de la floración ya que determinan la identidad del meristemo floral. En esta comunicación, se presentará el clonaje y la caracterización molecular de *FALSIFLORA* (*FA*), el gen ortólogo a *FLO*/*LFY* en tomate. *FA* codifica para una proteína que comparte más de un 70% de identidad con *FLO* y *LFY*, y se expresa en todos los órganos aéreos de la plantas (vegetativos y reproductivos). Aunque los patrones de expresión del gen en el mutante *fa* son similares a los del genotipo salvaje, la región codificante de *FA* en el mutante presenta una deleción de 16 pb que daría lugar una proteína truncada en la región C-terminal, la región más conservada de la proteína en las distintas especies analizadas.

El efecto más importante de la mutación *fa* es la conversión del meristemo floral a meristemo vegetativo, originando una inflorescencia indeterminada en la que el lugar de las flores está ocupado por tallos vegetativos. La mutación altera además el tiempo de floración, produciendo un mayor número de hojas por debajo de las inflorescencias, y modifica la morfología de las hojas. De acuerdo con el patrón de expresión del gen y en base al fenotipo del mutante se concluye que el gen *FA* no sólo determina la identidad del meristemo floral sino que controla también el tiempo de floración y la morfogénesis de la hoja de tomate.

4 / 05

CONTROL GENÉTICO DEL TIEMPO DE FLORACIÓN EN TOMATE

Paredes, M.M., Jamilena, M., Molinero-Rosales, N., [1]Angosto, T., Lozano, R.
Departamento de Biología Aplicada (Área de Genética), y [1]Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Almería. 04120 Almería.

El conocimiento actual sobre el control genético del tiempo de floración se basa principalmente en estudios llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana*. El estudio de mutantes que florecen tardía o tempranamente bajo diferentes condiciones ha permitido la identificación de un conjunto de genes que promueven o reprimen la floración ya sea de forma constitutiva o en respuesta a determinados factores medioambientales.

Nuestro grupo de investigación lleva ya algunos años intentando ampliar este estudio a una planta de gran interés agronómico como es el tomate. En la presente comunicación se analiza el tiempo de floración en cinco mutantes monogénicos de tomate, *single flower truss*, *uniflora*, *blind*, *pistillate* y *falsiflora*, bajo dos condiciones controladas de fotoperiodo. Los cinco mutantes muestran un retraso apreciable en el tiempo de floración y un mayor número de hojas por debajo de la primera y sucesivas inflorescencias, tanto en día largo como en día corto. Aunque el tomate se ha venido considerando una especie de día neutro, cuatro de los mutantes analizados (*uniflora*, *blind*, *pistillate* y *falsiflora*) así como sus respectivos fondos genéticos han demostrado ser sensibles a fotoperiodo, floreciendo antes y produciendo menor número de hojas por debajo de las inflorescencias en condiciones de día largo. Además del retraso en el tiempo de floración, las cinco mutaciones estudiadas alteran el desarrollo reproductivo de la planta, de tal forma que en *uniflora* y *blind*, el número de flores en la inflorescencia se reduce a una o dos por inflorescencia mientras que en *single flower truss*, *pistillate* y principalmente en *falsiflora*, la inflorescencia presenta un gran potencial vegetativo. Se discute el papel funcional de los genes alterados por estas mutaciones durante la transición floral y el desarrollo de la inflorescencia de tomate.

4 / 06

ANÁLISIS GENÉTICO DEL DESARROLLO FLORAL EN *PISUM SATIVUM*

Navarro Solaz, C. ; Ferrándiz Maestre, C ; Madueño Albi, F. ; Beltrán Porter, J.P.
IBMCP. UPV-CSIC. Departamento de Biología del Desarrollo. UPV. Camino de Vera s/n. 46022 - Valencia.
email=cnavarro@ibmcp.upv.es

El estudio de los procesos de iniciación de la floración y morfogénesis floral ha experimentado un desarrollo muy importante en los últimos años ; el análisis genético y molecular en Antirrhinum majus y Arabidopsis thaliana ha conducido al establecimiento del modelo ABC de organogénesis floral y a la identificación de algunos genes de la familia MADS como responsables de este proceso.

Las flores de guisante (Pisum sativum) presentan una ontogenia drásticamente distinta de la de los sistemas citados anteriormente ; la principal diferencia consiste en la existencia de primordios comunes, que posteriormente diferencian los primordios de pétalos y estambres, poniendo de manifiesto la existencia de un sistema genético de regulación más complejo.

Hemos estudiado en profundidad la ontogenia de distintos mutantes homeóticos de guisante con el fin de analizar la implicación de las funciones A, B y C en la correcta diferenciación de los primordios comunes, así como las posibles interacciones entre ellas mediante la obtención de dobles mutantes. Por otra parte, hemos aislado ocho miembros de la familia MADS de guisante (pm1 a pm8), tres de ellos pueden ser considerados ortólogos de genes de identidad de órganos clase A, B y C, por homología de secuencia y patrón de expresión. Se hayan en proceso los análisis para comprobar si existe alguna correlación entre dichos genes y los mutantes homeóticos estudiados.

4 / 07

COMPARATIVE ANALYSIS OF MALE REPRODUCTIVE-TRACT ESTERASES: HOW SEX-SPECIFIC EXPRESSION PATTERNS ARE STRUCTURALLY COMPARTMENTALIZED AND ASSIMILATED DURING EVOLUTION

Torrado, M., Paz, M., *Korochkin, L.I., Mikhailov, A.T.
Institute of Health Sciences, University of La Coruña, As Xubias s/n, La Coruña 15006, Spain and *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova Str. 34, Moscow 117808, Russia; email: margot@udc.es

In sexually reproducing animals, gonad accessory glands (i.e., ejaculatory bulbs, seminal vesicles, epididymis, etc.) are novelties that arose during evolution of the male reproductive tract. Our previous studies demonstrate the over-expression of carboxylesterases, such as male-associated polypeptide (MAP) and esterase S, in the testicular tissue and gonad ducts of *Mytilus galloprovincialis* and in the ejaculatory bulb of *Drosophila virilis*, correspondingly. Using esterase S as a consensus sequence, we performed the multiple alignment of sequences from male-specific carboxylesterase genes identified in different animal groups. Significant homologies not only in the region of the putative active center but also in other domains of insect, avian and mammalian carboxylesterases were detected. Then we have been interested in studying the spatial patterning of esterase expression in the reproductive-tract system of invertebrates and mammals, including humans. Our analysis revealed: (1) the unexpected high degree of immunochemical similarity between mussel MAP and *Drosophila* esterase S, and certain polypeptides detected in sea urchin, pig and human reproductive-tract tissues/fluids, (2) the spatial shift tendency of predominant esterase expression from testis-associated somatic cells (bivalves) to accessory sex glands and efferent gonad ducts (fruitflies), and (3) the high accumulation of carboxylesterases in the seminal fluid/plasma and ejaculates (bivalves, fruitflies, humans). The results suggest that redeployment of pre-existing expression patterns (i.e., MAP distribution in all parts of the male mussel gonad) can be used as a general strategy contributing to the spatial carboxylesterase patterning in the male reproductive tract of other animal groups according to its new structural organization and function.

4 / 08

DETECCION SIMULTANEA DE LA EXPRESION DE VARIOS GENES EN ORGANOS DE *Arabidopsis thaliana*

Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., y Micol, J.L.
División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante

La visualización de la expresión génica es un procedimiento usual en muchos estudios fisiológicos y del desarrollo. Aunque la detección de la actividad transcripcional ha sido tradicionalmente llevada a cabo mediante análisis de Northern, esta técnica está siendo progresivamente sustituida por la de retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), que resulta más sensible y menos laboriosa.

Hemos desarrollado un método de RT-PCR múltiple para la visualización simultánea de la expresión de varios genes en órganos de la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*. La técnica está basada en la síntesis indiscriminada de ADNc monocatenario, mediante retrotranscripción con hexanucleótidos aleatorios, seguida de la coamplificación de nueve mensajes distintos. La mezcla de RT-PCR múltiple contiene nueve parejas de cebadores, cada una de las cuales incluye uno marcado con un fluorocromo. Estos oligonucleótidos fueron diseñados de modo que permitiesen la distinción entre la amplificación de ADN genómico y la de ADNc. Los productos de la RT-PCR múltiple, que se cargan en una única calle de un gel de poliacrilamida, son sometidos a electroforesis en un secuenciador automático y discriminados por un programa de análisis de fragmentos.

Este método nos ha permitido determinar la presencia de transcritos en muestras tan pequeñas como una sola hoja o flor. Se trata de una técnica muy sensible, ya que la mayoría de los mensajeros estudiados, que cifran factores de transcripción de las familias MADS y AP2/EREBP, están presentes en un número de copias por célula muy reducido. La hemos empleado para el estudio de mutantes en los que se desreprimen ectópicamente en la hoja algunos genes homeóticos cuya función silvestre es dotar de identidad a los órganos florales.

4 / 09

EXPRESSION OF THE FROG LIM HOMEODOMAIN PROTEIN, XLIM-1, IN THE NERVOUS AND REPRODUCTIVE TISSUE OF BIVALVE MOLLUSKS

Mikhailov, A.T. and Torrado, M.
Institute of Health Sciences, University of La Coruña, As Xubias s/n, La Coruña 15006, Spain; e-mail: margot@udc.es

LIM homeodomain proteins regulate expression of genes that pattern the body axis and specify cell fates in invertebrates and vertebrates. It is especially interesting that in mammals LIM proteins are expressed in the nervous and uro-genital organ systems. In bivalves, it has been hypothesized that factors derived from the nervous tissue play an essential role in the regulation of reproduction. Using rabbit antibodies obtained against the glutathione S transferase - C-terminal part of Xenopus laevis LIM-1 (anti-XLIM-1), we have analyzed the expression of this protein in different tissues of bivalve mollusk, Mytilus galloprovincialis, with the aid of SDS-PAGE (followed by Western blot) and immunocytochemistry. Positive immunoblot cross-reactivity was detected in nervous ganglia (pedal ganglia) but not in gills and muscle tissues. Anti-XLIM-1 staining of pedal ganglion sections showed clearly positive cell nucleus localization. XLIM-1- like polypeptide was also found in the gonad tissue of both sexes and unfertilized oocytes being absents in sperm cells. In M. galloprovincialis, a typical 72-kDa LIM-1-like polypeptide (that was also detected in chick embryo brains) is expressed in fertilized oocytes, but not in early embryos. Poly A+ RNA was isolated from M. galloprovincialis pedal ganglia and used in PT-PCR for cDNA synthesis followed by PCR amplification with a set of sense and antisense XLIM-1 primers. The preliminary data obtained indicate to a high sequence homology between bivalve mollusk and X.laevis LIMs. We are grateful to Prof. I. Dawid and Dr. A. Karavanov (NIH, Bethesda) for the gift of anti-XLIM-1 antibodies, help in RT-PCR experiments and comments about this work.

4 / 10

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE *STAMENLESS*, UN GEN HOMEÓTICO IMPLICADO EN EL DESARROLLO DE PÉTALOS Y ESTAMBRES EN TOMATE

Lozano, R., Gómez, P., Capel, J., Jamilena, M., Zurita, S. y Angosto, T. [#]
Dpto. de Biología Aplicada (Unidad de Genética) y [#] Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería

La caracterización genética y morfológica del mutante *stamenless* (*sl*) de tomate nos ha permitido confirmar su naturaleza semidominante y homeótica, en cuyo fenotipo se observa la transformación completa de estambres en carpelos y el desarrollo de pétalos con características sepaloideas. Características similares muestran los mutantes *deficiens* de *Antirrhinum majus* y *apetala3* de *Arabidopsis thaliana*, especies en las que han sido clonados y caracterizados los genes responsables de dichas mutaciones. Ambos genes pertenecen a la familia MADS y codifican para factores de activación transcripcional que controlan el desarrollo floral. En base a ello, y siguiendo una estrategia PCR basada en la homología de secuencia de la caja MADS, hemos clonado el gen *Le-DEF* de tomate, cuya caracterización molecular confirmó su homología con los genes *DEF* y *AP3*. Además hemos aislado dos alelos mutantes del gen; el primero causado por una deleción en el intrón 5 que promueve el procesamiento alternativo del sexto exón y con ello, la aparición de una forma truncada de la proteína. El segundo alelo, identificado en el mutante *stamenless*, presenta una mutación en una diana *Eco* RI de la región promotora. Los análisis de expresión mediante Northern blot e hibridación *in situ* indican que la mutación *sl* altera la expresión de *Le-DEF* en las etapas iniciales del desarrollo floral. Además, el análisis genético de una población segregante demuestra que el locus *SL* se encuentra estrechamente ligado al gen *Le-DEF*. Considerados conjuntamente, estos resultados sugieren que el gen clonado se corresponde con el gen *STAMENLESS* de tomate, cuya función se requiere para el correcto desarrollo de pétalos y estambres.

workshop
organización y comparación
de genomas

MAPAS Y COMPARACIÓN DE GENOMAS EN FRUTALES DE LA FAMILIA DE LAS ROSÁCEAS

P. Arús
IRTA-Departamento de Genética Vegetal, 08348 Cabrils

Sumario

Algunas de las más importantes especies frutales de las regiones templadas, como las incluidas dentro del género *Prunus* (melocotonero, albaricoquero, ciruelo, cerezo y almendro), *Malus* (manzano) y *Pyrus* (peral) forman parte de la familia de las rosáceas. Todas ellas son especies leñosas, por lo que algunas de sus características como el largo período intergeneracional y el gran tamaño de cada individuo, son poco favorables tanto para los estudios genéticos clásicos como para la eficiencia de su mejora genética.

El uso de los marcadores moleculares, ha significado un gran avance en el conocimiento genético de estas especies, con la construcción de mapas de ligamiento y la localización en estos de genes mayores y QTLs. La mejora ayudada por marcadores es particularmente interesante en cultivos leñosos, ya que se puede seleccionar en estado de plántula para caracteres que no se expresarán hasta 2-5 años más adelante, por lo que el ahorro de tiempo y espacio es muy elevado.

A continuación trataré de resumir el trabajo realizado por nuestro grupo del IRTA en marcadores en almendro y melocotonero, así como el realizado en colaboración con otros equipos de investigación dentro de un proyecto de la Unión Europea que acabó recientemente y en el que intervinieron grupos franceses (INRA de Burdeos y Orleans), italianos (ISF-Roma), británicos (HRI-East Malling) y españoles (CIMA-Arkaute).

Uno de los primeros objetivos del proyecto europeo fue le construcción de un mapa saturado para *Prunus*, lo que se realizó con una población F_2 interespecífica obtenida del cruzamiento entre almendro ('Texas') y melocotonero ('Earlygold'). El mapa se elaboró con 250 marcadores (235 RFLPs, 11 isoenzimas y 2 caracteres morfológicos). Todos ellos se localizaron en 8 grupos de ligamiento (x = 8 en *Prunus*), cubriendo una distancia total de 491 cM, lo que representa una densidad promedio de 2.0 cM/marcador. Los marcadores más separados en el mapa estaban a una distancia de 12 cM. El mapa puede por tanto considerarse saturado y se usó como referencia para la confección de otros mapas. Recientemente este mapa se ha incrementado con un centenar más de RFLPs obtenidos con sondas correspondientes a secuencias expresadas (ESTs) de *Arabidopsis* con una homología elevada con las del arroz.

Cuando se dispone de un mapa detallado como el que hemos elaborado en *Prunus*, es posible seleccionar marcadores, segregando en otra población de interés y que cubran la mayor parte del genoma a intervalos de 10-25 cM. Con un mapa de este tipo, que en *Prunus* puede obtenerse con 40-50 marcadores, se puede localizar la posición de

los genes o QTLs que segreguen en esta población, y una vez situados en el mapa, se pueden usar otros marcadores de la misma región para localizar alguno de ellos en las proximidades del gen estudiado. Dentro del proyecto europeo se construyeron nueve mapas (dos en almendro, tres en melocotonero, dos en cerezo, y dos en ciruelo) con esta estrategia. En total nuestro grupo ha producido tres: dos a partir de los cruzamientos intraespecíficos de almendro, 'Ferragnès' x 'Tuono' que contiene 183 marcadores (120 RFLPs, 56 RAPDs y 7 isoenzimas) y 'Felisia' x 'Bertina' con 84 marcadores (79 RFLPs y 5 RAPDs), y uno con una F_2 interespecífica almendro (cv. Garfi) x melocotonero (cv. Nemared) en la que se localizaron 51 marcadores (46 RFLPs y 5 isoenzimas). En este último cruzamiento fue posible detectar la existencia de una translocación recíproca entre los dos parentales sobre la base de la evidencia obtenida de los datos de ligamiento, de la viabilidad del polen y del análisis citogenético en la F_1.

La construcción de mapas con RFLPs e isoenzimas permite identificar marcadores homólogos en diferentes mapas y comparar su posición. En nuestro caso, pudimos comparar en detalle los mapas obtenidos en poblaciones de almendro x almendro (2), almendro x melocotonero (2) melocotonero x melocotonero (2) y melocotonero x *P. davidiana* (1). Los resultados de estas comparaciones indicaron una identidad prácticamente total en lo que respecta al orden de los loci dentro de cada grupo de ligamiento, y una gran similaridad en cuanto a distancias genéticas en los cruzamientos en los que intervino el almendro, aunque las distancias fueron significativamente mayores en el caso de los mapas elaborados en cruzamientos solamente con genotipos de melocotonero. La comparación entre los mapas de almendro y melocotonero y los de cerezo fueron solamente parciales, y en ellos fue posible observar un alto grado de homología entre mapas, aunque se detectaron también algunas discrepancias.

Se pudo comparar también el mapa del manzano y el de *Prunus*. Los 32 loci en común entre los dos mapas permitieron estudiar en detalle 3 grupos de ligamiento pudiéndose observar una clara homología entre los mapas de ambas especies. Por el contrario, la comparación entre los mapas de *Arabidopsis* y *Prunus* usando 98 loci homólogos no permitió detectar zonas del genoma conservadas entre ambos genomas.

En los mapas construidos en poblaciones de diferentes especies de *Prunus* se localizaron un total de 20 genes mayores. Usando los marcadores comunes entre estos mapas y el mapa saturado fue posible ubicarlos a todos en este último. Algunos de estos genes, como las resistencias al oídio y a nemátodos, las características del fruto como acidez, vellosidad o forma, las de la almendra como la dureza de la cáscara, o las relacionadas con la flor como la autoincompatibilidad y la época de floración, tienen un valor económico elevado. Otros caracteres de interés genético, como los referentes a la coloración antociánica de hojas, flores y anteras, están determinados cada uno por un gen distinto, localizado en un cromosoma diferente, y sin epistasia.

Se analizaron también un conjunto de caracteres cuantitativos (en total 97), referidos a aspectos de la floración (época, intensidad, duración, etc.), fructificación,

producción, varios caracteres del fruto (aspecto, peso y contenido en diversos componentes orgánicos), resistencias a enfermedades y un variado conjunto de caracteres vegetativos. En 72 de estos caracteres se encontraron QTLs responsables de una parte de su variación y pudieron ser localizados en los mapas construidos. Para la mayor parte de los caracteres estudiados se encontró un número pequeño de QTLs, normalmente entre 2 y 4. Muchos de los QTL detectados tuvieron un efecto importante sobre el carácter estudiado. Alrededor de una tercera parte de ellos tenían un efecto mayor al 25% de la varianza fenotípica total, lo que tiene implicaciones de gran importancia en mejora ya que con el uso de pocos marcadores sería posible obtener una importante ganancia en caracteres tradicionalmente considerados como cuantitativos y que se seleccionan después de determinaciones difíciles, lentas y dependientes del medio ambiente.

CURRENT STATUS OF GRASS COMPARATIVE GENETICS

Katrien M. Devos & Mike D. Gale
John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK

BACKGROUND

Comparative genome research using molecular marker techniques was initiated some 15 years ago, and has greatly contributed to our knowledge on the relationships of genomes of closely and more distantly related species. Mapping of heterologous RFLP probes that identified conserved sequences across tribes, and even beyond, allowed not only the identification of chromosome regions that were homoeologous between different species, but also led to an assessment of the extent of gene order conservation. Although comparative genetic maps are now available in eudicotyledonous as well as monocot plant families, the grass family is still the best characterised.

Within the Triticeae tribe, the comparative mapping work complemented and lent precision to discoveries made by chromosome substitution and pairing analyses. Hexaploid wheat, *Triticum aestivum* ($2n = 2x = 42$), was known to have undergone complex chromosomal rearrangements, involving chromosomes 4A, 5A and 7B (Naranjo et al. 1988; Liu et al. 1992). Detailed marker analysis of these chromosomes and their homoeologues revealed their precise composition and indicated that at least two reciprocal translocations had taken place during the evolution of hexaploid wheat. A translocation between chromosome arms 4AL and 5AL took place at the diploid level, while a second translocation involving chromosome arms 4AL and 7BS occurred in tetraploid wheat. Chromosome 4AL further underwent both a pericentric and paracentric inversion (Devos et al. 1995).

Following the study of the relationships of the A, B and D genomes in polyploid wheat, comparative genetic mapping was extended to wheat relatives such as rye (Devos et al. 1993), barley (Laurie et al. 1993; Dubcovsky et al. 1996) and *Aegilops umbellulata* (Zhang et al. 1998). Pairing studies provided information on the homoeologous relationships of *Ae. longissima* (Naranjo 1995) and *Ae. speltoides* (Maestra and Naranjo 1998). The number of rearrangements observed relative to the D genome of wheat varied from none in *Ae. speltoides* to 11 in *Ae. umbellulata* (Fig.1).

A comparison of the phylogeny of different Triticeae species with the number of rearrangements that differentiate them from the D genome of *Ae. tauschii* (Fig.1) indicates that time is not the only factor determining the number of evolutionary translocations during speciation. Some species clearly accumulate and fix rearrangements more quickly than others. It seems unlikely that this is influenced by the breeding system as rearrangements can vary from few to many in both inbreeding and outcrossing species.

Beyond the Triticeae tribe

Comparisons at the map level

Many of the agriculturally important food crops, such as rice, maize and wheat, belong to the grass family (Fig.2). Despite large differences in DNA content - ranging from, for example, 400 Mb in rice to 17,000 Mb in wheat - and varying basic chromosome numbers - 12 in rice and 7 in wheat - gene sequences are largely conserved across the grass family, in contrast to intergenic sequences which evolve faster and tend to be more species-specific (Chen et al. 1998). Therefore, a common set of genes, or anchor probes, can be used to genetically map a range of cereal crops, which leads to an understanding of the relationships between genomes.

Comparative mapping within and between the Pooideae, Oryzoideae and Panicoideae subfamilies has demonstrated a high level of gene order conservation, despite divergence times as long as 60 million years. Based on the comparative genetic maps of rice, foxtail millet, sugar cane, sorghum, pearl millet, maize, the Triticeae cereals and oats, it was possible to identify groups of genes, termed 'linkage blocks', that were colinear across the grasses. The representation of each species' genome as an assembly of linkage blocks displayed not only the regions of homoeology, but also the rearrangements that had taken place since their divergence from a common ancestor (Fig.3; for overview see Gale and Devos 1998). Rice, *Oryza sativa* ($2n = 2x = 24$; C=0.4 pg), and foxtail millet, *Setaria italica* ($2n = 2x = 18$; C=0.45 pg), two cereal crops with a small genome size, were differentiated at the map level mainly by the fusion of rice chromosomes 7 and 9 to form foxtail millet chromosome II, 3 and 10 to form foxtail millet chromosome IX, and 5 and 12 to form foxtail millet chromosome III (Fig.3). The first two arrangements also characterised other species within the Panicoideae subfamily. Pearl millet, *Pennisetum glaucum* ($2n = 2x = 14$), a species that is taxonomically closely related to foxtail millet, displayed a large number of rearrangements relative to rice, most of which were specific to pearl millet and must thus have taken place since the divergence of pearl and foxtail millet (Devos et al. 1999).

Duplications

The presence of chromosomal duplications can confound the interpretation of comparative data. In rice, a duplication between the distal regions of the short arms of chromosomes 11 and 12 has been identified (Nagamura et al. 1995). The same duplication was found between foxtail millet chromosomes VII and VIII (Devos et al. 1998), and pearl millet linkage groups 1 and 4 (Devos et al. 1999). Therefore, this duplication must have occurred early in the evolution of the grasses before the divergence of the Oryzoideae and Panicoideae species.

Comparisons at the micro-level

With a view to using small genomes, such as those of rice and sorghum, as a vehicle for gene isolation in larger genome species, such as wheat, barley and maize, several researchers have physically mapped and sequenced homoeologous regions across grass species (Chen et al. 1997; Chen et al. 1998; Foote et al. 1997; Kilian et al.

1997). It can be concluded from these studies that genes and gene orders are generally highly conserved at the microlevel, and that intergenic sequences evolve faster. However, even in regions of high colinearity, it is likely that one or more markers have been transposed, deleted or duplicated. Therefore, the potential of cross-species gene isolation remains unknown

Beyond the grass family

The prospect of having the complete genomic sequence of *Arabidopsis thaliana* available by the year 2000, prompted the question whether, and to what extent, arabidopsis sequence can be exploited in cereal research. Paterson et al. (1996) predicted that 43 to 58 % of tracts ~ 3 cM should have remained conserved between monocotyledonous and eudicotyledonous species over the 130-240 million years that separate these plant groups. To establish whether gene orders had indeed remained conserved over smaller genetic distances, genes from the same BAC and from BACs spaced over two small (~ 3 cM) regions at the top of arabidopsis chromosomes 1 were selected for a rice - arabidopsis comparative study (K.M. Devos, in preparation). The high level of sequence divergence between monocot and eudicot genes excluded the use of cross-mapping as a general methodology for comparative analysis between rice and arabidopsis. Therefore, putative rice orthologues of arabidopsis genes were identified through BLAST searches, and mapped in rice. The difficulties encountered in selecting true orthologues rather than domain homologies or different members of a gene family complicated the interpretation of the comparative data. Nevertheless, the failure to find homoeologous regions in rice corresponding to the top of arabidopsis chromosome 1 suggested that gene orders between arabidopsis and rice had strongly eroded. Although conserved regions may still exist in other parts of the arabidopsis genome, or may be identifiable at the DNA sequence level, it is unlikely that the extent of synteny will be sufficient for map-based applications.

Lack of colinearity does not preclude homology-based exploitation of arabidopsis genes. This strategy has the highest chance of success for traits that are controlled by single genes that are orthologous in arabidopsis and the monocot target species, and will usually require a thorough knowledge of the physiology or biochemistry of that trait. This was the case for the gibberillin insensitive dwarf phenotypes in arabidopsis and wheat, conferred by the *GAI* and the *Rht-1* genes, respectively. *GAI* was successfully employed to isolate the agronomically important *Rht-1* orthologues in wheat, which formed the basis of the Green Revolution in wheat in the 1960s (Peng et al. 1999).

The future

With the availability of a wealth of information on genome relationships, the focus of plant genome research is shifting towards gene isolation and functional analysis. This is greatly aided by the development of new tools such as high throughput sequencers and micro-array technology (Brown and Botstein 1999), the generation of large numbers of expressed sequenced tags (ESTs), and the implementation of new data

management, display and analysis programs. Rice sequencing has started in Japan, China and Korea, and will commence shortly in the USA, while funding is still being sought in Europe. In addition to elucidating the genome organisation of this small genome cereal, rice genomic sequence will provide a ready supply of candidate genes for agronomic traits in any cereal, and form the basis for gene expression studies. All genomics research will need to be underpinned by a user-friendly data management and interpretation system. Therefore, the development of a good bioinformatics infrastructure will be crucial to the success of plant genomics.

Reference

Brown PO, Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nature Genet 21:33-37

Chen M, SanMiguel P, Bennetzen JL (1998) Sequence organisation and conservation in *sh2/a1*-homologous regions of sorghum and rice. Genetics 148:435-443

Chen M, SanMiguel P, de Oliveira AC, Woo SS, Zhang H, Wing RA, Bennetzen JL (1997) Microcolinearity in *sh2*-homologous regions of the maize, rice and sorghum genomes. Proc Nat Acad Sci 94:3431-3435

Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Harcourt RL, Koebner RMD, Liu CJ, Masojc P, Xie DX, Gale MD (1993) Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. Theor Appl Genet 85:673-680

Devos KM, Dubcovsky J, Dvorák J, Chinoy CN, Gale MD (1995) Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination. Theor Appl Genet 91:282-288

Devos KM, Sorrells ME, Anderson JA, Miller TE, Reader SM, Lukaszewski AJ, Dubcovsky J, Sharp PJ, Faris J, Gale MD (1999) Chromosome aberrations in wheat nullisomic-tetrasomic and ditelosomic lines. Cereal Res Commun (in press)

Devos KM, Wang ZM, Beales J, Sasaki T, Gale MD (1998) Comparative genetic maps of foxtail millet (*Setaria italica*) and rice (*Oryza sativa*). Theor Appl Genet 96:63-68

Dubcovsky J, Luo M-C, Zhong G-Y, Bransteitter R, Desai A, Kilian A, Kleinhofs A, Dvorák J (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. Genetics 143:983-999

Foote T, Roberts M, Kurata N, Sasaki T, Moore G (1997) Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Ph1* locus in wheat. Genetics 147:801-807

Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. Proc Natl Acad Sci 95:1971-1974

Kellogg EA, Appels R, Mason-Gamer RJ (1996) When genes tell different stories: the diploid genera of Triticeae (Gramineae). Syst Bot 21:1-17

Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B, Kleinhofs A (1997) Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. Plant Mol Biol 35:187-195

Laurie DA, Pratchett N, Devos KM, Leitch IJ, Gale MD (1993) The distribution of RFLP markers on chromosome 2(2H) of barley in relation to the physical and genetic location of 5S rDNA. Theor Appl Genet 87:177-183

Liu CJ, Devos KM, Chinoy CN, Atkinson MD, Gale MD (1992) Non-homoeologous translocations between group 4,5 and 7 chromosomes in wheat and rye. Theor Appl Genet 83:305-312

Maestra B, Naranjo T (1998) Homoeologous relationships of *Aegilops speltoides* chromosomes to bread wheat. Theor Appl Genet 97:181-186

Nagamura Y, Inoue T, Antonio BA, Shimano T, Kajiya H, Shomura A, Lin SY, Kuboki Y, Harushima Y, Kurata N, Minobe Y, Yano M, Sasaki T (1995) Conservation of duplicated segments between rice chromosomes 11 and 12. Breed Sci 45:373-376

Naranjo T (1995) Chromosome structure of *Triticum longissimum* relative to wheat. Theor Appl Genet 91:105-109

Naranjo T, Roca A, Goicoechea PG, Giraldez R (1988) Chromosome structure of common wheat: Genome reassignment of chromosomes 4A and 4B. Proceedings 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge 1:115-120

Paterson AH, Lan T-H, Reischmann KP, Chang C, Lin Y-R, Liu S-C, Burow MD, Kowalski SP, Katsar CS, DelMonte TA, Feldmann KA, Schertz KF, Wendel JF (1996) Toward a unified genetic map of higher plants transcending the monocot-dicot divergence. Nature Genet 14:380-382

Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP (1999) 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin reponse modulators. Nature (in press)

Zhang H, Jia J, Gale MD, Devos KM (1998) Relationship between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. Theor Appl Genet 96:69-75

ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL GENOMA DE *Saccharomyces cerevisiae*

José E. Pérez Ortín
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València.

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el año 1995 se publicaron las primeras secuencias completas de genomas (o genomios) de células procarióticas. En 1996 se publicó la del primer organismo eucariótico: la levadura *S. cerevisiae*. A partir de ese momento toma carta de naturaleza una nueva ciencia que, hasta entonces, carecía de un objeto completo de estudio, la Genómica. Hoy en día se han secuenciado ya varias decenas de genomas de procariotas y, al menos, otro eucariota.

Con las secuencias completas de los genomas ya es posible tener una visión globalizadora de ciertos temas que, hasta ahora, solo eran entrevistos a partir de datos parciales. La Genómica se ocupa por un lado del estudio organizativo y estructural de los genomas y, por otro, de los aspectos funcionales. Tanto los relacionados con los genes como unidades de información como de los relacionados con otros aspectos dinámicos de los genes u otros elementos genéticos.

La Genómica utiliza herramientas cedidas por la Biología Molecular, a la que ha exigido el desarrollo de nuevas técnicas de objetivos globalizadores, y también hace un uso extenso de la Bioinformática, a la que el crecimiento exponencial de la información generada ha planteado nuevos retos.

En mi grupo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València estamos trabajando en estos últimos años en la Genómica de la levadura en colaboración con distintos grupos europeos utilizando diferentes enfoques y tecnologías. A continuación expongo brevemente tres de las líneas de investigación que llevamos a cabo.

Estudio *in silico* de la región 3' de genes de levadura

Los procesos de poliadenilación de mRNAs y de terminación de la transcripción han sido ampliamente estudiados en levadura (1). Sin embargo el bajo número de genes estudiados y la disparidad de resultados encontrados hacen que no se pueda hablar todavía de unas secuencias consenso para el proceso de formación del extremo 3' de los mensajeros.

Nosotros hemos realizado, en colaboración con el Dr. J. van Helden, un estudio estadístico de la presencia de secuencias consenso de diferentes longitudes en el flanco 3' de todas las ORFs identificadas en levadura y en un banco de datos de secuencias EST. Se ha encontrado que ciertas secuencias están sobrerepresentadas en las regiones 3' no codificantes de los genes y mRNAs y que adoptan perfiles de distribución a lo largo de esas regiones no aleatorios y característicos. En concreto

secuencias del tipo T/A alternante de entre 5 y 8 bases están presentes en un alto porcentaje de los genes y se sitúan preferentemente a 30-40 nucleotidos detrás del triplete stop y a unos 40 antes del sitio de corte y poliadenilación. Este tipo de secuencias ya había sido experimentalmente descrito como Elementos de Eficiencia (EE) de la poliadenilación de mensajeros (1). En un número menor de casos, pero también significativo, se han encontrado secuencias ricas en A (tipo AAAATA) en una posición predominantemente 20 nucleotidos después del EE y otras ricas en T (tipo TTTTTT) en la zona que rodea al sitio de poliadenilación. La función de estos dos últimos tipos de secuencias no es conocida aunque el primer tipo coincide aproximadamente con los llamados Elementos de Posicionamiento (PE). El último tipo podría tener relación con la elección precisa del punto de corte y poliadenilación. En base a nuestros resultados y a otros experimentales, previamente conocidos, proponemos un modelo general para la estructura y función de las regiones 3'-no codificantes de los mRNA de levadura.

Estudio de la función de los genes huérfanos dentro del proyecto EUROFAN 2

El nodo B4 del proyecto EUROFAN 2 tiene por objeto investigar la función de los genes huérfanos pertenecientes a familias de homología de secuencia y, por otro lado, crear macrodeleciones entre genes esenciales para construir un banco de deletantes múltiples que sirva para la búsqueda de fenotipos sintéticos.
Dentro del primer objetivo estamos analizando 4 familias de 3 genes homólogos. En la primera de ellas se encuentra encuadrado un gen, *ESA1*, que codifica para una Histona acetil transferasa (HAT). Como es un gen esencial no se puede delecionar y se recurrido a una estrategia de sustitución del promotor natural por otro reprimible por Tetracicilina (2). Se han construido dobles y triples mutantes de este gen y los otros dos genes de la familia y con genes de otras HATs. Se están investigando los fenotipos de estos mutantes múltiples. La segunda familia contiene, en realidad, solo 2 genes pues hemos encontrado que dos de los genes miembros, que se encuentran consecutivos en el genoma, son un solo gen con un pequeño intrón separando las dos ORFs. Es el primer caso de intrón descubierto de esta forma y, también, es el intrón situado más C-terminal sobre la secuencia de una proteína en levadura. Este gen (*YML033-34*) se regula por el ciclo celular con un máximo de expresión en mitosis de forma análoga a los genes del grupo de la ciclina *CLB2* (3). La tercera familia contiene genes que se expresan en diferentes momentos del crecimiento en medio líquido: fase exponencial o fase estacionaria. Tanto de ésta como de la cuarta familia se han construido mutantes simples, dobles y triples y se están estudiando los fenotipos.

Con respecto a las macrodeleciones se están construyendo 4 que comprenden entre 5 y 13 genes y entre 7 y 27 kb de DNA del brazo izquierdo del cromosoma VIII. Una vez construidas se investigarán sus fenotipos y se depositarán en la colección EUROSCARF.

Estudio de la organización genómica y del transcriptomio en diferentes cepas de levadura

La tecnología de los Chips de DNA está revolucionando la Biología Molecular y la Biotecnología. En el caso de la levadura *S. cerevisiae* sus posibilidades están siendo explotadas al máximo (4). En colaboración con el laboratorio del Dr. Hoheisel se está estudiando la aplicabilidad de esta tecnología para el estudio de las diferencias genómicas entre diversas cepas de levadura, como por ejemplo, las cepas vínicas y para el estudio de los cambios globales de transcripción que se producen durante el proceso de la fermentación vínica. Los primeros resultados apuntan que usando Chips fabricados con sondas de todos los genes de la cepa de laboratorio S288c (4) se puede analizar la composición del genoma de cepas vínicas y detectar también importantes cambios de expresión cuando las cepas se someten a estreses, como por ejemplo, altas concentraciones de etanol. En la actualidad se están completando estos estudios y poniendo a punto un laboratorio de fabricación y análisis de Chips de DNA en la Universitat de València.

Agradecimientos

En esta conferencia se exponen resultados que han sido realizados en colaboración con mis compañeros de laboratorio Susana Rodriguez-Navarro, Marcel.lí del Olmo y Rosario Gil así como con el Dr. Jacques van Helden de la Université Libre de Bruxelles y el laboratorio del Dr. Jörg Hoheisel del DKFZ en Heidelberg. A todos ellos agradezco su colaboración. El trabajo en el laboratorio del autor ha sido posible gracias a las ayudas concedidas por la C.I.C.Y.T.: BIO96-2052-CE y BIO98-1316-CE; y por la Unión Europea: BIO4-CT95-0080, BIO4-CT97-5115 y BIO4-CT97-2294.

Referencias

1.- Guo Z, Sherman F. (1996). **Trend Biochem. Sci. 21**, 477-481.
2.- Bellí, G. et al., (1998). **Yeast 14**, 1127-1138.
3.- Spellman, P.T. et al. (1998). **Mol. Biol. Cell 9**, 3273-3297.
4.- Hauser, N.; et al., (1998). **Yeast 14**, 1209-1221.

LA HETEROCROMATINA DE *Drosophila*: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Marta Agudo, José P. Abad y Alfredo Villasante
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM). 28049 Madrid.

El estudio de los centrómeros de eucariotas superiores ha sido abordado en diversos organismos con resultados que indican que a nivel de DNA los centrómeros no parecen tener secuencias comunes, aunque en un organismo concreto se suelen encontrar secuencias comunes en los centrómeros de los distintos cromosomas. La organización de las secuencias centroméricas va de la muy sencilla de *S.cerevisiae* a la muy compleja y con abundantes secuencias repetidas de los animales y plantas. Los cromosomas de *Drosophila* son buenos modelos para el estudio de la estructura y función de los centrómeros pues siendo su genoma no tan grande como el de los mamíferos, el comportamiento de sus cromosomas durante el ciclo celular es similar.

En *D. melanogaster* los datos existentes sobre el centrómero de un minicromosoma derivado del cromosoma X, obtenidos por el grupo de Karpen, y nuestros datos sobre los centrómeros de los cromosomas 3 e Y, tampoco muestran las mismas secuencias en todos los centrómeros. Sin embargo, al igual que las secuencias teloméricas, el dodeca satélite (satélite centromérico del cromosoma 3 de *D. melanogaster*) y ciertos satélites centroméricos de distintas especies presentan una distribución asimétrica de residuos de guanina y citosina. Esta observación nos llevo a proponer que éstas secuencias centroméricas podrían derivar de secuencias teloméricas. Ademas, la cadena rica en purinas del dodeca-satélite, del satélite centromérico 3 humano, y de las repeticiones generadas por la telomerasa, son capaces de formar "in vitro" estructuras plegadas que se estabilizan por apareamientos no Watson-Crick. Recientemente, hemos encontrado un nuevo satélite en el centrómero del cromosoma Y formado, principalmente, por repeticiones en tándem de la región 3' no codificante (UTR) del retrotransposon telomérico HeT-A. También hemos visto que oligonucleotidos derivados de las repeticiones imperfectas presentes en estas regiones 3' UTR, son capaces de formar "in vitro" estructuras no Watson-Crick del tipo G4-DNA. Así, la presencia de motivos teloméricos en distintas secuencias centroméricas nos ha llevado a proponer que los determinantes estructurales de la función centromérica podrían derivar de estructuras teloméricas.

Por último, el análisis de restricción de la región centromérica del cromosoma Y ha mostrado que ésta deriva de una región telomérica ancestral. Sin embargo, un estudio posterior de éste cromosoma ha revelado que a lo largo de él existen otras regiones, que por las secuencias que contienen y por su disposición, también parecen derivar de telómeros. Así, en la evolución del cromosoma Y de *Drosophila* parecen haber estado implicados eventos de amplificación cromosómica global. Estos datos podrían apoyar la reciente hipótesis de Hackstein y colaboradores según la cual el cromosoma Y de *Drosophila*, en lugar de ser un cromosoma X degenerado, sería un cromosoma supernumerario generado a partir del autosoma más pequeño.

ORGANIZACIÓN DE SECUENCIA REPETIDAS Y MICROSATELITES EN PLANTAS

A.Cuadrado[1], T Schwarzacher[2], J.S.Heslop-Harrison[3], N. Jouve[1]
1.Dept. Biología Celular y Genética. Univ. alcala. Madrid
2.Dept. Cereal Research. John Innes Centre. Norwich. UK
3.Dept. Cell Biology. John Innes Centre. Norwich. UK

El genoma nuclear de los eucariotas se compone de un mezcla heterogenéa de DNA de secuencias únicas y repetida. La mayor parte, se trata de secuencias que no tienen una función codificadora. Algunas forman parte de la unidades de transcripción o desempeñan otras funciones celulares (reconocimiento de señales, origen de replicación, centrómero, etc) pero la mayoría son familias de secuencias de DNA repetido cuya funcionalidad si existiera se desconoce en la actualidad.

De forma general, y desde el punto de vista de su funcionalidad estos dos tipos de secuencias, únicas y repetidas, se suponen asociadas a dos tipos de capacidades dentro del genoma: regiones codificadoras y no codificadoras. Aparentemente, estas regiones del genoma se relacionan con dos tipos de organización de la cromatina. La eucromatina, menos condensada y transcripcionalmente activa (región codificadora), y la heterocromatina, más condensada y transcripcionalmente inactiva (región no codificadora).

Concretamente la region codificadora esta integrada en su mayoría por todos los genes presentes en una única copia junto con familias multigénicas constituídas por multiples copias del mismo gen o por genes de funcionalidad relacionada. A su vez, las familias multigénicas pueden estan organizadas en tandem (ej. rRNA) o bien dispersas por el genoma (genes de histonas). Por el contrario el DNA de la región no codificadora, cuya funcionalidad en general se desconoce, puede existir como copia única (ej. espaciadores) o como multiples copias, es decir DNA repetido.

La fracción de DNA repetido esta integrada por numerosas familias de secuencias de distinta complejidad y frecuencia de repetición. Estas secuencias suelen estar distribuidas por todo el genoma o concentradas en regiones puntuales de los cromosomas, fuera de la región codificadora y por tanto sometidas a procesos evolutivos distintos a los impuestos por la necesidad de conservar una serie dada de aminoacidos. En la mayoría de las especies estudiadas, se ha avanzado en la caracterización molecular de las secuencias repetidas y se han definido distintas clases en funcion de la naturaleza, tamaño y complejidad de la unidad de repetición (ej. Minisatelites, Microsatelites, Secuencias relacionadas con (retro)transposones, etc.). Algunas familias de DNA repetido en tandem muestran una localizacion preferencial en la heterocromatina de los cromosomas (ej. DNA satelite) si bien otros tipos de secuencias repetidas se distribuyen tanto en la eucromatina como en la heterocromatina.

El DNA repetidoesta bien caracterizado molecularmente en la mayoría de las especies vegetales estudiadas, definiendose distintas clases en función de la naturaleza, tamaño y complejidad de la unidad de repetición. En las plantas superiores el DNA repetitivo puede alcanzar hasta el 80% del genoma. Aunque parece ser que los mecanismos que operan en la amplificación y expansión de los distintos tipos de familias de DNA repetidos son los mismos, el tiempo necesario y la interración de los distintos procesos parecen ser diferentes y específicos para cada tipo de familias repetidas en las distintas especies. Esto hace que no exista una característica única y común que defina al DNA repetido de los distintos organismos eucariotas en relación con la abundancia y distribución cromosómica de los distintos tipos de familias repetidas.

Los microsatelites o SSRs (Simple Sequence Repeats) constituyen una clase de secuencias repetidas cuya unidad, de 1-5 pb se repite en tandem y con posible variación en el número de copias. Esto da lugar a fragmentos de longitud variable, sistemas polimórficos, ampliamente distribuidos en los genomas de eucariotas (Tautz and Renz, 1984). En general parece ser que los microsatelites se encuentran en menor proporción en los genomas de plantas, que en animales. Asi, se ha estimado que los microsatélites de mas de 20pb constituidos por dinucleotidos repetidos, se distancian por termino medio en 33kb en los genomas de plantas, y de tan solo 6kb en mamiferos (Wang et al. 1994). Al mismo tiempo mientras en mamiferos el motivo dominante es (GT)n, en plantas existe mucha mas diversidad, y se han encontrado otras combinaciones como las más abundantes. Esto indica diferencias notables en la organización genómica, y posible mantenimiento y papel de los microsatelites en plantas y animales.

La hibridación con microsatélites sintéticos al DNA genómico digerido ha dado lugar a la emergencia de diversos sistemas de marcado molecular (fingerprinting) de gran utilidad en análisis de identidad de variedades, líneas o incluso individuos (Weising et al. 1991). Debido a su abundancia y facilidad de análisis, los microsatelites se han convertido en una herramienta ampliamente utilizado en estudios de de genética de poblaciones y evolución, mejora de plantas, identificación de especies, variedades e individuos, confección de mapas genéticos, etc. (Morgante y Olivieri, 1993).

Sin embargo, hasta el momento hay menos estudios de la distribución física de los microsatelites en los cromosomas, midiante la utilizacion de oligonucleotidos sintéticos como sondas para *hibridación in situ*. Schmidt and Heslop-Harrison (1996) en remolacha y Gotnet et al. (1998) en garbanzo, mediante la utilización de diferentes SSRs han encontrado que aparte de la señal dispersa sobre todo el cromosoma, se encuentran zonas enriquecidas o con ausencia de algunos de los motivos. Fuchs et al. (1998) encontraron algunos oligonucleotidos que daban buen resultado como marcadores en los cromosomas de guisantes. En cebada y otras especies de cereales la hibridación con el motivo (GAA)n, origina un patrón de bandas en relación con el bandeo-N (Petersen et al.1996).

En nuestro trabajo, hemos analizando la distribución de 10 SSRs en los genomas de trigo y centeno (Cuadrado y Schwarzacher 1998). Todos los motivos analizados presentan un patrón de distribucion que muestra unas zonas localizadas de mayor concentración, sobre un fondo disperso de hibridación que abarca todo el genoma. Algunos SSRs, en particular (GACA)n dan lugar a un patrón de bandas diagnóstico en la identificación individual de los cromosomas. Este motivo revela un patrón de distribución semejante al bandeo-N en trigo, pero que no se relaciona con la distribución de la heterocromatina en centeno. Además, diferentes SSRs se localizan preferentemente en identicas posiciones. Con el fin de analizar a mayor resolución la organización interna de los SSRs que marcan las mismas posiciones, hemos utilizado los cromosomas paquiténicos, 10 veces mas largos que los cromosomas metafásicos, Así, hemos desvelado que distintos SSRr raramente solapan totalmente en cromosomas extendidos, a diferencia de la aparente coincidencia de posición que presentan en cromosomas metafásicos. La mayor resolución se ha alcanzado tras la hibridación in situ de distintos SSRs en células que se trataron para observar los complejos sinaptonémicos (Cuadrado and Schwarzacher, manuscrito en preparación)

Todos los estudios llevados a cabo hasta la fecha, se han realizado bajo condiciones de hibridación de baja astringencia, de manera que en todos ellos se observa una importante señal de fondo en los cromosomas (indicando la naturaleza dispersa de estos SSRs). En estas condiciones no siempre es fácil revelar en sitios específicos del cromosoma las zonas de mayor concentración de determinados SSR.

Actualmente en nuestro laboratorio hemos introducido un procedimiento de *hibridación in situ* de fluorescencia (FISH) bajo condiciones estándar de astringenica utilizando oligonucleotidos sintéticos. La aplicación de este método evita la señal de fondo y los “clusters” de SSR presentan una señal de hibridación más fuerte. Además la técnica permite la combinación simultanea de oligonucleótidos sintéticos y sondas clonadas de otros tipos de DNA repetitivo. De este modo, algunos SSR resuelven señales muy fuertes de hibridación y se pueden utilizar como marcadores para la identificacion de genomas enteros. Algunos solo se localizan en determinados cromosomas particulares o incluso una única señal en todo el genoma caracterizando un único brazo cromosómico en el complemento. (Cuadrado et al. enviado para publicación)

en esta comunicación se trata de dar una vision general de la organización de los distintos tipos de secuencias repetidas en plantas. Como distintas familias de secuencias repetidas han evolucionado en distintas especies de un mismo género. Se trata en más detalle concretamente la distribución cromosómica de SSRs o microsatelites desde la perspectiva de su localización física en cereales y su relación con la heterocromatina.

Bibliografía:

Cuadrado A, Schwarzacher T. (1998). The chromosomal organisaion of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* **107**: 587-594.

Cuadrado A, Schwarzacher T, Jouve N (1999) Use os synthetic oligonucleotides as cytological markers to study heterochromatin distribution in wheat. *TAG* (enviado).

Fuchs J, Kühne M, Schubert I (1998). Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridisation. *Chromosoma* **107**:272-276.

Gortner G, Nenno M, Weising K, Zink D, Nagl W, Gunter K, (1998) Chromosomal localisation and distribution of simple sequence repeats and the *Arabidopsis*-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. *Chromosome Research* **6**:97-104

Morgante M, Olivieri AM. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* **3**:175-182

Pedersen C, Rasmussen SK, Kinde-Laursen I. (1996). Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by in sity hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* **39**:93-104

Schmidt T, Heslop-Harrison JS.(1997). The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:8761-8765

Tautz D, Renz M.(1984). Simple sequences are ubiquitious repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* **12**:4127-4137

Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanklsey SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repets. *Theor Appl Gene*t **88**:1-6

Weising K, Beyermann B, Ramser J, Kahl G (1991) Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* **12**:159-169

5 / 01

DESARROLLO DE MARCADORES AS-PCR DE LOS GENES *Glu-A1* y *Glu-D1* QUE CODIFICAN HMW-GLUTENINAS DE TRIGO

Rubio, P.; De Bustos, A. y Jouve, N.
Departamento de Biol. Cel. y Genética. Campus Universitario.
28871 Alcalá de Henares. Madrid

La calidad harino panadera del trigo hexaploide está relacionada con la composición de las proteínas de reserva del endospermo, entre ellas las gluteninas de alto peso molecular. Estas HMW-gluteninas están codificadas por genes que se localizan en el brazo largo de los cromosomas 1A, 1B y 1D. En cada locus existen dos subunidades génicas denominadas x e y, estrechamente ligadas, que a su vez muestran diferentes alelos, de las que depende, en gran medida, la calidad harino-panadera del trigo. Así, se ha demostrado que los trigos que poseen la composición génica *Ax2**, *Ax1*, *Dx5* y *Dy10* presentan buena calidad.

En este trabajo se han diseñado una serie de marcadores específicos de alelos (AS-PCR) a partir de las secuencias conocidas de los genes *Glu-A1* y *Glu-D1*, y que abarcan la región codificante de los genes. El diseño de los cebadores se ha visto dificultado por el gran parecido que existe entre genes diferentes y alelos del mismo gen. Así, en el caso del gen *Glu-A1* la diferencia entre los cebadores diseñados fue únicamente de una base. Estos marcadores han sido utilizados para asistir a la selección en un programa de mejora de calidad por sustitución alélica en trigo (Trabajo relacionado con el Proyecto nº AGF97-810, CICYT).

5 / 02

CARACTERIZACION MOLECULAR DEL ALELO INACTIVO DEL GEN *Glu-A1* DE LAS HMW-GLUTENINAS DEL TRIGO

De Bustos, A.; Rubio, P. y Jouve, N.
Departamento de Biol. Cel. y Genética. Campus Universitario.
28871 Alcalá de Henares. Madrid

Las gluteninas de alto peso molecular (HMW) son de importancia en relación con la calidad harino panadera de los trigos. Estas proteínas están codificadas por genes que se encuentran en los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B y 1D del trigo hexaploide. En cada locus existen dos genes, x e y, estrechamente ligados y que codifican para diferentes subunidades. Concretamente, el gen *Glu-A1* presenta tres alelos denominados *Ax2*, Ax1* y *x-nulo,* de los cuales únicamente se han caracterizado molecularmente los dos primeros. En este trabajo se ha realizado la clonación y caracterización del alelo *x-nulo* de este gen.

Mediante la comparación de la secuencia obtenida para este alelo frente a las de los otros alelos, se ha comprobado el gran parecido existente entre el alelo *x-nulo* y el *Ax1*, ambos diferentes del *Ax2**. Por otro lado, el alelo *x-nulo* se diferencia del *Ax1* en mutaciones puntuales, la más importante de las cuales se sitúa 1215 pb aguas abajo del codón de iniciación y es responsable de la aparición de un codón de paro, lo cual produciría una reducción considerable del tamaño de la presunta proteína madura codificada por el alelo *x-nulo* que podría explicar el efecto negativo de este alelo en la calidad del grano (Trabajo relacionado con el Proyecto nº AGF97-810, CICYT).

5 / 03

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICO DE MARCADORES CROMOSÓMICOS EN EL GRUPO DE HOMEOLOGIA 1 DE TRIGO Y CENTENO

Rubio, P.; Daza, L.; Loarce, Y.. y Jouve, N.
Dpto. Bio. Cel. y Genética. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares. Madrid.

La introgresión ha tenido relativo éxito en la tribu *Triticeae*. Así, se han conseguido sustituciones interespecíficas o intergenéricas estables de interés aplicado, como la sustitución del brazo 1RS de centeno en cualquiera de los cromosomas del grupo de homeología 1 de trigo. Para cualquier análisis genético, es básica la diferenciación de variedades, por lo que hay que contar con sistemas genéticos variables de análisis directo. En último caso, interesa la localización de los distintos sistemas polimórficos en grupos de ligamiento o regiones concretas de cromosomas, lo que facilita la introducción total o parcial de genes.

En este trabajo se han estudiado una serie de marcadores (proteínas de reserva del endospermo (gluteninas, gliadinas y secalinas) isoenzimas (GPI), bandas-C (L2.3), RFLPs y RAPDs) que diferencian brazos cromosómicos en el grupo de homeología 1 de trigo y centeno, en dos trigos hexaploides: 'Pané 247' y '48-136-1' que es portador de una translocación 1RS/1BL, así como en 182 plantas F_2 descendientes del cruzamiento entre ambas. Se localizan los marcadores en los brazos 1RS, 1BS y 1BL y se establecen las distancias genéticas entre los mismos. Por otro lado, se realiza un estudio comparativo de la eficacia de las diferentes técnicas empleadas para detectar variación entre las dos líneas de trigo, resultando los RFLPs los de mayor utilidad, ya que del conjunto de combinaciones sonda-enzima empleadas, un 82.6% revelaron polimorfismo.

Este trabajo ha sido financiado por CICYT (AGF97-810).

5 / 04

EL CONTENIDO RELATIVO DE rDNA DE UNA NOR DETERMINA SU NIVEL DE EXPRESIÓN Y LA PROBABILIDAD DE QUE LLEGUE A ACTIVARSE. UN ESTUDIO BASADO EN LA TINCIÓN SECUENCIAL AG-NOR E HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Zurita Martínez, F., Jiménez Medina, R., Barrionuevo Jiménez, F.J., Díaz de la Guardia, R. y Burgos Poyatos, M.
Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, España. mburgos@goliat.ugr.es

La expresión relativa de las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) fue estimada mediante tinción argéntica, y el contenido relativo en cistrones ribosómicos mediante hibridación *in situ* (ISH), en preparaciones cromosómicas del lirón careto (*Eliomys quercinus*). Esta especie posee dos parejas cromosómicas portadoras de NOR y representa, por tanto, el modelo más simple que permite estudiar las posibles interacciones entre NORs homólogas y no homólogas.

Ambos tipos de señales (Ag-NOR e ISH) fueron investigados en cada NOR usando un método de tinción secuencial que hizo posible demostrar que la cantidad de ADNr que una NOR presenta en relación con las otras NORs del complemento determina su nivel de expresión y la probabilidad de llegar a ser activa, independientemente de que las otras NORs sean homólogas o no.

Sugerimos que las NORs se activan de acuerdo con una jerarquía establecida sobre la base de su contenido en cistrones ribosómicos. Proponemos un modelo que relaciona la estructura y la función de las NORs y que se ajusta tanto a estos resultados como al conocimiento que actualmente se tiene sobre la regulación de su transcripción a escala molecular.

5 / 05

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES POR ANDROGÉNESIS IN VITRO DE TRITICALE

González, J.M.; Nogueras, I.; Muñiz, L.M. y Jouve, N.
Dpto. de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares (Madrid). bcjmgt@gene.alcala.es

La segunda etapa de la androgéneis in vitro consiste en la germinación de plantas verdes a partir de los embriodes producidos durante la fase de cultivo de las anteras. Esta etapa está bajo control genético y se ha encontrado una amplia variabilidad tanto inter como intraespecífica. El número y proporción de plantas verdes regeneradas es crítico si se pretende aplicar la androgénesis in vitro a programas de mejora, donde es necesario contar con un número suficiente de plantas haploides duplicadas, para luego proceder a su selección. Con el fin de poder tranferir la capacidad que tienen determinadas variedades para regenerar un gran número de plantas verdes, a otras variedades que carecen de ella y que sin embargo son interesantes por otros motivos, es necesario contar con marcadores estrechamente ligados a la capacidad de regeneración de los embrioides. En este trabajo se ha estudiado la segregación de RAPD en plantas verdes haploides, obtenidas a partir del híbrido entre la variedades de triticale Torote y Presto. Se han detectado distorsiones en la segregación de ciertos marcadores lo cual puede deberse a que estén ligados a regiones génicas implicadas en la capacidad de germinación de los embrioides.

5 / 06

ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES EN LA ANDROGÉNESIS IN VITRO DE TRITICALE. PRODUCCIÓN DE EMBRIOIDES

González, J.M.; Muñiz, L.M.; Nogueras, I. y Jouve, N.
Dpto. de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares (Madrid). email=bcjmgt@gene.alcala.es

La androgénesis es una de las técnicas de cultivo in vitro de vegetales que ha tenido un mayor éxito, debido a su aplicación directa en la obtención de líneas homocigotas. No obstante, existen numerosos factores que influyen en la obtención de un número suficiente de plantas haploides duplicadas, que puedan emplearse en programas de mejora. El genotipo es el principal de estos factores, encontrándose dentro de una misma especie, líneas recalcitrantes a la androgénesis y otras en las que se obtiene buenos resultados. Esto indica que el proceso androgénico está controlado genéticamente, y se ha demostrado que las tres etapas en las que se ha dividido la androgénesis: producción de enbrioides, germinación y proporción de plantas verdes se encuentran bajo control de sistemas poligénicos independientes. En el estudio que se presenta se ha analizado la segregación de marcadores moleculares (RAMP) en embrioides obtenidos a partir del híbrido entre las variedades de triticales "Torote" y "Presto". De los más de cincuenta marcadores polimórficos analizados, se ha encontrado que algunos presentan distorsión con respecto a la segregación 1:1 teórica. En el trabajo se discute a cerca del origen de estas desviaciones, siendo algunas de ellas probablemente debidas a la existencia de ligamiento con loci que intervienen en la producción de embrioides.

5 / 07

ACTIVIDAD NEOCÉNTRICA EN LA LÍNEA DE ADICIÓN DITELO 5RL

Puertas, M.J.[1]; Manzanero, S.[1]; Jiménez, G.[1] y Vega, J.M.[2]

1. Depto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid
2. Div. Biological Sciences, Univ. of Missouri, Tucker Hall, Columbia, Missouri 65211

Se ha observado que los telocéntricos del bivalente 5RL presentan una constricción muy patente en la metafase I con actividad neocéntrica.

Primeramente se realizó el estudio cuantitativo de la orientación del 5RL. En el 50% de las células en metafase I los dos telos orientan normalmente, aunque siempre muestran la constricción muy estirada. En el 50% restante la constricción ejerce una tensión de tipo neocentromérico, tan fuerte como si estuviera unida a fibras del huso. Cuando los dos centrómeros tiran hacia el mismo polo y el neocentrómero al otro, el bivalente adquiere forma de V o de U dependiendo que tengan actividad neocéntrica una o ambas constricciones. En algunas células se observa que la tensión hacia los polos se ejerce sólo por los neocentrómeros.

Se ha realizado GISH con sonda genómica de centeno para distinguir los cromosomas 5RL entre el trigo. En todas las anafase I la constricción es mucho más corta que en metafase y el 5RL está retrasado frecuentemente. En el 15% de las anafases los dos cromosomas 5RL estaban situados en el mismo polo. Como esta frecuencia es menor que la de bivalentes con forma de V o de U, una parte de estos bivalentes mal orientados tiene que adquirir la orientación adecuada antes de comenzar la emigración. Estas células también indican que son los centrómeros los que finalmente arrastran los cromosomas al polo.

También se estudiaron con GISH la segunda división y la mitosis. En las metafases y anafases II no se observa actividad neocéntrica aunque el cromosoma 5RL se ve descondensado. En mitosis el 5RL no muestra actividad neocentromérica.

Hemos realizado FISH con la sonda específica de los knobs de maíz, con la sonda específica de centrómero de cereales y con la sonda específica de telómeros. Ninguna de ellas ha marcado los neocentrómeros.

5 / 08

IDENTIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE TRIGO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON ADN GENÓMICO TOTAL DE *H. chilense*

González, M.J. y Cabrera, A.
Dpto. de Genética, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3080, 14080 Córdoba.

La identificación genómica y cromosómica del material vegetal es importante en el seguimiento de la introgresión de cromosomas o segmentos cromosómicos durante los ciclos de retrocruzamiento y selección. Las técnicas de bandeo-C y bandeo-N para la identificación de cromosomas individuales se conocen bien en el trigo. La hibridación *in situ* con sondas de ADN repetido se han utilizado también con éxito en la identificación genómica y cromosómica en la tribu Triticeae. El presente trabajo muestra que la hibridación *in situ* con ADN genómico total de *H. chilense* hibrida sobre los cromosomas de trigo. El patrón de hibridación es similar al obtenido mediante bandeo-N en esta especie, permitiendo identificar los 7 pares de cromosomas pertenecientes al genoma B, los 7 pares del genoma A y los cromosomas 1D, 2D y 7D.

5 / 09

ANÁLISIS DE LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO EN EL SUBGÉNERO *Leopoldia* DEL GÉNERO *Muscari* (Liliaceae)

Garrido-Ramos, M.A. [$]; Cuñado, N. [#]; De la Herrán, R.[$]; Ruiz Rejón, C. [$]; Ruiz Rejón, M.[$]; Santos, J.L.[#]

[$] Depart. de Genética; Facultad de Ciencias; Universidad de Granada; 18071 Granada.

[#] Depart. de Genética; Facultad de Biología; Universidad Complutense; 28040 Madrid.

Dentro del subgénero *Leopoldia*, del género *Muscari*, *M. comosum* presenta un cariotipo excepcional por dos motivos fundamentalmente: porque es el más asimétrico de todos los del grupo y porque la única región NOR activa en esta especie está localizada en la quinta pareja mientras que en las otras especies la región NOR se localiza en la primera o en la segunda pareja (todas las especies del grupo tienen 2n=18). Dado que *M. comosum* muestra un cariotipo derivado con respecto a las demás especies del grupo, cabe preguntarse si la primera y la segunda pareja del cariotipo de *M. comosum* conservan genes ribosómicos. Mediante FISH, hemos demostrado que efectivamente, *M. comosum*, mantiene loci ribosómicos tanto en la primera como en la segunda pareja aunque estos loci son inactivos y no intervienen en la organización del nucleolo. Además, hemos comprobado que la heterocromatina asociada con los sitios rDNA inactivos presenta una sensibilidad a la ADNasaI intermedia entre la que presenta la heterocromatina asociada a los NORs activos (la más sensible a la digestión) y la que presenta la heterocromatina de la primera pareja y de los centrómeros de esta especie (la más resistente a la digestión). El análisis mediante FISH de las regiones NOR de tres especies más del grupo (*M. atlanticum*, *M. dionisicum* and *M. matritensis*) nos permite obtener conclusiones importantes acerca de la evolución de los loci ribosómicos en este grupo de plantas.

5 / 10

TIPIFICACIÓN DE RETROVIRUS ENDÓGENOS DE CERDO

Tomás, E.; Velencoso, R.; Blanca, J.M.; de Frutos, R.
Departamento de Genética. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Valencia.

Los xenotransplantes comienzan a plantearse como una solución viable a la escasa disponibilidad de órganos y tejidos humanos, considerándose el cerdo uno de los candidatos idóneos como especie donante. La demostración de que retrovirus endógenos de cerdo (PERV) de tipo-C pueden infectar células humanas *in vitro* (Patience et al, l997) ha llevado a pedir la moratoria en la investigación del desarrollo de los xenotransplantes e investigar la potencialidad infectiva de los PERV.

Dentro de este contexto, hemos diseñado un método rápido de detección de PERV basado en amplificación por PCR. Los cebadores fueron diseñados a partir del alineamiento del dominio transcriptasa inversa de secuencias de retrovirus exógenos o endógenos, especialmente humanos, disponibles en bases de datos.

Con dicha metodología hemos logrado aislar algunos retrovirus endógenos de cerdo. Las secuencias obtenidas se han comparado con las secuencias de retrovirus utilizadas para diseñar los cebadores, con el fin de adscribir estas secuencias a las familias retrovirales descritas.

5 / 11

LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE ELEMENTOS TRANSPONIBLES EN ESPECIES DE *DROSOPHILA*

Pérez-Muñoz, A.; González-Guzmán, M.; Martínez-Sebastián, M.J.; de Frutos, R.
Departamento de Genética. Facultad de CC. Biológicas. Universidad de Valencia. Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot.

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio en el que se pretende analizar la evolución de elementos transponibles pertenecientes a distintas familias: los elementos *P* como representantes de la clase I, que se transponen vía DNA mediante la enzima transposasa, y los elementos *gypsy* y *bilbo* como representantes de la clase II, que se transponen vía RNA con la intervención de la enzima transcriptasa reversa. Las diferencias existentes a nivel de estructura y mecanismos de transposición pueden ser un componente esencial en la distribución de cada elemento.

Mediante la técnica de hibridación *in situ* sobre cromosomas politénicos, con sondas marcadas con digoxigenina y reveladas con distintas técnicas (color y FISH), en las especies de Drosophila del grupo obscura *D. suboscura*, *D. guanche* y *D. maderiensis*, se ha determinado si la localización de estos elementos es mayoritariamente eucromática o heterocromática, cual es su distribución en los brazos cromosómicos, número de copias, etc.

Como resultado se ha concluido que tanto el elemento P como el elemento gypsy aparecen en las tres especies fundamentalmente en la zona cromocéntrica. En cuanto al elemento bilbo la distribución es variable según la especie de forma que en D.subobscura aparecen numerosas copias en la zona cromocéntrica aproximadamente 10 copias en los brazos y también se observan copias en los telómeros. En D. guanche se observan copias en zona centromérica y pericentromérica. En D. maderiensis so observan numerosas copias fundamentalmente en los brazos.

5 / 12

MARCADORES MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN ASISTIDA DE INTROGRESIONES GENÉTICAS *Hordeum-Triticum*

Hernández Molina, P., Dorado Pérez, G., Martín Muñoz, A.
Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC). Apdo 4084. 14080 Córdoba.
ge1hemop@uco.es

Se ha estudiado la utilidad de los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region), STS (Sequence-Tagged-Site) y microsatélites en la detección y caracterización de introgresiones de *Hordeum chilense* y *Hordeum vulgare* en trigo. La detección de los siete cromosomas de ambas especies en fondo genético de trigo ha sido posible mediante las cuatro técnicas utilizadas. La técnica RAPD es la más sencilla, pero la posibilidad de detección de introgresiones es dependiente del fondo genético de las variedades de trigo y cebada utilizadas. Para incrementar la utilidad de estos marcadores, RAPDs específicos de cromosomas de *H. chilense* se han transformado en SCARs mediante la secuenciación de los productos de amplificación y el diseño de cebadores más largos y específicos. De manera similar, se han desarrollado STSs en cebada a partir de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), algunos de los cuales permiten la detección de introgresiones trigo-cebada. En el caso de la cebada cultivada, su interés agronómico ha justificado el desarrollo de microsatélites. Estos permiten la detección y caracterización de introgresiones de todos los brazos cromosómicos de cebada en trigo. Los microsatétiles han resultado ser los marcadores idóneos para la introgresión, dada su alta especificidad, así como por la seguridad de amplificación de algún alelo para cualquier genotipo introgresado.

Estas técnicas se han aplicado en la caracterización de las líneas de adición disponibles de *H. vulgare* y *H. chilense,* y en la selección asistida de nuevas líneas de adición de *H. chilense* en trigos duros y harineros.

5 / 13

RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS LEVADURAS DE VELO DE FLOR Y SU INFLUENCIA EN LOS PARAMETROS ENOLÓGICOS DEL VINO FINO DE JEREZ

Infante, J.J.; Mesa, J.J.; Rebordinos, L. y Cantoral, J.M.
Laboratorio de Microbiología y Genética. CASEM. Universidad de Cádiz
Polígono Río San Pedro s/n. 11510 Puerto Real (Cádiz)
Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

Las levaduras de *velo de flor* son las responsables del proceso de crianza biológica de los vinos finos de la denominación de origen Jerez-Xérès-Sherry y Manzanilla de Sanlucar de Barrameda, de incuestionable prestigio internacional. Pertenecen mayoritariamente a cuatro estirpes o razas fisiológicas de la especie *Saccharomyces cerevisiae: beticus, cheresiensis, montuliensis* y *rouxii*. La calidad del producto final está íntimamente ligada a las características metabólicas y bioquímicas de estas levaduras.

En nuestro laboratorio se ha realizado un amplio análisis molecular de las levaduras responsables del envejecimiento de los vinos en una bodega jerezana. Utilizando una serie de técnicas como la obtención del cariotipo mediante electroforesis en campo pulsante, polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP) y análisis de las proteínas en geles SDS-PAGE, se ha encontrado un elevado índice de variabilidad genética entre las distintas cepas de levadura, incluso dentro de una misma raza, que responde al balance entre dos fuerzas que actúan en sentido contrario sobre los microorganismos: la mutación y la selección, ambas inducidas por las condiciones del vino en crianza.

Tras este estudio se han seleccionado una serie de cepas con las que se están realizando experimentos de crianza biológica dirigida en el que intentamos encontrar la relación entre los patrones moleculares de las cepas y las características del vino envejecido por las mismas. Además se realiza un seguimiento de los patrones para estudiar como afectan las condiciones del vino al ADN cromosómico y mitocondrial, así como la actividad de algunas isoenzimas como la *alcohol deshidrogenasa* mediante electroforesis en geles de almidón.

5 / 14

EL MECANISMO DE DIPLOIDIZACIÓN DE LAS ESPECIES HEXAPLOIDES DE *Aegilops*

Sánchez-Morán, E., Santos, J.L., Blázquez, S., Cuñado, N.
Dpto de Genética, Fac de Biología,Universidad Complutense, 28040-Madrid

El análisis de los complejos sinaptonémicos de núcleos en cigotena media y tardía de *Aegilops crassa* ($D_1D_1D_2D_2$MM), *Ae. vavilovii* (DDMMSS), *Ae. juvenalis* (DDMMUU) y *Ae. triaristata* (UUMMNN) revela que la sinapsis se inicia preferencialmente en los extremos de los cromosomas y que se restringe mayoritariamente a los homólogos de forma que la frecuencia de multivalentes es baja aunque, en general, mayor que la observada en las especies tetraploides de este género (Cuñado et al., 1996a, b, c). En tres de las especies analizadas estos multivalentes se mantienen en paquitena pero no en metafase I donde sólo se observan bivalentes formados por cromosomas homólogos. Por el contrario, se han observado cuadrivalentes en células en metafase I de *Ae. crassa*, formados por cromosomas de los genomios D.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el mecanismo que controla la formación de bivalentes en estas especies actúa principalmente en las primeras etapas de la profase I, restringiendo la sinapsis a cromosomas homólogos y secundariamente en paquitena, impidiendo la recombinación recíproca en la mayoría de las asociaciones homeólogas existentes. Este comportamiento cromosómico contrasta con el observado en los trigos cultivados donde el número de multivalentes en cigotena es alto pero éstos se resuelven antes de metafase I.

Referencias:

.- Cuñado et al. (1996a). Genome 39, 664-670.
.- Cuñado et al. (1996b). Theor Appl Genet 93, 1152-1155.
.- Cuñado et al. (1996c). Theor Appl Genet 93, 1175-1179.

5 / 15

PHYSICAL AND LINKAGE MAP OF *Pleurotus ostreatus*

Larraya, L.[1]; Pérez, G.[1]; Peñas, M.[1]; Baars, J.J.[2]; Mikosch, T.S.P.[2]; Ritter, E.[3]; Pisabarro, G.[1] and Ramírez, L.[1]

[1]Dpto. Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra, E-31006 Pamplona, España
[2] Mushroom Experimental Station, P.O. Box 6042, NL-5960 AA Horst, Holanda
[3]C.I.M.A.- Granja Modelo, E-01080 Álava, España

In order to determine the chromosome composition of the white rot edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (var. *florida*) we have studied the sizes of its chromosomes by electrophoresis in contour clamped homogeneous electric fields (CHEF) gels, and we have set the basis of a genetic linkage map based on both functional and molecular markers. The CHEF experiments allowed the separation of 11 chromosomes ranging from 1.43 to 4.72 Mbp in size. The total genome size for this variety is 35 Mbp. Each chromosome could be individualized by hybridization to specific DNA probes corresponding to different genetic linkage groups and revealing the existence of prominent chromosome length polymorphisms in this variety. The genetic linkage map was based on the segregation of 215 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Restriction Fragment Length Polimorphisms (RFLP) markers and the two unlinked functional loci *mat*A and *mat*B responsible for mating type control. A segregating population of 80 monokaryons meiotically produced by the commercial strain N001 was used. The analysis of the data revealed 11 linkage groups corresponding to the chromosome-sized DNA bands observed in the CHEF experiments. Each linkage group is composed by 12 to 30 markers. The total genetic length of this map is 1095 cM. The size of the different linkage groups varied between 37.9 and 190.3 cM. Forty four markers showed distorted segregation. Five quantitative trait loci (QTL) could be detected for mycelial growth located on linkage groups 4, 5, 8 and 9. They explain between 6.5 and 21.4% of the total variance. These results could help in improving the breeding programs for this fungus.

5 / 16

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS DE *Perkinsus atlanticus*

De la Herrán, R.; Garrido-Ramos, M.A.; Navas, J.I.[#]; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M.
Departamento de Genética; Facultad de Ciencias; Universidad de Granada; 18071 Granada, y
[#] C.I.C.E.M. "Aguas del Pino" Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 21071 Huelva.

La presencia de *Perkinsus* es conocida prácticamente en todas las aguas cálidas del mundo, siendo su infección la principal causa de mortalidad de moluscos bivalvos tanto en poblaciones naturales como cultivadas. El género *Perkinsus* lo componen cinco especies de protozoos parásitos cuya clasificación es muy controvertida. Aunque inicialmente fueron clasificados como hongos, con posterioridad han sido incluidos dentro de Alveolata. Aun así su posición dentro de este grupo es muy discutida, habiendo sido considerados inicialmente como Apicomplexa, pero en la actualidad existen datos que apoyan su inclusión entre los Dinoflagelados.

Nosotros hemos aislado y secuenciado la región intergénica entre la subunidad grande (26S) y la pequeña (18S) de los genes ribosómicos de *P. atlanticus*. El análisis de esta región revela que al igual que ocurre en hongos, algas y algunas especies de protozoos, en *P. atlanticus* el gen del ARN ribosómico 5S se encuentra físicamente ligado con el resto de genes ribosómicos, concretamente a 238 pb del extremo 3´ del gen 26S, entre éste y el gen 18S. Hemos caracterizado el gen 5S y hemos determinado tanto su estructura secundaria como la existencia de motivos característicos de reconocimiento para la ARN polimerasa III (promotores internos y señales de terminación). Igualmente hemos caracterizado las regiones intergénicas entre los genes 26S-5S y entre los genes 5S-18S, comprobando tanto la conservación de ciertas características estructurales importantes de estas regiones como su elevada especificidad. Así, una búsqueda en las bases de datos de la EMBL/GenBank dio como resultado la escasa identidad con secuencias de las regiones espaciadoras de otras especies (incluidas especies del mismo género como *P. marinus*), quedando solamente conservados ciertos motivos existentes en estas regiones. Los datos obtenidos son de utilidad, por un lado, para el análisis de la posición taxonómica de *Perkinsus* dentro de Alveolata y, por otro lado, para el desarrollo de un test de diagnóstico específico de infecciones de almejas por parte de *P. atlanticus*.

5 / 17

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE PROTEÍNAS DE RESERVA (HORDEÍNAS) EN POBLACIONES MARROQUÍES DE CEBADA (*HORDEUM VULGARE* L.)

Dakir, EL-H.; Pérez de la Vega, M.; Ruiz, M.L.
Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071, León.

Se ha estimado la variabilidad genética en 31 poblaciones marroquíes de cebada. *Hordeum vulgare* L., mediante el uso de proteínas de reserva como marcadores (hordeínas), y como material de referencia se ha utilizado la variedad comercial "Hassan". Las hordeínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Mediante esta técnica se resuelve un juego de múltiples bandas, de las cuales se han analizado 27 en base a su nitidez y repetibilidad en los geles. Algunas de estas bandas (aquellas con mayores valores de F_{ST}) servirían para discriminar entre poblaciones.

Los resultados indican que existe una gran variabilidad genética en los recursos fitogenéticos de Marruecos tanto a nivel intra como interpoblacional, siendo una elevada proporción de las poblaciones analizadas genéticamente heterogéneas (96,7%). El estudio de las asociaciones multilocus en las poblaciones mostró que el número de estas asociaciones oscilaba entre 1 para la población O.MDA-37 y el control "Hassan" hasta 57 para la población T.A.A-RA-29 con un promedio de 43 asociaciones multilocus por población. Las asociaciones más frecuentes en el conjunto de todos los individuos analizados lo son porque se encuentran en gran número de poblaciones aunque en pocos individuos cada uno de ellas.

Cuando las poblaciones se agruparon en base a su parecido genético se observó que no existen agrupamientos preferentes según la zona geográfica de donde proceden las muestras estudiadas.

5 / 18

ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO OBTENIDO MEDIANTE HORDEÍNAS Y RAPDs EN VARIEDADES LOCALES MARROQUÍES DE CEBADA (*HORDEUM VULGARE* L.)

Dakir, EL-H.; García, P.; Ruiz, M.L.; Pérez de la Vega, M.
Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071, León.

En 6 poblaciones marroquíes de cebada se ha realizado un estudio comparativo del polimorfismo a nivel bioquímico (electroforesis de proteínas de reserva mediante SDS-PAGE) y molecular (RAPD). Mediante la técnica SDS-PAGE se ha obtenido una serie de bandas (hordeínas) de las cuales se han utilizado un máximo de 27 en base a su nitidez y repetibilidad en los geles; en cuanto a la técnica molecular, se analizaron 31 cebadores arbitrarios, 6 de ellos presentaron una amplificación débil y otros no manifestaron ninguna amplificación. Los 21 cebadores restantes revelaron un total de 100 bandas polimórficas, oscilando desde 1 para los cebadores OPA09, OPA18, OPP06 y OPW06, hasta 11 marcadores polimórficos para el cebador OPH08, siendo la media de 4,76 bandas polimórficas por cebador. Se ha detectado con este método un porcentaje de bandas polimórficas del 62,5%. Algunos de los cebadores utilizados son discriminatorio ya que generan patrones RAPD exclusivos para una u otra población. El análisis de los agrupamientos de las poblaciones obtenidos tanto con hordeínas como RAPDs fueron parecidos excepto la relación de las poblaciones O.MDA-37, O.HR-BER-38 con el control. Estudios de correlación entre los índices de diversidad genética obtenidos mediante la técnica de electroforesis de proteínas de reserva de semilla y molecular, indicaron que mediante SDS-PAGE se detectó un mayor índice de polimorfismo por locus que con la técnica molecular (RAPD), aunque esta última suministra un número mayor de marcadores polimórficos.

5 / 19

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA VARIABILIDAD DE LOS CLEMENTINOS: MUTACION Y TRANSPOSICION

Ruiz, C., Bretó, M.P. y Asíns, M.J.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Naquera, Km 4.5. 46113 Moncada (Valencia).

España es el principal país exportador de cítricos para consumo directo, siendo especialmente competitiva en mandarinos. Entre ellos destacan por su calidad los clementinos. La variabilidad genética en los clementinos es muy limitada, pues las variedades existentes no se han obtenido por cruzamiento, sino por la selección de mutaciones espontáneas, detectadas en su mayoría por los propios citricultores. Esto contrasta con la importante variabilidad que presentan para características de interés agronómico. Entre las posibles causas de variación genética se encuentran la mutación y la actividad de transposones. Con el fin de comparar el nivel de variabilidad atribuible a estos mecanismos, se analizaron 24 variedades con diferentes tipos de marcadores: por una parte polimorfismos que se producen por mutaciones aleatorias en el genoma (18 cebadores para ISSRs, mas de 60 para RAPDs y 23 microsatélites); y, por otra, 10 cebadores específicos de secuencias homólogas a retrotransposones en cítricos, que se han utilizado por sí solos y en combinación con la técnica de AFLPs. Los resultados indican que, efectivamente, el nivel de variabilidad genética es muy bajo: pese a obtener entre 15 y 45 bandas con cada uno de los ISSRs y RAPDs, sólo dos son polimórficas y distinguen únicamente a dos de las variedades. En cambio, la amplificación de secuencias adyacentes a retrotransposones rinde un mayor número de polimorfismos. Queda demostrada la implicación de los retrotransposones en la variabilidad existente en clementinos, y postulamos que puede ser el mecanismo causante de la extraordinaria inestabilidad genética que se observa en los cítricos cultivados.

5 / 20

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ORGANIZACION GENOMICA DE *Poncirus trifoliata, Citrus volkameriana* Y *Citrus aurantium*

Ruiz, C., García, R., González, F. y Asíns, M.J.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera, Km 4.5
46113 Moncada (Valencia)

La obtención de un mapa genético de cítricos es de gran importancia para la localización de genes de interés, los estudios filogenéticos, identificación y distinción de variedades y para la selección asistida por marcadores (MAS). En Citrus spp. hay cinco mapas descritos en la bibliografía, pero son difícilmente comparables por: i) hay pocos marcadores comunes codominantes entre los diferentes mapas; ii) se han publicado sólo mapas consenso, sin considerar cada especie parental por separado; iii) las familias segregantes utilizadas son muy complejas.

Con el objetivo de desarrollar un mapa de cítricos integrado hemos estudiado tres familias segregantes: 1) autofecundación de *P. trifoliata*, 2) *C. volkameriana* X *P. trifoliata* y 3) *C. aurantium* X *P. trifoliata.* Se han analizado marcadores de tipo RFLP, RAPDs, isoenzimas y microsatélites (9 desarrollados por Kijas et al. (1997) y 13 desarrollados en nuestro laboratorio). Otro tipo de marcadores que se han analizado están relacionados con los retrotransposones y se basan en la amplificación de las regiones genómicas existentes entre dos retrotransposones utilizando cebadores específicos. Con este último tipo de marcadores también se ve la importancia que tiene la transposición en la evolución del genoma de los cítricos respecto a la aparición de cambios estructurales cromosómicos. Se ha construido un mapa para cada uno de los parentales y un mapa consenso de los dos cruces intergenéricos. Después de obtener estos mapas se ha realizado el estudio comparativo de la organización genómica de *C. ·volkameriana, C. aurantium* y *P. trifoliata*.

5 / 21

ANÁLISIS MOLECULAR DEL ESPACIADOR INTERGÉNICO DEL DNA RIBOSOMAL DE LENTEJA

Fernández Martínez, M.; Polanco, C.; Ruíz Sánchez, M.L.; Pérez de la Vega, M.
Área de Genética. Facultad de Biología. Universidad de León. 24071 León. España

El organizador nuclear (*Nor*) es un locus complejo constituido por numerosas copias de los genes para el RNA ribosomal ordenadas en tándem. Cada unidad repetida contiene las regiones codificantes, los correspondientes espaciadores internos y un espaciador intergénico (IGS). En contraste con las muy conservadas regiones codificantes, el IGS tiene generalmente suficiente variación como para permitir estudiar relaciones entre especies próximas o incluso entre poblaciones. La longitud del IGS varía en especies vegetales entre 1 y 12 Kb, pero también suele ser variable en una misma especie. Sin embargo en lenteja (*Lens culinaris* Medik.) un análisis de restricción de fragmentos generados por PCR indica que los niveles de variación son muy bajos. La variabilidad en longitud del IGS se debe a la presencia de un número variable de copias de una o más familias de secuencias repetidas. A pesar de estas diferencias el papel funcional del IGS se ha conservado.

Se ha secuenciado el IGS de lenteja, realizándose un análisis molecular comparativo con otras especies de leguminosas. El segmento secuenciado, de 3200 bp, incluye el IGS de 3059 bp y los extremos de los cistrones para el 25S y el 18S. Se han encontrado cuatro familias (denominadas A, B, C y D) de secuencias repetidas de aproximadamente 85, 170, 68 y 21 bp, respectivamente. Las secuencias C están formadas a su vez por la repetición de variantes de una secuencia más corta de 11 bp. El análisis comparativo de los IGS permite identificar secuencias y estructuras conservadas entre especies que están relacionadas con la transcripción y procesamiento. Indicamos también la existencia y proponemos la posible función de algunas secuencias conservadas que no habían sido descritas anteriormente en leguminosas.

5 / 22

USO DE LAS LÍNEAS RECOMBINANTES EN EL MAPEO GENÉTICO. CASO DE ESTUDIO: MAPA GENÉTICO DEL GARBANZO

Hajj Moussa, E.[1]; Millán, T.[2]*; Gil, J.[2] and Cubero, J.I.[2]
(1) Université Saint Joseph, ESIAM, Zahle, PB159, Líbano. Email: ge2elhae@uco.es.(2) Unversidad de Córdoba, ETSIAM, Dpto. Genética, Apdo. 3048, 14080Córdoba. Email: ge1vamit@uco.es

Para desarrollar el mapa genético de una especie es necesario disponer de: material vegetal adecuado (poblaciones en desequilibrio de ligamiento), métodos de observación y evaluación (marcadores, caracteres cuantitativos) y modelos estadísticos apropiados. En los primeros trabajos, el material vegetal utilizado para el desarrollo de los mapas genéticos ha sido casi exclusivamente poblaciones F2 o retrocruzamientos. En la ultima década con el incremento de la aplicación del mapeo para la localización de QTLs, ha aumentado drásticamente el uso de otro tipo de poblaciones como son los dobles haploides y las líneas recombinantes. Puesto que el desarrollo de las poblaciones de doble haploides no esta puesto a punto en muchas especies, el empleo de líneas recombinantes para el mapeo es muy ventajoso en muchas especies particularmente las autogamas, donde la obtención de tal material es relativamente fácil. Se han desarrollado diferentes modelos y métodos estadísticos para el tratamiento, manejo y proceso de datos generados por los estudios de mapeo. La mayoría de estos modelos son específicos de un material vegetal determinado principalmente F2, retrocruzamientos y últimamente los doble haploides. Los objetivos de este trabajo han sido los siguientes: a) Recopilar y desarrollar los modelos estadísticos necesarios para el establecimiento de grupos de ligamiento y la localización de los QTLs, estudiando la conveniencia de utilizar un modelo o otro según el caso, b) Estudiar la relación entre las diferentes pruebas estadísticas utilizadas y la influencia de diferentes factores como el tamaño de la muestra sobre la elección de los umbrales y c) Aplicar las diferentes teorías sobre los datos obtenidos del análisis de dos poblaciones de líneas recombinantes en garbanzo.

5 / 23

MAPA GENÉTICO DE LIGAMIENTO DE LENTEJA (*Lens culinaris*) BASADO EN MARCADORES RAPDs

Durán, Y. y Pérez de la Vega, M.
Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León. España.

La lenteja (*Lens culinaris* Medik.) es una leguminosa de gran valor nutritivo, siendo su contribución a la dieta humana de gran importancia en algunas zonas por el elevado contenido proteico de sus semillas. *Lens culinaris* ha sido descrita como una especie que comparativamente posee poca variabilidad genética, habiéndose obtenido un escaso número de polimorfismos en marcadores morfológicos y moleculares hasta el momento y los mapas genéticos en esta especie son todavía incompletos, consisten en un numero pequeño de marcadores, principalmente isoenzimas y RFLPs, que cubren una porción relativamente pequeña del genoma. Otros marcadores tales como RAPDs y AFLPs han sido utilizados en estudios de biodiversidad y relaciones filogenéticas entre especies del genero *Lens*. La relativa facilidad y rapidez de la técnica de los marcadores RAPDs, unido a que pueden obtenerse y analizarse sin ningún tipo de información previa sobre la especie y el genoma, nos ha llevado a la elaboración de un mapa genético inicial de lenteja basándonos en este tipo de marcadores.

El mapa genético se ha obtenido utilizando 200 individuos F_2 del cruce entre *L. culinaris culinaris* cv. Lupa y la forma silvestre *L. culinaris orientalis* para aumentar en nivel de variabilidad analizable, obteniendo un nivel relativamente alto de polimorfismo. Se uso un total de 160 cebadores en el análisis de los parentales homocigóticos, observándose diferencias de 2-3 bandas fiables en 75 de los cebadores (46,8%). Estos 75 cebadores son los utilizados en el análisis de segregación para la obtención de los grupos de ligamiento.

5 / 24

LA FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H3 CON RELACIÓN A LA ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA MEIÓTICO EN GRAMÍNEAS

Manzanero, S.[1], Jiménez, G.[1] y Houben, A.[2]

1.Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

2. Dept. of Genetics, University of Adelaide, SA 5005, Australia

Las histonas son componentes estructurales de la cromatina que representan papeles importantes en la dinámica cromosómica. La fosforilación de la histona H3 ocurre durante la mitosis y meiosis de diversos eucariotas, y se piensa que está implicada en la condensación de los cromosomas en división celular.

Hemos realizado inmunolocalización con un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de H3 en cromosomas meióticos de *Secale cereale*. Mientras en segunda división, al igual que en mitosis, la señal se concentra principalmente en la zona pericentromérica, en primera división meiótica la señal denota hiperfosforilación en todo el cromosoma.

Asimismo hemos estudiado la fosforilación de H3 en los cromosomas B de *S. cereale* y en haploides de *Triticum aestivum*. En ambos casos se observaron univalentes en meiosis con segregación ecuacional en anafase I que se vieron en segunda división como cromátidas sin pareja. Mientras que la localización de la señal en primera división meiótica es igual en univalentes que en bivalentes, en segunda división las cromátidas sin pareja no presentan la señal centromérica.

Nuestros resultados no parecen indicar que la fosforilación de la histona H3 esté relacionada directamente en la condensación cromosómica, pues las cromátidas sin pareja en metafase II no están menos condensadas que las cromátidas hermanas unidas por el centrómero. Por otro lado, es probable que la fosforilación actúe como señal para que se dé algún cambio estructural de la cromatina que facilite la conformación del cromosoma mitótico y de segunda división meiótica por un lado, y el cromosoma de primera división meiótica por otro.

5 / 25

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL GEN BOVINO ACETYL-COA CARBOXILASA, GEN CANDIDATO PARA LA SINTESIS DE GRASA.

Marcos, S.; Zaragoza, P. y Seyfert, H.M.[#].
Lab. de Genética Bioquímica.Fac. de Veterinaria.U. de Zaragoza.50013 Zaragoza.
[#]Department of Molecular Biology. FBN 18186 Dummerstorf Alemania.

La enzima Acetyl-CoA carboxilasa cataliza la primera etapa en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga. Este conocimiento biológico del papel de esta proteína sugiere considerar al gen que la codifica como gen candidato para la síntesis de grasa que además de la importancia general de la misma (formando parte de todas las membranas celulares, funcionando como depósito de energía...) a nivel de producción animal es realmente fundamental en dos niveles básicos: posible regulación en la grasa de la leche -y por tanto su correlación con proteína-y en la intramuscular.

Por ello hemos centrado nuestro trabajo en aislar y caracterizar el gen bovino que codifica para esta proteína (llamado ACACA) y en buscar variaciones genéticas para realizar estudios de asociación a determinados caracteres fenotípicos de interés en producción así como son la base para el mapeo genético del gen en estudios de ligamiento.

Presentamos parte de la estructura genómica (más de 30 kb) del gen bovino ACACA con la determinación de varios exones e intrones.También se presenta la detección de varias zonas polimórficas encontradas.

5 / 26

MAPEO GENETICO DEL GEN DE LA TRANSFERINA (TF) MEDIANTE SSCPs EN GANADO VACUNO: RELACION ENTRE EL POLIMORFISMO GENETICO Y PROTEICO

#Rodellar, C., #Roy, R. y *Laurent, P.
*Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique. INRA. Jouy en Josas
#Laboratorio de Genética Bioquímica . Facultad de Veterinaria. Univ. de Zaragoza

El mapa genético de las distintas especies de animales domésticos está teniendo un gran desarrollo en los últimos años. El presente trabajo supone una contribución al conocimiento del mapa genético de la especie bovina. A partir de la secuencia del gen de la transferina descrita en caballo , se ha amplificado un fragmento de 123 pb en el que se han analizado los SSCPs. El analisis de SSCPs ha permitido la detección de dos alelos (1 y 2). La herencia mendeliana se ha comprobado estudiando tres familias normandas de medio hermanos de padre con un total de 330 animales.Ademas del estudio de SSCPs en dichos animales, se ha tipificado tambien la proteina transferrina, detectándose 4 alelos (A, D1, D2, E). Al analizar la correspondencia entre el polimorfismo proteíco y genético, se observa que los alelos D1, A y E se corresponden con el alelo 1 y el alelo D2 con el alelo 2. Para la localizacion genética del gen de la tranferrina , utilizado el polimorfismo detectado por SSCPs, se ha aplicado el programa CRIMAP (versión 2.4). El análisis de ligamiento, mediante la opción "two point" revela la existencia de ligamiento con UWCA46 y CSSM19, dos microsatélites mapeados genéticamente en el cromosoma 1. Para el estableciemiento del mapa parcial de los tres marcadores (Tf, UWCA46 y CSSM19 se ha utilizado la opción "build" del programa CRIMAP.

5 / 27

INESTABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS A Y NO DISYUNCIÓN DEL CROMOSOMA B DE MAÍZ EN TEJIDO ARQUESPORIAL

Rosato, M.; Chiavarino, A.M.; Manzanero, S.; Jiménez, G. y Puertas, M.J.
Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

En este trabajo se estudia un comportamiento de los cromosomas A y B de maíz no descrito hasta la fecha.

Se seleccionó una línea de transmisión mendeliana y otra de baja transmisión femenina del cromosoma B de la raza Pisingallo. Para analizar estas diferencias, se estudió el comportamiento en células madres de las microsporas y en células binucleadas del tapete, encontrándose micronúcleos en la línea de baja transmisión. Para analizar la naturaleza de los micronúcleos se realizó FISH con la sonda pZmBs específica del B de maíz. Se encontró que los micronúcleos en díadas presentaron señal de dicha sonda. Se cuantificó la pérdida del B como micronúcleos en telofase I y díadas, resultando que la pérdida meiótica fue significativamente mayor en plantas de baja transmisión.

La frecuencia de micronúcleos en células binucleadas del tapete de plantas de baja transmisión fue significativamente mayor que en las de transmisión mendeliana. Los micronúcleos del tapete presentaron señal del B en el 12-20%, mientras que en el resto se encontró en los núcleos. Por lo tanto, la línea de baja transmisión presenta inestabilidad mitótica de los cromosomas A en el tapete. Además, las células binucleadas normales presentaron dos señales del B en el mismo núcleo en el 25-40% de los casos, indicando la previa no-disyunción del B. La presencia de micronúcleos en células binucleadas del tapete y la elevada frecuencia de micronúcleos en díadas en la línea de baja transmisión femenina del B pueden ser la causa de la baja transmisión del B en esta línea.

5 / 28

TRANSMISIÓN DE LOS CROMOSOMAS B EN MAÍZ

Chiavarino, A.M.[1]; Rosato, M.[1]; Rosi, P.[2]; Naranjo, C.A.[1];
Poggio L.[1,2] y Puertas, M.J.[3]
1. Inst. Fitotécnico de Sta. Catalina - CIGEN (UNLP-CONICET-CIC) 1836, Llavallol, Bs.As. 2. Dpto. de Biología, FCEyN, UBA, 1428 Bs.As., Argentina. 3. Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Univ. Complutense, 28040 Madrid.

Comenzamos los estudios de la herencia de los cromosomas B (B) en razas nativas de maíz aislando genotipos de alta y baja transmisión femenina y masculina. Mediante cruzamientos 1B x 0B, se seleccionaron genotipos que tienden a perder el B por vía materna, mientras que otros lo transmiten en forma mendeliana. Por otro lado, mediante cruzamientos 0B x 2B, se seleccionaron genotipos que presentan transmisión mendeliana y otros que acumulan los B por vía paterna. De esta manera se demostró la existencia de genes que controlan la transmisión de los B.

Posteriormente se determinó la localización de los genes que controlan la transmisión masculina de los B, realizando cruzamientos 0B x 2B entre y dentro de las líneas seleccionas para alta y baja (mendeliana) transmisión. Los resultados indicaron que el genotipo del progenitor femenino con 0B, determina la tasa con la que la oósfera es fecundada por el núcleo espermático portador de los Bs. Por lo tanto, los genes que controlan la transmisión masculina de los B están localizados en el complemento cromosómico normal (A). Por último, para determinar si la presencia de un B en el progenitor femenino (en la oósfera) afecta la acción de estos genes, realizamos cruzamientos 2B x 2B y 0B x 2B (control) dentro de las líneas de alta y baja transmisión. La transmisión masculina no difirió significativamente entre ambos tipos de cruzamientos, indicando que los genes que controlan la transmisión no se encuentran afectados por la presencia de un B en el progenitor femenino.

5 / 29

SITUACIÓN ACTUAL DEL PROYECTO COOPERATIVO INTERNACIONAL DOGMAP

Parra, D.,[1] Dolf, G.,[2] Dunner, S.,[1] & DogMap Consortium[2]
[1]Laboratorio de Genética. Dpto. Producción Animal. Facultad de Veterinaria- U.C.M. Avenida Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid. dparra@eucmax.sim.ucm.es.
[2] Institute of Animal Breeding. Universidad de Berna. Berna 3012. Suiza.

El perro se caracteriza por ser una especie en la que existen cerca de 400 razas con una gran diversidad morfológica en la que se han descrito mas de 300 patologías de carácter hereditario, muchas de ellas ligadas a razas o a líneas, lo que le convierte en una especie de interés como modelo para el estudio de enfermedades hereditarias comunes al hombre. El proyecto DOGMAP surge en 1992 auspiciado por la I.S.A.G (Internacional Society of Animal Genetics) con el objetivo de realizar un mapa genético canino de baja densidad basado en marcadores de tipo microsatélite situados a intervalos de 20 cM y asignados físicamente a cromosomas. Su utilidad radica en servir como punto de partida para el clonado posicional de genes responsables de patologías hereditarias, útil tanto para desarrollar pruebas diagnósticas como para su posible extrapolación a zonas ortólogas del genoma humano.

Actualmente se ha estudiado la segregación alélica de 201 microsatélites en 14 familias de referencia con un total de 129 individuos (23 padres y 106 hijos). Su análisis de ligamiento ha permitido determinar 37 grupos sinténicos, de los que 9 se han asignado a cromosomas. Parte de la información (marcadores estudiados, secuencias, laboratorios colaboradores, etc.) está disponible en la dirección electrónica: http://medtech.cls.msu.edu/ISL/status.htm. Más información sobre las líneas generales del proyecto se puede encontrar en: http://www.cx.unibe.ch/itz/dogmap.html

.

5 / 30

IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS DEL GENOMIO C IMPLICADOS EN TRANSLOCACIONES INTERGENÓMICAS DE *AVENA SATIVA* L., UTILIZANDO SECUENCIAS CLONADAS DE ADN REPETIDO

Linares, C.; Irigoyen, M. y Fominaya, A.
Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá.
ES-28871-Alcalá de Henares (Madrid).

Se han aislado y caracterizado cuatro secuencias de ADN repetido de una genoteca genómica de *Avena strigosa*. Las secuencias denominadas As14, As121, As93 y As111 y de 639, 730, 668 y 619 pb de longitud respectivamente, presentaron patrones de distribución diferentes en especies diploides y poliploides del género *Avena*. Mientras que secuencias homólogas a As93 y As111 están dispersas en el genoma de especies diploides y poliploides portadoras de genomios A y C, secuencias homólogas a As14 y As121 están dispersas en el genoma de especies diploides y poliploides portadoras del genomio A y ausentes en el genoma de especies diploides portadoras del genomio C. La secuenciación nucleotídica de los cuatro insertos confirmó su organización dispersa en los genomas de avena. Las cuatro secuencias se localizaron en 28 cromosomas del complemento hexaploide, con la excepción de segmentos terminales en algunos pares cromosómicos, e identificados como pertenecientes a los genomios A y D, por rehibridación de células metafásicas con la secuencia satélite, Am1, específica del genomio C. Además, regiones teloméricas de 2 y 4 pares cromosómicos del genomio C hibridaron con la secuencia As14 y As121, repectivamente. Estos pares cromosómicos implicados en translocaciones intergenómicas se identificaron como 1C, 2C, 4C y 16C, por hibridación simultánea y sucesiva de las mismas células metafásicas con secuencias ribosomales y Am1. Se discute la evolución de las cuatro secuencias en los genomas diploides y poliploides y su utilización en el conocimiento de la evolución de las translocaciones intergenómicas en otras especies poliploides del género.

5 / 31

LOCALIZACIÓN DE GENES RIBOSOMALES Y DISCRIMINACIÓN DE GENOMIOS EN ESPECIES TETRAPLOIDES AABB DEL GÉNERO *AVENA*

Irigoyen, M.; Linares, C. y Fominaya, A.
Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá.
ES-28871-Alcalá de Henares (Madrid).

Se presenta un mapa físico de la localización de genes ribosomales 5S y su posición relativa con respecto a los genes ribosomales 18S-5.8S-26S y una secuencia satélite, As120a, específica del genomio A en los cromosomas de tres especies tetraploides con genomios AABB (*A. abyssinica, A. barbata, A. vaviloviana*). Las especies mostraron cuatro pares de loci ribosomales 18S-5.8S-26S y dos pares de loci 5S localizados en ambos brazos de dos pares de cromosomas satelizados. Esta localización reúne el patrón de hibridación perteneciente a dos especies diploides de genomio A. La rehibridación de células metafásicas con la secuencia satélite, As120a, específica del genomio A reveló la presencia de elementos de la familia repetida As120a distribuídos a lo largo de ambos brazos en 14 de los 28 cromosomas de estas especies, permitiendo distinguir ambos genomios relacionados A y B. Se discute la evolución de estas especies mediante la comparación de los patrones de hibridación de la secuencia As120a en especies diploides y poliploides.

5 / 32

ESTUDIO PRELIMINAR DE LOCALIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN CROMOSOMAS DE *AVENA STRIGOSA*, UTILIZANDO MICRODISECCIÓN CROMOSÓMICA Y PCR

Loarce, Y.; Ferrer, E. y Fominaya, A.
Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá.
ES-28871-Alcalá de Henares (Madrid)

Se ha desarrollado una estrategia para la localización física de fragmentos de restricción polimórficos en longitud (RFLPs) en cromosomas de avena diploide, *Avena strigosa*. Los pares cromosómicos 2, 3 y 7 presentan características morfológicas que permiten su identificación en células somáticas no teñidas. Los pares satelizados 2 y 3 se diferencian en el tamaño del satélite y en la relación de brazos. El par 7 se caracteriza por ser el único cromosoma subtelocéntrico y el de menor tamaño del complemento.

A partir de células metafásicas de meristemos sincronizados, se aislaron siete cromosomas de cada uno de los pares cromosómicos 2, 3 y 7. El ADN total extraído de cada grupo cromosómico se amplificó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), utilizando como cebadores secuencias específicas correspondientes a un grupo de clones portadores de secuencias de copia única y pertenecientes a siete grupos de ligamiento. Los resultados permitieron asignar clones

5 / 33

COMPARACION DE RAZAS CANINAS AUTOCTONAS ESPAÑOLAS MEDIANTE MARCADORES RAPD

Morera Sanz, L., Garrido Pavón, J.J., de Andrés Cara, D.
Unidad Mixta CSIC-UCO (Marcadores genéticos moleculares). Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Córdoba.

Se describen los resultados obtenidos hasta ahora por nuestro grupo en el estudio de razas caninas autóctonas españolas mediante marcadores RAPD. Hemos trabajado con RAPDs previamente descritos como útiles para la detección de polimorfismo en razas caninas[1], y cuatro razas: Galgo español, Podenco, Perro de agua (PAE) y Alanos. Para la amplificación hemos utilizado, para cada raza, mezclas de muestras de ADN o suspensión de linfocitos de 10 animales, así como muestras individuales. La detección de los fragmentos amplificados se ha realizado por electroforesis en geles de agarosa y tinción con Bromuro de etidio. Considerando aquellas bandas que se amplifican de forma nítida y consistente, hemos encontrado diferencias entre estas razas en el número y tamaño de las bandas amplificadas. Así, hemos encontrado una banda de ≈600 pb amplificada por el RAPD-1, que se presenta solamente en los Alanos; una banda de ≈400 pb, amplificada por el RAPD-2, que no se presenta en Podencos pero sí en las otras tres razas. Las mayores diferencias entre razas se han obtenido al utilizar ambos primers simultaneamente para la amplificación (RAPD1+2): en este caso hemos observado 4 bandas en Alanos (tamaños aproximados de 400, 500, 700 y 850 pb), 2 en PAE (≈400 pb y ≈500 pb) y solamente una (≈400 pb) en Galgos y Podencos. Hemos utilizado estos dos marcadores RAPDs para amplificar muestras de cerdo, ratón, hamster y oveja. Hemos observado amplificación sólo para la primera de estas cuatro especies, con un patrón de bandas diferentes al de cualquiera de las razas caninas.

[1] Rothuizen & van Wolferen, 1994. Animal Genetics, 25: 13-18.

5 / 34

HORSE PARENTAGE TESTING USING HIGH POLYMORPHIC MICROSATELLITES: A CASE STUDY

Ginja, C.[*1]; Matos, J. [2]; Clemente, A.[2]; Rangel, T.[1]
[1]UTAD. Departamento Zootecnia/ Apartado 202, 5001 Vila Real-codex
[2]INETI/Grupo de Bioquímica II./Estr. Paço do Lumiar, 1699 Lisboa-codex

Horse interspecific hybrids (mules) are known to be sterile. A fertile female hybrid was analysed for the determination of the putative parents of a male descendent.

Parentage testing is being widely performed with microsatellite analysis, by studying the PCR amplification profiles of VNTRs regions. A list of specific primers is available for genetic variability analysis on horse breeds which have also been used on parentage testing. The aim of this study was to analyse several horse microsatellite markers for their application to hybrids, donkeys and horses.

Paternity tests were performed on four equines: putative mother, two putative fathers, male descendent. Unrelated animals were used as control. DNA was extracted from blood samples and PCR amplified with the primers: HMS2, HMS7 [1] HTG7, HTG8, HTG10 [2]. [α^{35}S]dATP was incorporated in PCR reactions. Amplification products were analysed by electrophoresis and autoradiograph detection.

All microsatellites tested were successfully amplified. However, most did not present enough variability in the present case that would allow correct parentage determination. HTG10 has produced high level of non-specific amplification. Paternity was determined by profile analysis of the PCR amplification with HTG7. The technique was adequate for hybrids, donkeys and horses. This work suggests that further screening with other markers.

References:

[1] – Guérin, G. *et al.* (1994) Animal Genetics **25**, 62.
[2] – Ellegren, H. (1994) Animal Genetics **25**, 19-23.

5 / 35

EFECTO DE LOS GENES *Ph1* Y *Ph2* EN EL COMPORTAMIENTO SINÁPTICO DE LOS TRIGOS HEXAPLOIDES

Romero, C., Carcelén, N., Martínez, M., Cuñado, N.
Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense.
28040 Madrid

Triticum aestivum es un alohexaploide cultivado de constitución genómica AABBDD que se comporta como un diploide mostrando solo bivalentes en metafase I. El estudio sináptico se realizó en núcleos tratados con la técnica de spreading, totalmente reconstruidos y clasificados en cigotena media y tardía y paquitena pertenecientes a dos genotipos: el standard y el mutante *ph1b*, con 2 y 0 dosis del gen *Ph1* respectivamente. En cada núcleo se determinó el tipo y el número de asociaciones.

Se puede ver que en ambos genotipos se completa el proceso sináptico. La media de los elementos laterales implicados en asociaciones multivalentes (ELm) en cigotena media muestra valores similares en ambos genotipos con 0 y 2 dosis del gen, pero el valor es menor que el observado en los genotipos equivalentes de los trigos tetraploides. En el genotipo standard este valor decrece progresivamente a lo largo de la profase I, sin embargo en el genotipo mutante *ph1b* la disminución de ELm solo se observó entre cigotena tardía y paquitena, manteniendo un mayor valor en esta fase que el genotipo standard con 2 dosis del gen *Ph1*. Se discute el efecto de este gen en el mecanismo de diploidización.

Se han analizado con la misma técnica núcleos pertenecientes al mutante *ph2b*. Los resultados parecen indicar que el efecto de este gen es distinto al del *Ph1*, afectando principalmente a la progresión de la sinapsis.

5 / 36

CAMBIOS CROMOSOMICOS EN LA EVOLUCIÓN DE LA TRIBU TRITICEAE

Naranjo, T., Rodríguez, S., Perera, E. y Maestra, B.
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España

La estructura cromosómica de las especies diploides (2n = 2x = 14) *Secale cereale* (RR), *Aegilops longissima* (S^lS^l), *Ae. sharonensis* ($S^{sh}S^{sh}$), *Ae. speltoides* (SS), de los trigos tetraploides (2n = 4x = 28) *Triticum turgidum* (AABB) y *T. timopheevii* (A^tA^tGG), y del trigo hexaploide (2n = 6x = 42) *T. aestivum*, fue analizada mediante el estudio del apareamiento cromosómico en metafase I en híbridos de trigo hexaploide con las restantes especies. Los cromosomas y brazos implicados en las diferentes asociaciones cromosómicas observadas en metafase I fueron identificados mediante la técnica de bandeo-C. La estructura de los diferentes genomios se estableció tomando como referencia el genomio D del trigo hexaploide. Los resultados indican que los genomios de *Ae. sharonensis* y *Ae. speltoides* conservan la estructura cromosómica primitiva mientras que *Ae. longissima* presenta una translocación entre los brazos largos de los cromosomas 4 y 7 y *S. cereale* sufrió multiples translocaciones que implican a seis de sus siete cromosomas. Los trigos tetraploides, *T. turgidum* y *T. timopheevii*, se originaron por hibridación entre las mismas especies parentales, *T. urartu* (AA) y *Ae. speltoides* (SS), pero acumularon diferentes modificaciones cromosómicas en su evolución. Esa diferente reorganización cromosómica apoya un origen difilético de estas dos especies alotetraploides. El diferente grado de afinidad del genomio S con los genomios G y B sugiere también una separación en el tiempo en la aparición de ambos poliploides. El número de cambios estructurales observado en los trigos poliploides contrasta con el alto grado de conservación de la colinealidad genética que muestran sus especies diploides parentales, lo cual apoya la idea de que la poliploidización ocurre acompañada de una masiva reorganización del genoma.

5 / 37

ANÁLISIS DEL USO DE AFLPs COMO CARACTERIZADORES DEL GENOMA DE *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA)

Escriche Soler, B., Herrero Sendra, S., Ferré Manzanero, J.
Departamento de Genética. Facultat de CC. Biológiques. Universitat de València. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot (València). escrichb@uv.es

Las técnicas de genética molecular están siendo usadas de forma generalizada para determinar la variabilidad genética de las poblaciones. Además, estas técnicas han hecho posible la obtención de marcadores de genes específicos en organismos de los que no se dispone, prácticamente, de ninguna información previa acerca de sus genomas.

En el presente trabajo se ha estudiado el uso de la técnica de amplificación de fragmentos de restricción polimórficos (AFLP) para la caracterización del genoma de una importante plaga hortícola como es la polilla de las crucíferas, *Plutella xylostella* (L.).

La técnica de AFLP evita significativas dificultades de otras técnicas de análisis molecular, como RAPDs y RFLPs, ya que requiere poca cantidad de DNA genómico y, para genomas simples, es altamente reproducible. El uso de AFLPs en genomas complejos no ha sido cuantitativamente contrastado, así que procedimos al análisis mediante esta técnica del genoma de *P. xylostella*.

Los resultados muestran un alto número de fragmentos polimórficos, con alto grado de reproducibilidad en los patrones de fragmentos obtenidos de cada individuo. La etapa de desarrollo del insecto de donde procedía el DNA no tuvo repercusión en el patrón de fragmentos. Aunque, por otra parte, la técnica resulta influenciada por el método específico de extracción de DNA genómico.

El uso de AFLPs puede ayudar a conocer la estructura poblacional y la variabilidad genética existente en esta especie de insecto. Así mismo, el ligamiento de fragmentos específicos a genes de resistencia puede contribuir al control de esta plaga.

5 / 38

ARQUITECTURA NUCLEAR DE LOS CROMOSOMAS ACCESORIOS DEL CENTENO Y SU RELACIÓN CON EL APAREAMIENTO CROMOSÓMICO

Díez, M.; Jiménez, G.; Puertas, M.J.
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid

Los cromosomas accesorios o cromosomas B de centeno muestran un comportamiento propio durante la gametogénesis. En la fase de apareamiento meiótico y especialmente cuando existen más de dos brazos cromosómicos la sinapsis no se produce al azar sino que se manifiesta una tendencia a formar bivalentes en vez de multivalentes (cromosomas B estándar) o a formar univalentes autoapareados (isocromosomas B grandes).

Se ha analizado, mediante hibridación *in situ* con la sonda subtelomérica D1100 para el brazo largo de los cromosomas accesorios, la disposición en el núcleo de dichos cromosomas en células mitóticas, en premeiosis y en fases tempranas de la meiosis, utilizándose para este estudio plantas con distintas combinaciones de número y tipo de cromosomas accesorios.

Los cromosomas B estandar se disponen en el núcleo ocupando un dominio por cromosoma, los isocromosomas presentan también un único dominio por cromosoma pero mediante la sonda podemos afirmar que los dos telómeros idénticos están íntimamente asociados. Durante la premeiosis y la meiosis, puede observarse cambios en la morfología y disposición del marcaje en el núcleo.

Se discute la posible relación entre la disposición de estos telómeros en células pre-, y meióticas con las preferencias de apareamiento observadas en estos cromosomas.

5 / 39

PERIODICIDAD 3 EN SECUENCIAS DE ADN: PRESENCIA Y AUSENCIA EN RELACION A DISTINTAS CATEGORIAS EVOLUTIVAS.

THREE-PERIODICITY OF DNA SEQUENCES: PRESENCE AND ABSENCE REGARDING TO EVOLUTIONARY CATEGORIES.

Barral P., J.(1), Hasmy, A.(2) y Naveira F., H.(1)
(1)Departamento de Biologia Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus a Zapateira, S/N 15071 A Coruña, España.
(2)Laboratorio de Fisica Estadistica de Sistemas Desordenados, Centro de Fisica, IVIC, Apartado 21827, Caracas 1020A, Venezuela.

We computed the spectral densities of DNA chains decomposed into binary nucleotide sequences for different evolutionary categories (phages, bacteria, viruses, yeasts, organelles, vertebrates and invertebrates, with sizes between 16.000 – 300.000 nt.). It is shown that, in contrast to other evolutionary categories, a three-periodicity does not exist in sampled DNA sequences from vertebrates. A systematic study of the composition of DNA chains reveals that this peridodicity exists only in sequences containing approximately more than 25 % of protein coding regions. Evolutionary considerations are briefly disscused.

Se calcularon las densidades espectrales de cadenas de ADN descompuestas en secuencias de nucleotidos binarios para distintas categorias evolutivas (bacteriofagos, bacterias, virus, levaduras, organelos, vertebrados e invertebrados, el tamaño de dichas secuencias fue entre 16.000 y 300.000 nt.). Se demuestra que, en contraste con las otras categorias evolutivas, una periodicidad 3 no se observa en las secuencias completas de ADN estudiadas en vertebrados. Un estudio sistematico de la composicion de las cadenas de ADN revela que esta periodicidad 3 solo aparece cuando las secuencias contienen aproximadamente mas del 25 % de regiones codificantes para proteina. Se discuten brevemente algunas consideraciones evolutivas.

5 / 40

TECNICA DE MODELADO NO-LINEAR PARA EL ANALISIS DE CADENAS DE ADN

NONLINEAR MODELING TECHNIQUE FOR THE ANALYSIS OF DNA CHAINS

Barral P., J.(1), Hasmy, A.(2), Jimenez, J.(3) y Marcano, A.(3).
(1)Departamento de Biologia Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus a Zapateira, S/N 15071, A Coruña, España.
(2)Laboratorio de Fisica Estadistica de Sistemas Desordenados, Centro de Fisica, IVIC, A.P. 21827, Caracas 1020A, Venezuela.
(3)Laboratorio de Fenomenos no Lineales, Escuela de Fisica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, A.P. 52120, Caracas 1050 A, Venezuela.

Using a simple computational procedure, we examine DNA chains from different species in order to investigate their nonlinear deterministic structures. This procedure applies a nonlinear modeling technique based upon quantitative comparison of the neighborhoods from similar DNA subsegments of size d. Our results reveal that intronic regions exhibit a deterministic signature at sizes larger than a characteristic dimension d_c. Applications to evolutionary categories and recognition of different DNA regions are discussed.

Utilizando un procedimiento computacional simple, se examinaron cadenas de ADN de diferentes especies con el objetivo de comprobar sus estructuras lineares no-deterministas. Este procedimiento utiliza una tecnica de modelado no-linear basado en la comparacion cuantitativa de los nucleotidos adyacentes a subsegmentos similares de ADN de tamaño d. Los resultados revelan que las regiones intronicas exhiben una firma deterministica cuando utilizamos tamaños superiores a una dimension caracteristica d_c. Se discuten las posibles aplicaciones con referencia al reconocimiento entre distintas regiones del ADN, asi como su comportamiento entre las distintas categorias

5 / 41

CARTOGRAFÍA GENÉTICA DE LA REGIÓN FLANQUEANTE AL GEN DE RESISTENCIA AL VIRUS DEL MOTEADO NECRÓTIDO DE MELÓN (MNSV)

Lozano, R., Noguera, J., García, E., Angosto, T.[#] y Capel, J.
Dpto. de Biología Aplicada (Unidad de Genética) y [#] Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería

Trabajos anteriores permitieron la identificación y mapeo de cuatro marcadores RAPD ligados al gen *nsv* que confiere resistencia al virus del moteado necrótico de melón (MNSV), utilizando para ello una estrategia BSA (*Bulk Segregant Analysis*). Uno de estos marcadores, *cri1*, se encuentra estrechamente ligado (0,9 cM) toda vez que sólo se encontró un individuo recombinante en la población analizada. A partir de estos resultados se han diseñado nuevos "bulks" al objeto de reducir la zona próxima al gen *nsv* y localizar nuevos marcadores en posiciones más cercanas que *cri1*, empleando en este caso marcadores altamente polimórficos como son los AFLP.

En estos momentos se han ensayado más de 60 combinaciones de cebadores AFLPs, habiéndose encontrado 6 marcadores ligados al locus *nsv*, uno de ellos de naturaleza codominante. Las distancias genéticas establecidas por el momento son iguales o menores a 0.9 cM, y en algunos casos, la ausencia de individuos recombinantes en la población de mapeo hace pensar en distancias de ligamiento muy cercanas al gen de interés, e incluso en la posibilidad de marcadores intragénicos.

Se discute la utilidad de la estrategia empleada y de la técnica AFLP en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares estrechamente ligados al gen de *nsv*, así como su valor para afrontar el clonaje posicional de dicho gen.

5 / 42

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORTUGUESE COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) GERMPLASM

Ana Maria Carvalho[1], Alvaro Queiroz, A., Manuela Veloso,
Eliseu Bettencourt and Luís Gusmão.
Estação Agronómica Nacional, Oeiras, Portugal, and
[1]Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Several accessions of the common bean, *Phaseolus vulgaris* L., collected in the Northeast of Portugal and maintained in the Genebank-Genetics, EAN, at Oeiras, have been grown, *in situ* (under the same geagraphical and agricultural practices) for phenotypical characterization. Besides the morphological caracterization of the material, with the results so far achieved (using a sample of 10 plants from each of the 13 accessions under characterization), we ilustrate our expectations that the molecular characterization, through RAPD, will allow us to assess the quality of our bean collection, both in its variability and presence of duplicates, and to draw the philogenetic relationships between these traditional cultivars of common beans.

workshop
modificación genética y
medio ambiente

MEJORA DE CEPAS DEL HONGO FILAMENTOSO *TRICHODERMA HARZIANUM* PARA SU UTILIZACION COMO BIOFUNGICIDAS

Benítez, T., Rey, M., Limón, M.C., Rincón, A. y Delgado-Jarana, J.
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla,
Apartado 1095, E-41080 Sevilla

Las cepas del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* han sido las más utilizadas como biofungicidas, debido a su adaptabilidad y a su eficacia en el campo. El antagonismo lo ejercen compitiendo por el espacio y produciendo antibióticos y/o enzimas líticos que degradan las paredes de los patógenos a los que atacan. De ahí que se haya intentado obtener cepas mejoradas para el biocontrol incrementando su capacidad lítica.

Esta capacidad lítica podría no ser un simple mecanismo de dosis génica, sino la resultante de un sistema de regulación transcripcional, junto con mecanismos de regulación post-traduccional que incluiría, entre otros, modulación del transporte y secreción de proteínas, estabilidad de dichas proteínas en distintas condiciones, incluyendo condiciones extremas como bajos pH, y eficiencia en el reconocimiento, unión y degradación de los sustratos. Una mayor producción de enzimas requeriría por lo tanto un conocimiento previo de las características cinéticas y otras propiedades de estas proteínas, así como de los mecanismos de regulación de los genes que las codifican.

El aislamiento de algunas hidrolasas como quitinasas y glucanasas que degradan los polímeros mayoritarios de las paredes de los hongos patógenos, han indicado características muy diferentes para enzimas que actúan sobre un mismo sustrato. Se han aislado de una cepa de *T. harzianum*, CECT 2413, dos endoquitinasas de 33 y 42 KDa. que muestran además de diferencias en el tamaño de las moléculas que reconocen y en los productos finales que liberan, diferencias de estabilidad y sensibilidad a proteolisis a bajos pH. El aislamiento y caracterización de los promotores de los genes que las codifican parecen indicar también sistemas de regulación diferentes. Por ejemplo, diferencias de regulación entre el gen *chit42* que codifica la quitinasa de 42 KDa., mas inestable a bajos pH, y el gen *chit33*, que codifica la quitinasa de 33 Kda. Tales diferencias de comportamiento también se aprecian en genes de otras hidrolasas tales como el gen *bgn16.2* que codifican una β-1,6-glucanasa, el gen *bgn13..1* que codifica una β–1,3-glucanasa también muy inestables a bajos pH, e incluso genes de proteínas no hidrolíticas como el gen *qid74* que codifica una proteína de pared probablemente implicada en protección frente a condiciones hostiles.

En todos los casos, las diferencias de regulación de estos genes, reflejadas en los niveles de mRNA en distintas condiciones, y la presencia de proteinas y/o actividades enzimáticas en las mismas condiciones anteriores, indican por una parte, que dichos genes en *T. harzianum* poseen al menos dos mecanismos de control, uno transcripcional y otro postraduccional. Si se sometieran los genes al control de promotores constitutivos, se eliminaría sólo el primer control.

Los transformantes de *T. harzianum* que han expresado genes de hidrolasas bajo el control del promotor constitutivo del gen de la piruvato kinasa (*pki*) muestran una gran cantidad de mRNA pero en determinadas condiciones tales como bajos pH esta expresión no se traduce en mayores niveles de enzimas líticos, posiblemente debido a la existencia del segundo sistema de control, el post-traduccional, que inactiva y proteoliza dichas enzimas. En estos momentos se han obtenido transformantes de *T. harzianum* con mayor capacidad lítica cuando los genes de hidrolasas regulados por el promotor *pki* se expresan en medios tamponados. Estos transformantes poseen *in vitro* mayor agresividad contra hongos patógenos que la cepa silvestre. Pero para su uso en el campo sería conveniente utilizar como receptores cepas deficientes en proteasas, o modificar las hidrolasas haciéndolas menos sensibles a la proteolisis. Por otra parte, hay que tener presente esta complejidad en la regulación para entender que no se pueden obtener cepas mejoradas simplemente aumentando el número de copias o la intensidad en la expresión de los genes de las hidrolasas.

La existencia de sistemas de regulación post-traduccionales también permite diseñar el aislamiento de cepas con mayor capacidad lítica, sin manipular los promotores de los genes de las enzimas correspondientes, es decir sin alterar el primer sistema de control. De hecho, se han aislado cepas supersecretoras donde la actividad de las enzimas extracelulares es entre 2 y 4 veces la de las cepas silvestres, pero donde el nivel de mRNA es similar. Estas cepas, como en el caso de los transformantes que superproducen hidrolasas, muestran *in vitro* mayor agresividad contra hongos patógenos que la cepa silvestre.

Actualmente también se están construyendo cepas con mayor capacidad para degradar sustratos insolubles -como paredes de hongos- mediante la fusión a los genes de las quitinasas de un dominio de unión a sustrato lo que les hará aumentar su afinidad y su actividad específica. Este aumento de afinididad se traducirá con toda probabilidad en el desarrollo de nuevas cepas más agresivas contra patógenos y por lo tanto en mejores agentes de biocontrol.

Referencias

I.García et al. Curr. Genet. 27: 83-89 (1994)
J. de la Cruz et al. J. Bacteriol. 177: 1864-1871 (1995)
J.M.Lora et al. Mol. Gen. Genet. 247: 639-645 (1995)
M.C.Limon et al. Curr. Genet 28: 478-483 (1995)
J.de la Cruz et al. J. Bacteriol. 177: 6937-6945 (1995)
M. Rey et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6212-6216 (1998)
M.C.Limón et al. Phytopathology 89: 254-261 (1999)

DISEÑO DE BIOCATALIZADORES PARA LA DESULFURACIÓN DE PETRÓLEO

José L. García, Beatriz Galán y Eduardo Díaz
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

La eliminación del azufre de los combustibles fósiles, que técnicamente se conoce como proceso de desulfuración, ha propiciado muchos estudios y desarrollos tecnológicos debido a que la combustión de las moléculas de azufre en el carbón y petróleo conlleva la producción de óxidos de azufre (1-5). Estos compuestos tan corrosivos son la principal causa de la denominada lluvia ácida que, como es bien conocido, ejerce un gran impacto negativo sobre el medio ambiente. El ácido sulfúrico que se forma como consecuencia última de la combustión y la reacción de los óxidos de azufre liberados con el agua de la atmósfera se deposita mediante las lluvias en la biosfera provocando numerosos problemas sobre los seres vivos. Es, por consiguiente, razonable que exista un tremendo interés por reducir la emisión a la atmósfera de los óxidos de azufre, lo que ha motivado que las regulaciones medioambientales de muchos países se hayan hecho mucho más estrictas con los niveles de azufre permitidos en los combustibles fósiles (1).

Después del carbono y del hidrógeno, el azufre es el elemento químico más abundante en el petróleo, oscilando entre un 0.05 y un 5 % en peso en función de la procedencia del crudo (1-5). La mayoría del azufre que se encuentra en el petróleo es de tipo orgánico, siendo muy pequeña la cantidad de sulfuro de hidrógeno y de azufre elemental que se encuentran disueltos. Como regla general, se puede afirmar que cuanto mayor es la densidad del crudo mayor contenido en azufre posee y de esto se deduce que la distribución del azufre en un determinado crudo es tal que los compuestos del azufre se concentran progresivamente a medida que el rango de ebullición de las fracciones se incrementa.

Esencialmente la eliminación del azufre orgánico en el petróleo requiere la rotura selectiva de los enlaces C-S y la concomitante separación del azufre en otra corriente independiente para facilitar su eliminación. La industria del petróleo es actualmente capaz de producir combustibles con un contenido en azufre de 300 a 500 ppm, utilizando procesos de hidrodesulfuración por el que se someten las fracciones de petróleo a un tratamiento hidrogenolítico a altas presiones y temperaturas con la ayuda de catalizadores. La reducción a niveles más bajos puede suponer un coste muy elevado, ya que requiere la instalación de nuevas plantas de desulfuración, el desarrollo de nuevos catalizadores y el rediseño de algunos procesos.

Como solución alternativa o complementaria a los procesos químico-físicos desde hace algunos años se ha venido estudiando la posibilidad de desulfurar los combustibles fósiles utilizando procedimientos biológicos a los que se les denomina genéricamente procesos de biodesulfuración (1-5). En síntesis, el proceso de biodesulfuración consiste en la eliminación del azufre mediante el uso de microorganismos como biocatalizadores.

En algunos microorganismos se han encontrado rutas para la eliminación selectiva del azufre en sus derivados orgánicos que extraen el azufre sin utilizar el resto de la molécula como fuente de carbono y energía, de tal manera que el microorganismo emplea dicha molécula sólo como fuente de azufre. A estas rutas se les ha denominado rutas 4S ya que se realizan a través de cuatro pasos enzimáticos. A finales de la década de los 80 los investigadores del Institute of Gas Technology (IGT) de USA encontraron una bacteria que supuso un verdadero salto cualitativo en el campo de la biodesulfuración (6,7). Esta cepa se clasificó como *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y era capaz de eliminar selectivamente el azufre del dibenzotiofeno (DBT), uno de los compuestos organosulfurados más abundantes en el petróleo y que se utiliza como compuesto modelo en los estudios de biodesulfuración.

Los estudios bioquímicos y genéticos más recientes han permitido obtener una información muy precisa sobre la ruta 4S (6,7). Tres de las enzimas responsables de la ruta están codificadas en un operón denominado *dszABC*. Los genes *dszA, dszB* y *dszC* (anteriormente llamados genes *sox*), codifican las monooxigenasas DszA y DszC y la desulfinasa DszB. La cuarta enzima implicada en este proceso es una FMN-NADH oxidorreductasa denominada DszD que proporciona el poder reductor necesario para la catálisis y cuyo gen no se encuentra en el mismo operón que los anteriores.

La bacteria *R. erythropolis* IGTS8 presenta algunos inconvenientes para su uso como biocatalizador en el proceso de desulfuración, entre ellos, una baja eficiencia de desulfuración de DBT y una estricta represión de la expresión de los genes *dsz* en presencia de fuentes sencillas de azufre como sulfato o metionina. Por ello, nuestro grupo se propuso mejorar el biocatalizador resolviendo algunos cuellos de botella del proceso mediante el empleo de la ingeniería genética. Para ello, los genes *dsz* de *R. erythropolis* IGTS8 se transfirieron a *Pseudomonas putida*, una bacteria en la que se dispone de muchas herramientas para su manipulación genética y a una *Pseudomonas aeruginosa* productora de un surfactante natural que podría facilitar el contacto en la bacteria y el petróleo (8).

Se ha construido un plásmido de amplio espectro de huésped denominado pESOX3 que expresa constitutivamente los genes *dszABC* bajo el control del promotor *Ptac* y que confiere a las cepas de *Pseudomonas* la capacidad de utilizar DBT como única fuente de azufre.

Con objeto de estabilizar la expresión de los genes *dsz* en los huéspedes heterólogos, se ha diseñado una casete *Ptac-dszABC* en un minitransposón (plásmido pESOX4) que una vez transferida a las cepas de *P. putida* y *P. aeruginosa* ha permitido obtener dos nueva cepas recombinantes denominadas *P. putida* EGSOX y *P. aeruginosa* EGSOX, las cuales levan integrados los genes *dszABC* en el cromosoma y muestran una buena capacidad de desulfurar DBT superior a la de *R. erythropolis*.

Los estudios actuales se dirigen hacia la obtención de cepas recombinantes más eficaces mediante la incorporación en estas cepas de genes que codifican para FMN-

NADH oxidorreductasas (equivalentes a DszD), que incrementen esta actividad imprescindible para el proceso. También se está investigando mediante aproximaciones genéticas el papel que juega la desulfinasa DszB como posible cuello de botella del proceso.

Referencias

1.- McFarland, B. L., et al. (1998) Biocatalytic sulfur removal from fuels: Applicability for producing low sulfur gasoline. Crit. Rev. Microbiol. 24, 99-147.

2.- Bressler, D. C., et al. (1998) Ring cleavage heterocycles: how does it happen? Biodegradation 8, 297-311.

3.- Kropp, K. G. y Fedorak, P. M. (1998) A review of the ocurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. Can. J. Microbiol. 44, 605-622.

4.- Finnerty, W. R. (1992) Fossil resource biotecnology: challenges and prospects. Curr. Opin. Biotechnol. 3, 277-282.

5.- Monticello, D. J. y Finnerty W. R. (1985) Microbiial desulfurization of fossil fuels. Ann. Rev. Microbiol. 39:371-389.

6.- Denome, S. A., et al. (1994) Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. J. Bacteriol. 176, 6707-6716.

7.- Oldfield, C., et al. (1997) Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurisation by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). Microbiology 143, 2961-2973.

8.- Gallardo, M. E., et al. (1997) Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. J. Bacteriol. 179, 7156-7159.

ORGANISMOS TRANSGÉNICOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL. MITOS Y REALIDADES

Armand Sánchez Bonastre
Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Patologia i Producció Animals,
Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra.

La manipulación del genoma animal, iniciada en 1980 cuando Gordon y col. describieron por primera vez la obtención de ratones transgénicos, permitió pensar en la aplicación de las mismas técnicas en las especies de interés ganadero, especialmente después de los espectaculares resultados obtenidos en ratones transgénicos para el gen de la hormona del crecimiento por Palmiter y col (1982).

A pesar de la relativa ineficiencia en los protocolos de obtención de animales transgénicos en las especies domésticas, basados fundamentalmente en la microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos que posteriormente son transferidos a madres receptoras, la transgénesis en mamíferos domésticos ha constituido un activo campo de investigación en los últimos 15 años.

Desde la obtención en 1985 del primer animal transgénico en una especie doméstica los avances en este campo se han visto limitados por la baja frecuencia de obtención de transgénicos (inferior al 1% en las especies domésticas), los largos intervalos generacionales y en consecuencia los elevados costes de la técnica. Adicionalmente, el escaso conocimiento de la base genética de los principales caracteres de interés ganadero ha restringido considerablemente su utilización. El desarrollo de técnicas más eficientes de transgénesis en el ratón, cómo el cultivo de células totipotentes, ha cosechado escasos éxitos en otras especies.

Sin embargo, los avances recientes en las técnicas de clonación en mamíferos, mediante transferencia nuclear a partir de cultivos celulares, y su aplicación a la transgénesis animal han abierto nuevas expectativas para este campo en el área de la Producción Animal.

Tradicionalmente el interés de los animales domésticos transgénicos se ha centrado en cuatro áreas principales: la mejora de los caracteres productivos, la resistencia a enfermedades, su utilización como modelos de enfermedades humanas y la síntesis de proteínas de alto valor añadido.

Mejora de los caracteres productivos

La tecnología de la transgénesis es potencialmente útil para modificar caracteres de importancia económica de una forma rápida y precisa. A diferencia de las técnicas de selección clásicas, es necesario un conocimiento de los genes que controlan estos caracteres y su regulación.

Crecimiento. En gran parte de los primeros trabajos en especies domésticas (cerdo,

oveja, conejo) se utilizó la hormona de crecimiento dirigida por el promotor de la metalotioneína para controlar su expresión. En estudios posteriores se utilizaron, además de la hormona de crecimiento, el factor liberador de la hormona de crecimiento, IGF-I, cSKI y un receptor de estrógenos (Cameron *et al.*, 1994; Pursel, 1995), dirigidos por diversos promotores. Se consiguieron cerdos y ovejas transgénicas que presentaban niveles elevados de la hormona de crecimiento en el suero. Sin embargo, no se observó un incremento de su tasa de crecimiento y sólo en algunas líneas aumentó la ganancia media diaria cuando se suplementó la dieta con proteínas. Los mayores efectos se observaron en la reducción de grasa en la canal. Sin embargo, un número elevado de diferentes patologías y una reducción de la capacidad reproductiva fueron descritas en estos animales. Los promotores utilizados no han permitido un control eficiente de la expresión del transgén y, actualmente, se está trabajando con construcciones más complejas que activen o repriman la expresión del transgén de una forma más precisa.

Producción de lana. Los objetivos son mejorar la producción de lana de oveja y modificar las propiedades de su fibra. Debido a que la cisteína parece ser el aminoácido limitante en la síntesis de lana, la primera aproximación para incrementar su producción consistió en transferir genes bacterianos de biosíntesis de cisteína al genoma ovino. Sin embargo, esta aproximación no logró la expresión eficiente de estos enzimas en el rumen de las ovejas transgénicas (Ward y col., 1999). Otra estrategia consistió en dirigir la expresión de IGF-I al folículo de la lana mediante la utilización de un promotor específico (Damak *et al.*, 1996). Con esta aproximación se ha conseguido incrementar la producción de lana (expresada como peso neto) en un 6,2 % como promedio con respecto a los animales no transgénicos. Esta ha sido la primera demostración de la mejora de un carácter productivo en especies domésticas por transgénesis sin que se observaran efectos deletéreos o secundarios en los animales obtenidos.

Composición de la leche. Las proteínas lácteas están codificadas por genes de copia única que pueden ser alterados para modificar la composición y propiedades de la leche. Entre las diferentes aplicaciones de la modificación de la leche en animales transgénicos (Murray y Maga, 1999) podemos destacar las siguientes:

a) Maternizar la leche de vaca para hacerla más apropiada al consumo de los lactantes. Las principales diferencias entre la leche humana y la bovina son la ausencia de β-lactoglobulina (β-LG), una mayor relación de proteínas séricas/caseínas, y un elevado contenido en lactoferrina y lisozima. La lactoferrina es responsable del transporte de hierro e inhibe el crecimiento bacteriano. Para introducir la lactoferrina humana en la leche bovina, se han obtenido vacas transgénicas (Krimperfort *et al.*, 1991), pero no se ha descrito posteriormente los niveles de producción de lactoferrina en la leche de estos animales. La eliminación de la β-LG en la leche de vaca sería otro objetivo interesante debido a que es uno de los principales determinantes de alergia a la leche.

b) Reducir el contenido de lactosa en la leche para permitir su consumo a las personas

con intolerancia a la lactosa. Se estima que un 70% de la población mundial es deficiente en lactasa intestinal, enzima necesaria para digerir la lactosa. La reducción en lactosa se podría conseguir expresando β-galactosidasa en la leche o disminuyendo su contenido en α-lactalbúmina (α-LA). En ratones transgénicos en los que se ha inactivado el gen de la α-LA (Stinnakre *et al.*, 1994), se obtiene una leche sin α-LA y lactosa. Sin embargo, ésta es muy viscosa y no se secreta al exterior de la glándula mamaria debido a la importancia de la lactosa en la osmoregulación de la leche.

c) Alterar el contenido de caseínas de la leche para incrementar su valor nutritivo y el rendimiento en la producción de queso. En esta línea se ha propuesto incrementar el número de copias del gen de la k-CN, la reducción del tamaño de las micelas y la modificación de la k-CN para hacerla más susceptible a la digestión con quimosina, aunque sólo se han realizado trabajos utilizando el ratón como modelo (Gutiérrez-Adan y col. 1996).

Resistencia a enfermedades

Las aproximaciones que se están realizando incluyen la transferencia de genes de resistencia naturales, de anticuerpos y de proteínas de la membrana vírica (Pursel, 1995). Diferentes anticuerpos se han utilizado para generar cerdos y ovejas transgénicas, pero suelen formarse anticuerpos quiméricos constituidos por cadenas ligeras codificadas por el transgén y cadenas pesadas codificadas por genes del propio animal, que no muestran la especificidad deseada.

La expresión de un transgén que codifica una proteína de la envuelta del virus de la leucemia avícola ha permitido obtener aves de corral resistentes al subgrupo A de este virus, pero no al subgrupo B. En ovejas se ha introducido el gen de la envuelta proteica del retrovirus *visna* y los animales transgénicos obtenidos expresan el gen, pero no se ha podido demostrar su resistencia a la infección vírica (Wall 1996).

Modelo animal para enfermedades humanas

Los ratones transgénicos han sido ampliamente utilizados como modelo de enfermedades genéticas humanas, para ello se elimina el gen o se reemplaza por una forma mutada del mismo, aunque seria útil disponer de animales de mayor tamaño como modelo. En este sentido se ha propuesto utilizar ovejas transgénicas como modelo de la fibrosis cística (Wilmut y col. 1999).

Síntesis de productos biomédicos y órganos para transplantes

Es la aplicación de la transgénesis en animales domésticos que ha dado mayores éxitos y ha permitido la síntesis de proteínas terapéuticas humanas de difícil obtención por otros medios.

La glándula mamaria ha demostrado ser el órgano ideal para la expresión de proteínas recombinantes por su elevada capacidad de síntesis, los escasos riesgos que presenta

la expresión del transgén sobre la salud del animal y la facilidad de recolección y purificación del producto. La estrategia seguida para expresar proteínas en la glándula mamaria en lactación consiste en la utilización de construcciones que contienen la región codificante del gen que se desea expresar, fusionado con las regiones reguladoras de los genes que codifican para las proteínas lácteas. Se han empleado promotores de diversos genes de proteínas lácteas, incluyendo la β-LG ovina y caprina, la αS1-CN bovina, la κ-CN de vaca, rata y conejo y la WAP de ratón y conejo.

Mediante esta aproximación se han obtenido ovejas, cabras, vacas, cerdos y conejos transgénicos con expresión específica en glándula mamaria de diversos productos terapéuticos. El resultado más espectacular obtenido corresponde a la expresión de α_1-antitripsina (α_1AT) humana controlada por el promotor de la β-LG ovina. Así, ovejas transgénicas para esta construcción produjeron hasta 37,5 g/l de α_1AT, es decir, más del 50% del contenido total de proteína de la leche. Resultados comercialmente interesantes también han sido descritos en la expresión, en cabras transgénicas, del activador tisular plasminógeno dirigido por el promotor de la β-CN caprina y en la expresión, en cerdos transgénicos, de la proteína C humana controlada por la WAP de ratón (revisado en Murray y Maga, 1999).

En fase preliminar, se encuentra la producción de hemoglobina humana en cerdos y la modificación de órganos en animales transgénicos, principalmente cerdos, para disminuir el rechazo en el transplante de estos órganos a humanos (revisado en Wall, 1996), aunque la existencia de provirus en el genoma porcino puede suponer un riesgo que debe ser evaluado.

Perspectivas Futuras

Las técnicas para la obtención de animales transgénicos en especies de interés ganadero son todavía ineficientes. Algunas aproximaciones que podrían soslayar este problema se basan en las estrategias de clonación por transplante nuclear. Tras el éxito que supuso la obtención de *Dolly*, el primer mamífero clonado a partir de células diferenciadas (Wilmut y col., 1997), la clonación mediante transplante nuclear se ha experimentado con éxito en el ratón (Wakayama y col. , 1998) y en el ganado bovino (Cibelli y col. 1998[a]). Mediante estas técnicas es factible reducir a menos de la mitad el número de hembras receptoras de embriones, uno de los factores económicos limitantes en las especies domésticas. La aplicación de esta técnica a la transgénesis no se ha hecho esperar en ovejas (Schnieke y col., 1997), bovino (Cibelli y col 1998[b)] y cabras (Baguisi y col., 1999) facilitando la proliferación de animales transgénicos ya evaluados. Sin embargo, resultados recientes (Renard y col., 1999) relacionan estas técnicas con elevadas tasas de mortalidad perinatal que deberán ser evaluadas antes de generalizar su aplicación.

Otra estrategia alternativa se basa en la utilización de espermatozoides como vectores en la integración de los transgenes. Inicialmente descrita por Lavitrano y col (1989) en ratones, su eficiencia fue cuestionada por el fracaso de otros grupos que trataron de

reproducir el mismo experimento. Una modificación muy eficiente de esta técnica, que utiliza la coinyección de espermatozoides y ADN, ha sido descrita en el ratón (Perry y col., 1999) y dada la elevada tasa de transgénicos obtenidos (un 20%) su aplicación en las especies domésticas parece prometedora.

Con independencia del protocolo utilizado en la transgénesis de especies ganaderas, para obtener mayores garantías de éxito, es importante probar la eficiencia y especificidad de expresión de una construcción en ratones transgénicos antes de ser transferida a una especie doméstica. Aunque no siempre los resultados obtenidos en el ratón son extrapolables a otras especies. Una alternativa reciente consiste en la transformación de tejidos somáticos de animales desarrollados, mediante técnicas similares a las utilizadas en terapia génica.
La utilización, en el futuro, de la transgénesis en la mejora de caracteres productivos se encuentra limitada por nuestro desconocimiento sobre la identidad y regulación de los genes que determinan estos caracteres. El avance en la elaboración de mapas genéticos en las principales especies de interés permitirá disponer de un número mayor de genes candidatos susceptibles de ser manipulados.

Otro aspecto importante a considerar es el impacto que sobre la opinión pública pueden tener los organismos transgénicos y el uso comercial de los mismos de forma equivalente al debate existente en la transgénesis de vegetales.

Sin duda, una de las aplicaciones más prometedoras a corto plazo es la síntesis de productos biomédicos o de elevado interés comercial en animales transgénicos utilizados como bioreactores. La primera generación de productos terapéuticos sintetizados en la glándula mamaria está ya siendo evaluada en pruebas clínicas para su pronta comercialización. Un mayor conocimiento sobre los mecanismos que determinan la integración de los transgenes y sobre la regulación génica permitirá un control más preciso de la expresión de los transgenes y probablemente posibilitará un mayor número de aplicaciones en las especies domésticas.

Referencias

Baguisi, A. y col. (1999) **Nature Biotechnology** 17 (5):456-461.

Cameron E.R., Harvey M.J.A. y Onions D.E. (1994) **British. Veterinary J.** 150:9-24.

Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de León F.A. y Robl J.M. (1998[a]) **Science** 280: 1256-1258.

Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de León F.A. y Robl J.M. (1998[b]) **Nature Biotechnology** 16 (7): 642-646.

Damak S., Su H., Jay N. P. y Bullock D. W. (1996) **Bio/Technology** 14:185-188.

Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. y Ruddle F.H. (1980) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:7380-7384.

Gutiérrez-Adan A., Maga E.A., Meade H.M., Shoemaker C.F., Medrano J.F., Anderson G.B. y Murray J.D. (1996) **Journal of Dairy Science** 79: 791-799.

Lavitrano M., Camoaioni A., Fazio V.M, Dolci S., Farace M.G. y Spadafora C.

(1989) **Cell** 57:717-723.

Murray J.D. y Maga E.A. (1999) **Transgenic animals in Agriculture**. Murray J.D, Anderson G.B. y Oberbauer A.M. (eds). CABI Publishing, 193-208.

Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosendfeld M.G., Birnberg N.C. y Evans R.M. (1982**) Nature** 300:611-615.

Perry A.C.F., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y. y Yanagimachi R. (1999) **Science** 284 (5417):1180-1183.

Pursel V.G. (1995) **Genetically modified foods: safety issues.** K.H. Engel, G.R. Takeoka y R. Teranishi (eds). ACS Symposium series, 605. American Chemical Society, pag. 211-229.

Renard J.P, Chastant S., Chesne P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chavatte P. y Vignon X. (1999) **Lancet** 353 (9163): 1489-1491.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. y Campbell K.H. (1997). **Science** 278: 2130-2133.

Stinnakre M.G., Vilotte J.L, Soulier S. y Mercier J.C. (1994) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:6544-6548.

Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R. y Yanagimachi R. (1998) **Nature** 394: 369-374.

Wall, R.J. (1996) **Theriogenology** 45:57-68.

Ward K.A., Leish Z., Brownlee J., Bonsing J., Nancarrow C.D. y Brown B.W. (1999) **Transgenic animals in Agriculture.** Murray J.D, Anderson G.B. y Oberbauer A.M. (eds). CABI Publishing, 157-176.

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. y Campbell K.H. (1997). **Nature** 385: 810-813.

Wilmut I., Schnieke E., McWhir J., Kind A.J., Colman A. y Campbell K.H.S. (1999) **Transgenic animals in Agriculture.** Murray J.D, Anderson G.B. y Oberbauer A.M. (eds). CABI Publishing, 67-78.

6 / 01

MEJORA GENÉTICA EN PLANTAS: OBTENCIÓN DE RESISTENCIAS FRENTE A INFECCIÓN POR PATÓGENOS Ó ATAQUE DE INSECTOS

Blanca San Segundo, Laura Vila, Mar Rufat, Juan Manuel Bravo, Isabel Murillo.
Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona,
Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC.
Jordi Girona 18, 08034 Barcelona.

A lo largo de la evolución, plantas, hongos e insectos and evolucionado conjuntamente y han desarrollado mecanismos de ataque y defensa los unos frente a los otros para asegurar su propia supervivencia. Concretamente, las plantas han desarrollado respuestas de defensa para protegerse tanto frente a patógenos (bacterias, virus, hongos) como a pestes (insectos, nemátodos, etc).

En algunos casos, la resistencia al ataque por un patógeno puede estar condicionada geneticamente y depende de la existencia de un gen de resistencia (*R*) en la planta y de su correspondiente gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno (modelo gen a gen). Estas resistencias son sin embargo muy específicas (especificidad de cultivar y raza del patógeno). En la mayoria de los casos la defensa de una planta es una respuesta inducida por la presencia del patógeno y se basa en la activación transcripcional de la expresión de los denominados genes de defensa, genes que codifican para proteinas PR ("Pathogenesis-Related), entre otros.

En los últimos años se ha producido un rápido avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta respuesta de defensa en un número importante de especies vegetales y en diferentes tipos de interación planta-patógeno. Lo mismo puede decirse en el tema del cultivo "in vitro" y métodos para la transformación de especies vegetales. Estos factores han sido determinantes para la obtención de resistencias mediante transformación genética, incluyendo especies cultivables de interés comercial (p.e. cereales, hortalizas). Así, la introducción de genes de defensa de origen vegetal, bien genes individuales bien combinaciónes de los mismos, ha dado resultados interesantes en cuanto a resistencias frente a hongos (p.e. genes que codifican para quitinasas, beta-1,3-glucanasas), o frente al ataque por insectos (genes que codifican para inhibidores de proteasas).

Más recientemente, se han desarrollado estrategias basadas en la utilización de genes de defensa de origen no vegetal para la transformación de plantas. Este sería el caso, p.e de genes provenientes de hongos antagonistas o micoparásitos y que han demostrado ser efectivos al ser introducidos en planta para el control de hongos patógenos.

Se presentarán resultados que ilustran diferentes estrategias dirigidas a la mejora genética de plantas y obtención de variedades resistentes a infección por patógenos o al ataque por insectos.

6 / 02

CARACTERIZACIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS DE *S. CHACOENSE* Y *S. TUBEROSUM*

Ruiz de Galarreta J.I., Carrasco A.[1] , Ritter E.
NEIKER A.B, Centro Arkaute. Apdo. 46. 01080-Vitoria
[1]Dirección actual: APPACALE S.A. Valle de Mena 13. 09001-Burgos

La hibridación somática mediante fusión de protoplastos constituye una rápida e interesante vía para la utilización de germoplasma del G. *Solanum* en la mejora genética de patata. En el presente trabajo se han utilizado, los clones diploides de *S. tuberosum* H86.5046/10 y R3064 y la especie silvestre *S. chacoense* (chc 17034) la cual posee un elevado contenido en materia seca. Los rendimientos obtenidos fueron de $6{,}7 \cdot 10^6$; $5{,}7 \cdot 10^6$ y $9{,}3 \cdot 10^6$ protoplastos por gramo de tejido de mesófilo foliar para H86.5046/10, R3064 y chc 17034, respectivamente. El proceso de electrofusión se aplicó un campo de AC de 190V/cm y 1MHz de frecuencia durante 15 s para la alineación, y 2 a 4 pulsos de DC de 1,2KV/cm durante 20 μs en la fusión. El medio de cultivo fue el V-KM modificado.

El porcentaje de división de los protoplastos fue del 61,6% para chc 17034+H86.5046/10 y 53,4% para chc 17034+R3064. Los microcallos de 2mm se transfirieron al medio CM. La elongación y enraizamiento de los brotes se realizó en medio MS. Para la identificación se aplicó la técnica PCR-RAPD utilizándose los cebadores OPAL-10 y OPAU-20. Se obtuvieron 5 callos regenerantes resultando el 100% híbridos. Se realizó, asimismo, una evaluación del contenido de materia seca, almidón y azúcares reductores. Los valores encontrados para los dos primeros fueron elevados, alcanzando el 27,2% de materia seca en el híbrido HC1 y el 31,6% en RC1. Asimismo, se midió la fertilidad, la cual fue superior al 50%, lo que posibilita su incorporación como genitores en un programa de mejora de patata.

6 / 03

RESISTENCIA AL VIRUS Y DE LA PATATA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS PORTADORAS DEL GEN *CPLMV*

Ceballos E., Martínez de la Hidalga A., Ruiz de Galarreta J.I., Ritter E.
NEIKER A.B., Centro Arkaute. Apdo. 46. 01080-Vitoria

Una de las estrategias para la obtención de variedades de *Solanum tuberosum* L. resistentes al virus Y de la patata (PVY) ha sido la introducción del gen *cplmv* (proteína de la cápside del virus del mosaico de la lechuga) mediante transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* . Trabajos previos han confirmado que dicho gen, en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*, confería resistencia al PVY.

Para el presente estudio el gen *cplmv* fue transferido al plásmido binario pKYLMVCP e introducido en *Agrobacterium tumefaciens* (C58pGV2260). Se co-cultivó con explantos de hojas de los cultivares de patata Inca, Nagore y Desirée, utilizando el medio de regeneración CM, compuesto por sales MS, 30 g/l glucosa, 2 mg/l ribósido de zeatina, 20 μg /l ácido giberélico, 20 μg /l NAA, y 0,7% (p/v) de agar. La frecuencia de plántulas enraizadas en kanamicina (100 mg/l) como medio selectivo, se situó entre el 43% y el 70 % dependiendo el cv.

La aplicación de la técnica PCR con oligonucleótidos específicos de *cplmv* sobre las plantas regeneradas, mostró un 60% de transgénicas para el cv. Nagore hasta el 100% para el cv. Desirée. La protección frente a PVY fue evaluada por inoculación en invernadero de las plantas transgénicas y controles sin transformar y posterior diagnóstico mediante del test ELISA con anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos reflejaron un 61.7%, 88.3% y 100% de plantas resistentes a PVY para los cultivares Nagore, Desirée e Inca, respectivamente.

6 / 04

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAPACES DE UTILIZAR LACTOSA

Díaz Prado, S., Siso, M. I. G., Cerdán, M. E. y Becerra, M.
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña.Campus da Zapateira, s/n. 15071. A Coruña. España.

El suero de leche, un subproducto de la industria de fabricación de quesos, constituye, por el gran volumen producido anualmente y su elevada carga orgánica, un efluente con una enorme incidencia contaminante a nivel mundial.

Una alternativa para el tratamiento de este subproducto, consiste en el desarrollo de microorganismos capaces de convertir el suero de leche en productos útiles. La levadura conocida de mayor capacidad fermentadora, *Saccharomyces cerevisiae*, carece de lactosa permeasa y de β-galactosidasa intracelular con lo cual es incapaz de fermentar directamente la lactosa a etanol.

Con la ayuda de las técnicas de ADN recombinante se han transformado diferentes cepas de *S. cerevisiae* con plásmidos que contenían la β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* fusionada a distintas secuencias señal de secreción. Todas las cepas ensayadas crecieron en lactosa, aunque presentaron diferencias en su comportamiento. La fracción de β-galactosidasa secretada fue suficiente para permitir la hidrólisis de la lactosa y su eficiente utilización por las células.

La aproximación empleada no requiere la hidrólisis química o enzimática previa del disacárido ni técnicas para la inmovilización de la actividad β-galactosidasa. Además, las cepas transformadas no mostraron el crecimiento diaúxico típico de las células de *S. cerevisiae* creciendo sobre lactosa prehidrolizada. Estas características de las cepas recombinantes favorecen la transformación eficiente de la lactosa en biomasa, etanol u otros metabolitos de interés, siendo de potencial utilidad para el aprovechamiento del lactosuero.

6 / 05

DESARROLLO DE UN SISTEMA GENETICO PARA VALORAR RESISTENCIA A PATOGENOS EN DORADA (*SPARUS AURATA*)

Oliva, S.; Baeza, G. y Alvarez, M.C.
Dpto. de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

La lisozima es considerada un eficaz bactericida con especial importancia en organismos acuáticos. Una posible estrategia para aumentar la defensa frente a patógenos bacterianos en el pez cultivado *Sparus aurata* (dorada), es la potenciación de la actividad lisozímica en esta especie por mecanismos genéticos. Existen pocos estudios sobre este sistema de defensa en peces y sólo se ha estudiado la actividad lisozímica en algunas especies, existiendo una gran variabilidad interespecifica y presentando la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la actividad más alta.

El Objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema genético para valorar “in vitro” la eficacia de la lisozima de trucha, frente a bacterias que afectan a los cultivos de dorada, previo a la producción de transgénicos con este gen. Para ello se desarrolló una proteína de fusión con el gen de lisozima de trucha y el de la proteína fluorescente verde (GFP), a fin de determinar la presencia de lisozima mediante fluorescencia. Se partió para ello de dos vectores, que contenían respectivamente el cDNA de lisozima de trucha (opAFP-rtLys) y el gen de la proteína fluorescente verde (pEGFP-N1 de Clontech). Con el nuevo plásmido (pLys-EGFP) se transfectó la línea de dorada (SAF-1) y se seleccionaron las células transformadas. Dicha línea se transfectó tambien con el plásmido pEGFP-N1 a fin de usar estas células como control en la valoración de la resistencia a bacterias. Por último, se valoró la capacidad de excreción de la proteína de fusión al medio extracelular y su capacidad antibactericida mediante el método turbidimétrico.

6 / 06

OBTENCIÓN DE MUTANTES PIGMENTARIOS DE LA MICROALGA *PORPHYRIDIUM CRUENTUM* POR MUTAGÉNESIS INDUCIDA

Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E. H., Vilches Ferrón, M.A. & López Alonso, D.
Grupo de Biotecnología de Microalgas Marinas, Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04071. Almería

Una serie de mutantes pigmentarios de la microalga roja Porphyridium cruentum se obtuvieron después del tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina. Los cultivos mutagenizados fueron sembrados en placas de agar. Tras dos semanas de incubación, se aislaron doce colonias de mutantes pigmentarios, detectables a simple vista por su color verde o pardo, muy diferente del color rojo intenso habitual de esta microalga. Los mutantes fueron aislados y transferidos a medio líquido, donde se comprobó que eran completamente estables tras sucesivos recultivos.

Las cepas mutantes fueron cultivadas durante siete días en condiciones controladas y bajo distintas intensidades luminosas. Se analizaron diversos parámetros como contenido en pigmentos (clorofilas, ficobiliproteínas y carotenoides), perfil de ácidos grasos y velocidad de crecimiento.

La práctica totalidad de los mutantes presentaba un contenido en ficoeritrinas muy inferior a la cepa salvaje, siendo los más afectados los mutantes NV5, NV9, NV11 y NV12. Este defecto se acentuaba en condiciones de alta irradiación luminosa. También el contenido en clorofilas estaba afectado en los mutantes obtenidos y seguía un comportamiento similar al de las ficoeritrinas. Ni el contenido en carotenoides ni el perfil de ácidos grasos se vieron significativamente alterados en ninguno de los mutantes obtenidos. La velocidad de crecimiento de los mutantes era muy similar a la de la cepa salvaje, a excepción del mutante NV12, cuyo crecimiento era significativamente menor.

6 / 07

BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) SELECTION FOR DIRECT DRILLING SYSTEMS

Patanita, Manuel[(1)], Maçãs, Benvindo[(2)] & Valadeiro, Carlos[(1)]
(1) Escola Superior Agrária de Beja, Apartado 158, 7800 Beja, Portugal
(2) Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, Apartado 6, 7350 Elvas, Portugal

Competitive agriculture in South Portugal, a region of strong Mediterranean influence, must be based on low-input systems. Changing traditional soil tillage systems to direct drilling in rainfed regions, seems to be one way of increasing competitiveness. Good knowledge has been achieved using direct drilling technique but, on what concern the interaction genotype × tillage, more studies are needed in the Alentejo region. Any change needs adaptation and some malliability in order to be adopted by farmers and so, suitable varieties must be developed in order to avoid failures.

This paper describes an experiment designed to study and understand the effect of conventional soil tillage and direct drilling on the performance of a group of bread wheat genotypes selected at National Plant Breeding Station – Elvas. Experiments are being carried out on different types of soils but here only the results from clay soils are presented.

From data collected in 1995/96 and 1996/97 seasons, no interaction was detected between genotype and soil tillage. Grain yield was slightly higher when it is used direct drilling compared with conventional soil tillage.

In clays soils, where summer cracking is very strong, seems that it is not necessary to develop specific wheat breeding programs for direct drilling.

6 / 08

DISTRIBUCIÓN DE GENES *CRYI, CRYII* Y *CRYV* EN CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* AISLADAS EN ESPAÑA

Ferrandis , M. D.[1], Juárez-Pérez, V.[2], Frutos, R.[2], Bel, Y.[1], Ferré, J.[1]
Departament de Genètica, Universitat de València, Burjassot, (València)
BIOTROP-IGEPAM, CIRAD, Montpellier, Francia

Mediante la utilización de la técnica de PCR, un total de 223 cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en España fueron analizadas en base a la presencia de genes *cry*, que codifican para la síntesis de δ-endotoxinas. La presencia de genes pertenecientes a las familias *cryI, cryII, cryV* se detectó en un 77% del total de aislados, obteniéndose unas frecuencias de aparición de 54%, 42% y 66% para *cryI*, *cryII* y *cryV* respectivamente. Únicamente el 23% de los aislados no presentó ningún gen de estas familias. El estudio de la frecuencia de genes y la procedencia de la muestra puso de manifiesto una mayor presencia de estos genes en las muestras recogidas en molinos y almacenes de cereales que en las procedentes de tierra de campos de cultivo. Dentro de la familia *cryI* se estudió la presencia de 11 genes. La distribución observada para estos genes específicos varía ampliamente, encontrándose frecuencias entre el 1% y el 62%.

La toxicidad de un total de 97 aislados fue analizada frente a dos insectos plaga: *Plutella xylostella* y *Spodoptera exigua*. El estudio de la relación entre toxicidad y contenido genético muestra que la combinación genética más frecuente en cepas tóxicas es *cryIA-cryIC-cryID-cryII-cryV*. Algunas de las cepas analizadas presentan una toxicidad que no puede explicarse en base a su contenido genético.

6 / 09

ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE NUEVOS GENES *CRY* EN *BACILLUS THURINGIENSIS*

Hernández, C.S., Ferré, J.
Departament de Genètica, Universitat de València.
Dr. Moliner, 50. 46100-Burjassot (Valencia).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria del suelo ampliamente utilizada en agricultura como bioinsecticida. Se caracteriza por la producción, durante su esporulación, de inclusiones cristalinas de naturaleza proteica. La actividad insecticida reside principalmente en las proteínas componentes de estos cristales, también llamadas □-endotoxinas, la mayoría de ellas codificadas por genes *cry*. Las proteínas Cry presentan una alta especificidad insecticida frente a insectos diana. Por ello, es de gran interés caracterizar genéticamente nuevas cepas de *Bt* y poder predecir una posible actividad insecticida en base al contenido de genes *cry* que presenten. Esta caracterización se realiza mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas para cada gen *cry*. En nuestro laboratorio se está utilizando la técnica de PCR conjuntamente con el análisis de RFLPs para la detección de nuevos genes *cry* potencialmente responsables de actividad insecticida. Una vez conocido el contenido de genes *cry* en cada cepa de *Bt*, se lleva a cabo una amplificación por PCR de un fragmento situado entre dos secuencias consenso para varios genes *cry* con alta homología de secuencia. Este fragmento amplificado es posteriormente digerido con enzimas de restricción. El estudio de los fragmentos de restricción generados permite determinar si el patrón de bandas se corresponde al esperado para el contenido génico de la cepa o, por el contrario, evidencia la presencia de un nuevo gen *cry* con sitios de corte diferentes a los descritos para los enzimas de restricción utilizados en el fragmento amplificado y digerido.

6 / 10

MODIFICACIONES EN LAS ESTERASAS DEL GASTERÓPODO MARINO *LITTORINA LITTOREA* INDUCIDAS POR ESTRÉS AMBIENTAL

Mazón, L.I., Lorenzo, P., Aguirre, A.I., Vicario, A.
Departamento de Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad del País Vasco, Campus de Lejona, Apdo. 644, 48080 Bilbao.
email= ggpmagul@lg.ehu.es.

Se ha sometido al molusco marino Littorina littorea a diferentes condiciones de estrés tales como temperaturas y salinidades extremas, desecación y la presencia en el medio de Cd2+. Se ha observado que algunas de estas condiciones de estrés producen dos efectos: la inhibición total de la actividad de la EST-C y la modificación de sus patrones electroforéticos.

La inhibición de la actividad esterásica parece ser inducida principalmente por el Cd2+. La modificación de los patrones electroforéticos consiste en la aparición de bandas extras procedentes de las modificaciones de los productos primarios de los alelos del locus EST-C. Las bandas modificadas o extras son siempre más anodales que los productos primarios de los que proceden, y además el desplazamiento en la migración es igual a la distancia entre bandas primarias. Por lo cual las bandas modificadas coinciden en movilidad electroforética con los productos no modificados de otros alelos, lo que da origen a la existencia de fenocopias. La inducción de bandas extras aparece mayoritariamente en situaciones de estrés fuertes como la presencia de Cd2+, situaciones hiposalinas del 8.75‰ o desecación.

Todo esto indica que la determinación de las frecuencias genotípicas y génicas de la EST-C de Littorina littorea no es adecuada cuando este organismo está sometido a situaciones de estrés fuertes. La modificación de la movilidad electroforética de la EST-C no se debe a los procesos de manipulación de las muestras sino que parece estar inducido por situaciones de estrés ambiental a los que se ha sometido a Littorina littorea y parece ser un proceso in vivo.

workshop
genética molecular humana

NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Angel Carracedo
Departamento de Genética Forense. Instituto de Medicina Legal.
Universidad de Santiago de Compostela

Desde la revolución que para el análisis de la variabilidad genética supuso la automatización de la PCR y la introducción de secuenciadores automáticos basados en tecnología de fluorocromos, el progreso metodológico ha sido constante y actualmente está viviendo un momento espectacular con la introducción de nuevas tecnologías no basadas en técnicas electroforéticas. Éstas, no obstante, de la mano de la electroforesis capilar y de la miniaturización, han logrado llegar a cotas increíbles. Actualmente se han conseguido sistemas miniaturizados portátiles capaces de analizar multiplexes de microsatélites (STRs) en 1-2 min, o secuenciar 500 bp en menos de 15 min. Del mismo modo secuenciadores multicapilares posibilitan, para aquellos centros que necesitan un gran rendimiento en secuencia, que con un solo secuenciador pueda conseguir analizar mas de medio millón de bases en 24 horas.

La ilusión por nuevas tecnologías que faciliten el trabajo del análisis de la variabilidad se centra en MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionation time-of-flight mass spectrometry*) y en los *microarrays* de ácidos nucleicos, popularmente conocidos como chips de ADN.

La técnica de MALDI-TOF MS está irrumpiendo con fuerza para el análisis de fragmentos variables de ADN por su seguridad, rapidez, sensibilidad y precisión. Básicamente, con esta técnica los productos de PCR que van a ser analizados son co-cristalizados con un pequeño componente orgánico (matriz). La irradiación con un láser de pulsos cortos causa la volatilización espontánea de las moléculas de la matriz. Conjuntamente con estas moléculas, las moléculas de ADN son ionizadas y sometidas a un campo eléctrico. El peso molecular del ADN se determina con la medida del tiempo de vuelo (*time-of-flight*-TOF) hacia el detector, tiempo que es proporcional a la masa.

Esta técnica es particularmente útil en el análisis tras PCR de mutaciones y polimorfismos, incluyendo SNPs y STRs. La mayor limitación del método es la imposibilidad de analizar fragmentos mucho mayores de 100 bp. Sin embargo para el análisis de STRs existen estrategias para analizar solamente la zona de repeticiones. Al mismo tiempo, técnicas de fase sólida y el progreso de la robótica y miniaturización han conseguido formatos automáticos de hasta 384 pocillos en placas de microtitulación, lo que permite el análisis completo de cerca de 1000 muestras por hora.

Sin embargo la atención en la actualidad se centra en el desarrollo de la tecnología de *microarrays* de oligonucleótidos inmovilizados (chips de ADN) cuya aplicación está abriendo nuevas estrategias para el estudio de la complejidad genética. Los chips consisten en arrays de ADN de alta densidad que se fabrican con medios robotizados

sobre substratos de cristal o nylon, que son hibridados con sondas marcadas, y que permiten estudios masivos y paralelos de expresión génica o estudios a gran escala de análisis de variación génica.

La explosión de interés en esta nueva tecnología se ha debido a dos hechos claves tecnológicamente. La primera el uso de soportes sólidos no porosos como el cristal que ha facilitado la miniaturización y la detección basada en fluorocromos. La segunda ha sido el desarrollo de métodos para la síntesis o la colocación de oligonucleótidos con una gran densidad sobre un soporte de pequeño tamaño. Así, a partir de métodos de "enmascaramiento fotolitográfico" usados en la manufactura de semiconductores se han conseguido producir *arrays* con 400.000 oligonucleótidos de un tamaño de 20 μm^2 cada uno, en chips de de 1.28 x 1.28 cm. Existen actualmente versiones experimentales de chips del mismo tamaño que superan el millón de sondas por array. Otras métodos de fabricación de chips utilizan impresión piezo-eléctrica, esto es una tecnología similar a la que se utliza en las impresoras de inyección de tinta.

La complejidad de la fase de hibridación depende de la longitud de la secuencia, del tipo de secuencia y de la aplicación. Para análisis de polimorfismos o secuenciación, en los que cada posición en un fragmento de ADN tiene que ser interrogada, se suele diseñar un conjunto 4 de oligonucleótidos para cada posición en la secuencia. La intensidad relativa de la hibridación en cada serie identifica la base. En general el proceso de hibridación ha de ser automatizado. Cuando se necesita una mayor sensibilidad en el proceso de hibridación (por ejemplo para distinguir microsatélites) se utilizan actualmente chips electrónicamente activados.

Para la lectura (*read-out*), los sistemas basados en fluorocromos son en general preferidos sobre métodos radioactivos o de espectrometría de masas, aunque esta última tiene aplicaciones de concretas.

Hay muchos sistemas actualmente en el mercado tanto para la fabricación de chips, como para la hibridación, la lectura y software de análisis de la información. Es fundamental para la toma de decisión sobre el material a adquirir un entendimiento claro de la metodología y una definición clara de los objetivos a conseguir.

Chips para el análisis de la variación han sido desarrollados para la detección de mutaciones en BRCA, B-talasemia, fibrosis quística, HLA, HIV, ADN mitocondrial de primates y humanos, p53, SNPs en diversos animales, etc. Las aplicaciones son muy numerosas y las posibilidades espectaculares, pero todavía hay muchas dificultades que superar. Por ejemplo mientras que los homocigotos son fácilmente detectados, los heterocigotos a veces no se identifican correctamente. También substituciones de una base se identifican en general bien, pero no se pueden reconocer inserciones o delecciones a menos que se prevean con anterioridad y se puedan incluir sondas apropiadas en el chip. También se necesitan estrategias de grandes multiplexes, que no están exentas de dificultades, para muchas de las aplicaciones.

Nosotros estamos trabajando en el diseño de chips electrónicamente activados para microsatélites con aplicaciones en genética de poblaciones humanas y de genética forense, así como chips de formato convencional para el análisis de SNPs de cromosoma Y. Los problemas que encontramos con esta nueva tecnología y sus ventajas e inconvenientes serán discutidos en esta presentación.

ALCAPTONURIA (1902-1999): DE LOS "ERRORES METABÓLICOS CONGÉNITOS" DE GARROD AL PROYECTO GENOMA HUMANO

Santiago Rodríguez de Córdoba
Unidad de Patología Molecular, Fundación Jímenez Díaz

La enfermedad

La alcaptonuria (AKU, McKusick nº 203500) es una metabolopatía poco frecuente que se caracteriza por una triada de sintomas: orina negra, pigmentación del tejido conjuntivo (ocronosis) y artrosis. Los individuos alcaptonúricos carecen del enzima homogentisato dioxigenasa (HGO) en la ruta de degradación de la fenilalanina/tirosina, por lo que son incapaces de metabolizar estos aminoácidos, acumulando en la sangre grandes cantidades de ácido homogentísico que se elimina con la orina. A pH alcalino, en presencia de oxigeno, el ácido homogentísico se oxida y polimeriza, dando lugar a un pigmento negro (alcaptón) que da a la orina de los alcaptonúricos su color característico. Este proceso de oxidación y polimerización parece que ocurre tambien en el organismo, aunque mucho mas lentamente. El pigmento se va depositando en el tejido conjuntivo de los pacientes y termina ennegreciendolo como si se hubiera sumergido en tinta china. Esta pigmentación no es inocua para el tejido conjuntivo. Con el tiempo ocasiona la degeneración del cartílago de las articulaciones mayores (rodillas, caderas, columna) provocando una artropatía degenerativa muy dolorosa e incapacitante.

Su importancia histórica

La alcaptonuria se conoce desde el siglo XVI. A finales del siglo pasado, y principio de este, su estudio contribuyó muy significativamente a establecer la ruta catabólica de la fenilalanina tal y como la conocemos hoy en dia. La alcaptonuria ocupa un lugar de privilegio en la Genética porque fué la primera patología humana interpretada como un defecto hereditario autosómico recesivo *(Garrod, A. E. Lancet 2:1616-20, 1902*). Junto con la cistinuria, la pentosuria y el albinismo, la alcaptonuria sirvió a A. E. Garrod (*Lancet 2:73-79, 1908*) para introducir el concepto de "error metabólico congénito", intuyendo que en estas cuatro enfermedades debía existir algún deficit enzimático determinando un bloqueo metabólico. AKU fué tambien el primer deficit enzimático demostrado bioquímicamente (*La Du, B. et al. J Biol Chem 230:251-260, 1958*) y fué el primer gen mapeado por conservación de sintenia (*Janocha, J. et al. Genomics 19:5-8, 1994*).

Clonaje y caracterización del gen AKU

Clonar el gen AKU no era obvio debido a que no existian herramientas que permitieran su identificación. Por ello se utilizó como organismo modelo, *Aspergillus nidulans*, un moho muy versatil con una dotación genética muy completa que le permite crecer en casi cualquier fuente de carbono. *A. nidulans* es un organismo donde es relativamente facil generar mutantes y selecionar aquellos que son incapaces de crecer en fenilalanina. Se obtuvieron estos mutantes y se clonó el gen hgmA,

demostrandose luego que la disrupción genética del gen hgmA. genera un hongo alcaptonúrico, que produce grandes cantidades de ácido homogentísico *(Fernandez-Cañón J.M. y Peñalva, M.A. J Biol Chem 270:21199-205, 1995*). Con la secuencia de la proteína fúngica se identificó un cDNA humano depositado en las bases de datos de ESTs y se demostró que era el gen humano HGO. Se determinó que este gen mapeaba en el locus AKU y se estableció que los pacientes con alcaptonuria eran homozigotos para mutaciones perdida de función en el gen HGO. En conclusión, se demostró que el gen HGO es el gen AKU (*Fernandez-Cañón J.M. et al., Nature Genet 14:19-24, 1996*).

El gen HGO humano

En humanos el gen *HGO* es un gen de copia única que esta localizado en el cromosoma 3 (3q21-q23). El gen humano se extiende 54,363 bp y codifica un transcrito de 1715 nucleótidos que está dividido en 14 exones de tamaños compredidos entre 35 y 360 bp. Los intrones del gen HGO oscilan entre 605 y 17,687 bp y contienen copias de las principales clases de elementos repetidos, incluyendo varias repeticiones de nucleótidos sencillas (di, tri y tetranucleótidos). El patrón de expresión tisular del gen HGO se determinó mediante análisis de *northern blot*, utilizando mRNAs obtenidos de distintos tejidos humanos. Estos estudios demostraron que el gen HGO se expresa en hígado, riñón, intestino delgado, colon y próstata. Mediante experimentos de *primer extension* se pudo determinar que el gen HGO tiene un único inicio de transcripción en hígado y con experimentos de transfección en líneas celulares hepáticas se demostró que las secuencias comprendidas entre -1074 y +89 bp (relativas al sitio de inicio de la transcripción del gen HGO) son suficientes para promover la transcripción de un gen reportero. Cuando se analizó la secuencia de este fragmento de DNA se comprobó que contiene varias secuencias que podrian ser sitios de unión de factores de transcripción, abundantes en hígado (p.e., HNF1), y que, por lo tanto, podrian estar implicados en el control de la expresión hepática del gen HGO (*Granadino B. et al. Genomics 1997, 43:115-122*)

Mutaciones y polimorfismos en el gen HGO

Como una primera aproximación al estudio de la heterogeneidad alélica en AKU se analizó el gen HGO en 33 cromosomas afectos. Esto permitió identificar 14 mutations diferentes: 10 (E42A, W97G, D153G, S189I, I216T, R225H, F227S, P230S, V300G y M368V) son mutaciones que ocasionan sustituciones en la secuencia de aminoácidos en posiciones que estan conservadas en HGO en otras especies, 1 (F10fs) es una mutación de cambio de fase de lectura, 2 son mutaciones intrónicas (IVS9-56G→A, IVS9-17G→A), y 1 es una mutacion en un sitio de splice (IVS5+1G→T) (*Beltrán-Valero de Bernabé D. et al., Am J Hum Genet 1998 62:776-784*). Algunas de las sustituciones de aminoácidos se caracterizaron funcionalmente. Para ello estas mutaciones se introdujeron en moléculas HGO recombinantes y se expresaron en *E. coli*, demostrándose que ocasionaban pérdida de la actividad enzimática. Al mismo tiempo que se caracterizaban las mutaciones en HGO en

pacientes AKU, se identificaron varios polimorfismos en HGO: tres de ellos, HGO-1, HGO-2 y HGO-3, son repeticiones de dinucleotidos; IVS2+35T/A, IVS5+25T/C, y IVS6+46C/A son posiciones intrónicas en las que se han detectado cambios de nucleótido (dimorfismos); y c407T/A es un polimorfismo relativamente frecuente en la secuencia codificante, exon 4, que resulta en un cambio de aminoácido (H80Q).

El triplete CCC es un hot spot mutacional en el gen HGO

Recientemente hemos caracterizado otras 6 nuevas mutaciones y dos polimorfismos. El analisis de todas las mutaciones y los polimorfismos encontradas en el gen HGO ha demostrado que estos cambios de nucleotidos no se distribuyen al azar; la secuencia CCC, o su complementaria inversa GGG, estan preferentemente mutadas. Estos analisis tambien han mostrado que en el gen HGO las sustituciones de nucleotidos no afectan a dinucleotidos CpG, lo que demuestra que existen importantes diferencias entre el gen HGO y otros genes respecto de las secuencias en las que ocurren las mutaciones. Dado que en el gen HGO las mutaciones que ocurren en las secuencias CCC representan un porcentage muy elevado del total de mutaciones en este gen, hemos concluido que el triplete CCC es un *hot spot* de mutacion en HGO (*Beltrán-Valero de Bernabé D. et al., Am J Hum Genet 1999 64:1316-1322*).

Estudios poblacionales y de epidemiología genética: Origen y geografia de las mutaciones AKU

Fué particularmente interesante establecer las asociaciones haplotípicas entre los alelos de los distintos sitios polimorficos del gen HGO en la población normal y en los cromosomas AKU, pues ello proporcionó datos informativos sobre el origen y evolución de algunos de los alelos AKU. La elevada frecuencia de pacientes AKU con homozygosis en el locus HGO sugiere que los alelos AKU son realmente infrecuentes en las distintas poblaciones y que muchos de ellos son de origen relativamente reciente. Hasta ahora solo tres mutaciones, M368V, P230S y V300G, se han encontrado en dos o mas pacientes no relacionados. Entre estas mutaciones parece claro que M368V y P230S son relativamente antigüas y fueron traidas a Europa con las primeras migraciones. La mutación P230S esta asociada al haplotipo HGO-E y es característica de las poblaciones Mediterraneas. La mutación M368V se asocia al haplotipo HGO-A y representa la mutación característica de las poblaciones del norte de Europa.

Futuro de la alcaptonuria

Desde que Garrod publicó su famoso trabajo en Lancet en 1902 hasta que se clonó el gen HGO (1996) han transcurrido casi cien años. Con el gen HGO clonado los acontecimientos se han precipitado. El gen HGO ya ha sido secuenciado en su totalidad (54 Kb) y ya se ha caracterizado un número considerable de mutaciones diferentes en pacientes AKU. Los estudios poblacionales y de epidemiología genética progresan a buen ritmo. El gran reto futuro será establecer los mecanismos que

desencadenan la artropatía que afecta a los alcaptonúricos y diseñar estrategias para evitar que se produzca. Además, será importante determinar si el gen *HGO* (la alcaptonuria) es o no la llave para evitar las gravisimas consecuencias de otros defectos genéticos que ocurren mas abajo del ácido homogentísico en la ruta catabólica de la fenilalanina, como son las tirosinemias tipo I (HT1).

BIOINFORMATICA, ACORTANDO EL CAMINO ENTRE LA SECUENCIA Y LA FUNCION.

Roderic Guigó i Serra
Departament d'Informàtica Mèdica, Institut Municipal d'Investigació Mèdica
y
Departament d'Estadística, Universitat de Barcelona

El proyecto del Genoma Humano se encuentra en su recta final. Parece probable que durante el año 2000 se conozca ya alrededor del 90% de la secuencia del genoma humano. Aunque el conocimiento de la secuencia primaria de nucleótidos del genoma tiene un indiscutible interés, es cierto que a corto y medio plazo, el interés fundamental se centra en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas en este genoma, es decir, de los genes, y de las funciones a distintos niveles (molecular, celular, organísmico) que estas proteínas puedan ejercer.

El genoma humano tiene una longitud de unos tres mil millones de nucleótidos, y codifica alrededor de cien mil proteínas distintas. Dada la magintud de esta información, el concurso de la computación es necesario tanto para inferir la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas en el genoma, como para investigar la(s) funcion(es) que estas proteínas puedan ejercer. Una nueva disciplina científica, la Bioinformática, en la intersección entre Biología e Informática, se ha desarrollado recientemente para hacer frente a esta y a otras necesidades. En una sentido restringido, la Bioinformática aborda los problemas relacionados con el almacenamiento, el acceso y el análisis de información acerca de las secuencias biológicas (de ácidos nucleicos y de proteínas), su estructura, función y evolución. Son particularmente relevantes en estos momentos, los dos problemas citados anteriormente, la identifiación de genes en secuencias genómicas y la predicción de función de las proteínas. Es explícitamente a estos dos problemas a los que voy a referirme aquí.

1. Identificación computacional de genes

La estructura de los genes en el genoma de los organismos eucariotas superiores es peculiar: los genes no son contiguos, sinó que están separados por grandes regiones intergénicas no codificantes, ni son continuos, sinó que están fragmentados en pequeñas regiones que codifican, los exones, separadas por largas regions no codificantes, los introns. La fracción no codificante representa el 98% del genoma humano y es, por tanto, muy superior a la fracción codicante.

Aunque la maquinaria celular es capaz de reconocer con gran precisión la señales involucradas en la especificación de los genes, ya sea en la secuencia primaria del DNA (regiones promotoras) o en las moléculas intermedias de RNA (señales de "splicing", señales de inicio de la traducción,...) en la compleja serie de procesos bioquímicos que conducen desde la secuencia de DNA en el genoma a la secuencia de aminoácidos de las proteínas, nuestro conocimiento acerca de cuales son estas señales y como son específicamente reconocidas por la maquinaria celular es todavía

muy parcial. Así, es usualmente imposible inferir a partir de un análisis puramente sintáctico, la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas en una secuencia de DNA genómico.

Los métodos computacionales de identificación de genes no pueden, pues, depender sólo de técnicas sofisticadas de reconocimiento de señales, sinó que deben recurrir a información adicional para producir predicciones génicas fiables. En este sentido, utilizan, por una parte, información derivada del sesgo composicional que caracteriza las regiones codificantes: debido al sesgo en la utilización tanto de los distintos aminoácidos en las proteínas existentes, como de los codones sinónimos, las regiones codificantes exhiben una composición de secuencia característica que las distingue estadísticamente de las regiones no codificantes. Por otra parte, utilizan información derivada de la similaridad potencialmente existente entre regiones de la secuencia genómica y secuencias codificantes conocidas en las bases de datos, ya sean secuencias de aminoácidos o de ``Expressed Sequence Tags'' (esencialmente, mRNAs parciales).

Recientemente, a medida que los proyectos de secuenciación del genoma de otros organismos progresan paralelamente al proyecto del Genoma Humano, una nueva fuente de información promete ser muy importante: la comparación de regiones genómicas sinténicas de especies a la distancia filogenética apropiada. En este sentido, el análisis de regiones sinténicas entre hombre y ratón demuestran que conservación en el DNA genómico constituye una fuerte indicación de función codificante.

2. Predicción de función

La secuencia de nucleótidos del DNA y la secuencia de aminoácidos de las proteínas es portadora de una gran cantidad de información sobre la función de estas biomoléculas. En particular, proteínas con secuencias de aminoácidos semejantes, tienen con frecuencia una función (molecular) semejante. En este hecho se basan, esencialmente, la mayoría de métodos computacionales para la predicción automática de función de las proteínas. En efecto, uno de los métodos más potentes para caracterizar funcionalmente una proteína de función desconocida (al menos de modo parcial) es realizar búsquedas de similaridad en las bases de datos de proteínas conocidas. Las funciones descritas para aquellas proteínas cuya secuencia es "suficientemente" similar a la proteína de función desconocida pueden ser automáticamente transferidas a ésta. BLAST y FASTA ---que se basan en la comparación individual de la secuencia problema con cada uno de las secuencias en las bases de datos---son dos métodos populares para detectar rápidamente secuencias muy similares. No son, sin embargo, suficientes para detectar relaciones de similaridad más distantes. En los últimos años, han sido desarrolladas una serie de herramientas que se basan esencialmente en la construcción de alineamientos múltiples para familias de secuencias funcionalmente relacionadas y en la comparación de secuencias con alineamientos, ya sea un alineamiento contra una base de datos de secuencias, como en psi-blast, o una secuencia contra una base de datos

de alineamientos, como PFAM. Estos métodos son mucho más sensibles y permiten detectar relaciones de similaridad distantes entre secuencias.

BASES GENÉTICAS DE ENFERMEDADES COMPLEJAS: EL SÍNDROME DE DOWN

Roser Gonzàlez-Duarte, Gemma Marfany, Rebeca Valero,
Mª Francisca Sánchez y Olga González
Departamento de Genética, Universidad de Barcelona

El síndrome de Down (DS) es una de las patologías genéticas más estudiadas. Desde hace 40 años se sabe que es debido a una trisomía total o parcial del cromosoma 21. Su elevada incidencia en la población (1/700), la posibilidad de realizar un diagnóstico citogenético mucho antes que las nuevas técnicas de genética molecular permitieran identificar los genes causantes de la patología y, en la actualidad, el complejo fenotipo asociado a este síndrome junto con el tamaño relativamente pequeño del cromosoma 21 (50 Mb), son las causas de que aún hoy su estudio genere un gran interés.

Estudio de la relación genotipo-fenotipo. Caracterización molecular de aneuploidías del cromosoma 21 mediante PCR con cebadores fluoresescentes

Uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido la caracterización de trisomías y monosomías parciales, las primeras se presentan con una frecuencia del 1% de los fenotipos Down. Si bien la mayor parte de estas aneuploidías pueden ser diagnosticadas por FISH, esta técnica no permite detectar algunas anomalías cromosómicas, entre ellas las duplicaciones intersticiales pequeñas.

El estudio por PCR de la dosis de marcadores moleculares, tri- y tetra-nucleótidos, distribuídos a lo largo de todo el cromosoma 21, nos ha permitido definir los límites de la región trisómica en 5 pacientes y determinar en 3casos la extensión de la región monosómica. Además, en los casos en que se disponía de muestra de los progenitores, también se ha determinado el origen de la aneuploidía.

Dada su baja frecuencia, el número de trisómicos parciales analizados hasta la fecha es escaso. Existe una iniciativa europea para construir un banco de datos que permita relacionar las características clínicas y moleculares recogidas a partir de un número elevado de casos. La asociación de subregiones cromosómicas a fenotipos concretos permite inferir los genes responsables de las distintas alteraciones clínicas y acotar su localización en el cromosoma 21.

Caracterización de genes de la región 21q11.2

La identificación y análisis funcional de genes del cromosoma 21 es, sin duda, un hito importante para los que aspiran a comprender las bases moleculares de la enfermedad. Se trata de una patología compleja debida a un efecto de dosis y, hasta la fecha, sólo se han descrito unos 100 genes en el cromosoma 21. Mediante análisis moleculares se ha delimitado la región mínima del Síndrome de Down, denominada DCR (región crítica), localizada en 21q22.2-21q22.3 y flanqueada por los marcadores D21S17 y ETS2, como la responsable de la mayor parte de los rasgos fenotípicos asociados a este síndrome. Sin embargo, otras alteraciones clínicas que se presentan

con relativa frecuencia en los afectos de Down -Alzheimer prematuro, cardiopatía congénita, baja estatura- dependerían de genes localizados en otras subregiones cromosómicas. Por otra parte, el retraso mental es un rasgo fenotípico complejo en el que intervendrían diversos genes localizados a lo largo de todo el cromosoma.

El segundo objetivo de nuestro trabajo, ha sido la caracterización de genes en la región 21q11.2. Esta región está asociada a la leucemia mieloproliferativa transitoria que se presenta en afectos Down y a un tipo de Alzheimer familiar. Sin embargo, las características de esta región: bajo contenido en GC, pocas islas CpG descritas, elevado número de secuencias repetidas y la abundancia de secuencias metiladas eran todas ellas indicativas de que se trataba de un fragmento con pocas regiones codificantes, y pocos genes. Después de búsquedas exhaustivas, hasta el momento sólo se han identificado dos: STCH (stress 70 chaperone protein) y RIP140 (receptor-interacting protein 140).

Analizando los ESTs descritos en los bancos de datos del genoma humano, hemos identificado una EST mapada en 21q11.2. Amplificamos esta secuencia con cebadores específicos y se obtuvo un fragmento de 230pb que se utilizó como sonda para rastrear 10^6 clones de tres genotecas comerciales de cDNA: placenta, cerebro fetal y riñón humano. Se realizaron distintas rondas de rastreo para aislar todos la fagos positivos que posteriormente se subclonaron en pBluescript SK. Comparando las secuencias de los clones (NCBI Blast) contra los bancos de datos se comprobó que se había aislado un fragmento de cDNA con pauta de lectura abierta. A partir de este fragmento se caracterizó el cDNA humano completo. Posteriormente, una búsqueda informática exhaustiva (servidores BlastN del BCM y NCIB) ha permitido caracterizar la región genómica completa que corresponde al cDNA aislado y que está contenida en tres PACs del cromosoma 21.

Se han realizado pruebas *Northern* para determinar la expresión del gen en distintos tejidos humanos y de ratón. Se observa que si bien existe una expresión basal mínima en todos los tejidos, ésta es máxima en testículo. Además, utilizando una sonda de 600 pb del cDNA de ratón se han realizado estudios de hibridación *in situ* sobre cortes de cerebro fetal de distintos estadios del desarrollo. Se observa expresión en gradiente en la zona proliferativa ventricular del telencéfalo.

Búsqueda de genes con expresión diferencial en individuos Down versus controles

El tercer objetivo del trabajo ha sido la búsqueda de genes que presentaran una sobre- o sub-expresión en pacientes Down, versus controles no afectos, mediante la estrategia de hibridación substractiva de mRNAs. Estos genes no tienen por qué estar ligados al cromosoma 21. Se trataba de identificar genes regulados directa o indirectamente por factores del cromosoma 21 y que su expresión se viera afectada por un efecto de dosis.

El experimento se ha realizado con mRNAs aislados de cerebros Down y controles procedentes de fetos humanos, de entre 18-22 semanas de gestación. La estrategia se basa en hibridar las dos poblaciones de cDNA, manteniendo una en exceso, y se procede al clonaje de aquellos cDNAs que, en estas condiciones, no forman híbridos. Si la población control es la que está en exceso, se identificarán los genes que se sobre-expresan en individuos Down, si se intercambian las poblaciones se detectarán aquellos que se sub-expresan.

Hemos identificado dos genes con expresión diferencial en individuos Down, uno localizado en 13q12 y el otro en 6q22-23. En la actualidad se realizan ensayos de sobre- y sub-expresión y se estudia su efecto sobre el fenotipo en lineas celulares transfectadas con vectores que contienen los cDNAs de ambos genes.

Referencias:

-Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B and Sinet PM (1993) **Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21**. *Eur J Hum Genet*., 1: 114-124

-Katheleen Gardiner (1995) **Human genome organization**.*Current Opinion in Genetics and Development;* 5: 315-322

-Korenberg JR, Chen Xn, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteche C, (1994) **Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance***Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 91: 4997-5001

-Yu J, Tong S, Shen Y, Kao FT: (1997) **Gene identification and DNA sequence analysis in the GC-poor 20 megabase region of human chromosome 21** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 94: 6862-6867

TERAPIA GÉNICA

Marta Izquierdo
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
CSIC – Universidad Autónoma de Madrid

Entendemos por terapia génica en humanos la transferencia de un ácido nucleico (ADN o ARN) a un paciente con fines curativos. El tratamiento de enfermedades introduciendo genes sanos a un organismo enfermo está empezando a ser posible pero la terapia no será enteramente satisfactoria hasta que no se consiga que los genes introducidos funcionen del mismo modo que los originales. En humanos no es posible hacer terapia génica germinal pero la terapia génica somática permite la llegada de un gen terapéutico a un órgano dañado. Existen en la actualidad descritas unas 3.000 enfermedades genéticas que serían susceptibles de terapia génica. De estas enfermedades, las denominadas *monogénicas*, son aquellas en las que la alteración en un sólo gen causan la patología. Su terapia requeriria la llegada a las células deficientes, de una copia intacta del gen con lo que se restauraría el fallo celular y clínico. El cáncer es una enfermedad multigénica provocada por la alteración, principalmente somática, de oncogenes y oncosupresores.

En la actualidad se estan llevando a cabo varias estrategias de terapia génica para el tratamiento de tumores, la mayoría de ellas han pasado de la fase experimental en animales a la fase de ensayos clínicos. Los resultados obtenidos hasta el momento son en general buenos y capaces de erradicar tumores en animales de experimentación, pero no está siendo fácil adaptar el sistema animal al humano y las causas pueden ser triviales o profundas.

El análisis de las distintas terapias génicas que en la actualidad se están empleando contra el cáncer nos permite establecer seis categorías:

1) Terapias destinadas a disminuir la presencia celular de oncogenes cuya sobre-expresión haya contribuído al desarrollo del tumor. Estamos en los comienzos de diagnósticos personalizados en los que la utilización de “microchips” permita un diagnóstico genético-molecular del cáncer. Esto facilitará las terapias génicas personalizadas con vectores que expresen ARN mensajeros anti-sentido contra los oncogenes sobre-expresados.

2) Utilización del oncosupresor *p53* como diana de la terapia. *p53* es uno de los genes que con mayor frecuencia se encuentra alterado en tumores sólidos humanos y cuyas funciones son múltiples. En cultivos celulares que carezcan de P53 funcional, las propiedades neoplásicas pueden revertirse con la llegada de una copia normal del gen.

3) La tercera categoria estría representada por las terapias que incrementan la inmunogenicidad tumoral. La introducción de genes correspondientes a las citoquinas: interleuquinas 2 ó 4, así como el factor de la necrosis tumoral α, son ejemplos de ello.

Una cuarta estrategia es la destrucción de la célula tumoral con vectores portadores de genes asesino-suicidas condicionales. Estos vectores, una vez dentro de la célula, provocan la muerte de la misma en presencia de un compuesto, en principio inocuo, que es modificado hacia una versión tóxica por el producto del gen "terapéutico". Muchos de estos sistemas provocan además un efecto mortal "colateral" en células próximas a la que produce el compuesto tóxico.

La quinta estrategia consiste en terapias antiangiogénicas que impiden el desarrollo de un tumor de modo indirecto interfiriendo con las neovascularizaciones asociadas a todo tumor y eliminando su suministro de oxígeno y nutrientes (Figura 1).

La sexta categoría la constituyen las terapias combinadas en las que un mismo vector puede entregar a una célula por ejemplo, genes antiangiogénicos y un gen asesino-suicida condicional (Figura 1).

Ninguna de las estrategias de terapia génica aquí descritas es capaz de curar aún el cáncer en el hombre. Una de las mayores limitaciones es la dificultad para que todas y cada una de las células del tumor adquieran una copia del gen terapéutico. Nosotros hemos desarrollado dos nuevas estrategias de terapia génica con genes asesino-suicidas, que creemos pueden superar algunas de las limitaciones que tienen estos tratamientos en la actualidad.

Estrategia linamarasa/linamarina

El nuevo sistema linamarasa/linamarina que hemos desarrollado, utiliza un gen vegetal (*lin*) responsable de la enzima linamarasa. Esta enzima se expresa en la planta tropical "casava" (tapioca,*Manihot esculenta)* cuyas raíces tuberosas y hojas se comen en muchas comunidades tropicales. El sustrato, tambien presente en la planta, es la la "linamarina" (2-H0-isobutironitrilo-□-D-glucopiranósido) que es procesado por la linamarasa (□-glucosidasa) a glucosa y cianuro. Hemos construído vectores retrovirales portadores del gen *lin* (Figura 2). La liberación de cianuro al tiempo que mata la célula le hace quizá el mas potente de todos los sistemas conocidos ya que ese cianuro liberado puede matar las células del entorno provocando así un efecto colateral importante. El efecto colateral del sistema linamarasa/linamarina no depende de uniones en hendidura ya que el cianuro es volátil y bastaría con que el 10% de las células de un tumor se convirtieran en productoras de cianuro para eliminar la totalidad del tumor. El sistema ha permitido la erradicación de tumores cerebrales de gran tamaño en la rata mediante la inoculación en el seno del tumor de células murinas productoras de retrovirus portadores del gen *lin.* La administración de linamarina es local y tiene lugar a través de una cánula de infusión cerebral anclada en el cráneo del animal y conectada vía catéter con una bomba osmótica que libera el compuesto.

Estrategia promotor específico/toxina

La mayoría, sino todos, los sistemas asesino-suicidas descritos en la actualidad, ultilizan un compuesto inocuo convertible en tóxico por acción del producto del gen terapéutico. Esto lleva consigo un doble tratamiento del animal de experimentación o en su día del paciente, primero con el gen terapéutico y luego con el compuesto tóxico condicional. Sería deseable desarrollar un sistema que no necesitara del segundo tratamiento con la consiguiente ventaja asociada. Hemos construído y estamos caracterizando vectores terapéuticos que no precisan de un compuesto tóxico condicional por ser el propio gen terapéutico, tóxico *per se*. Hemos asociando a una toxina, un promotor condicional que permite inactivar totalmente el gen en las células productoras de retrovirus (fibroblastos de origen murino) y favorece su libre expresión al llegar a una célula glial-tumoral: el glioblastoma (Figura 3).

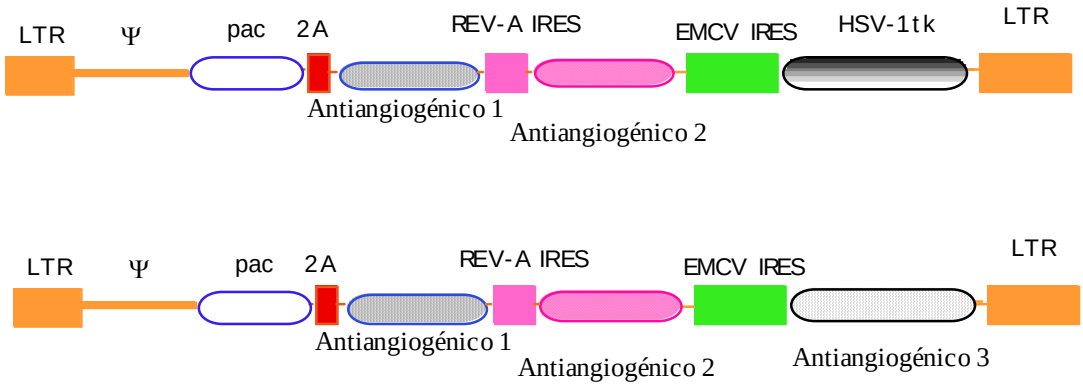

Figura 1 Vectores retrovirales tetracistrónicos para terapias combinadas. A) Este vector lleva el gen de selección *pac* que confiere resistencia a puromicina; dos genes antiangiogénicos distintos(1 y 2), así como el gen de la quinasa de timidinas de *Herpes simplex.* Este vector lleva el gen de selección *pac* que confiere resistencia a puromicina y tres genes antiangiogénicos distintos(1, 2 y 3). Las construcciónes no llevan promotores internos para que no interfieran con el promotor del LTR (terminal repetido largo).

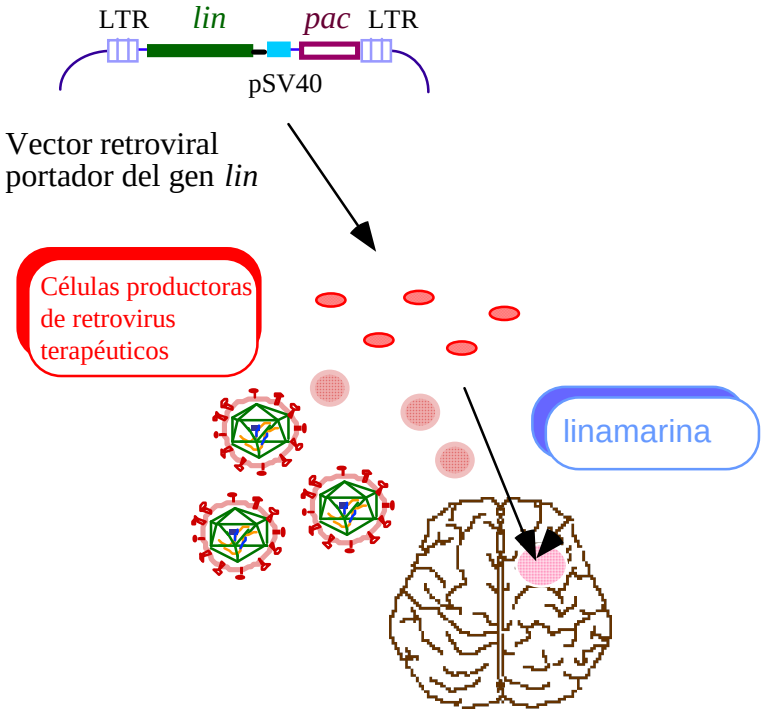

Figura 2 Vector retroviral portador del gen de la linamarasa procedente de la planta de la tapioca y terapia génica asociada a este sistema.

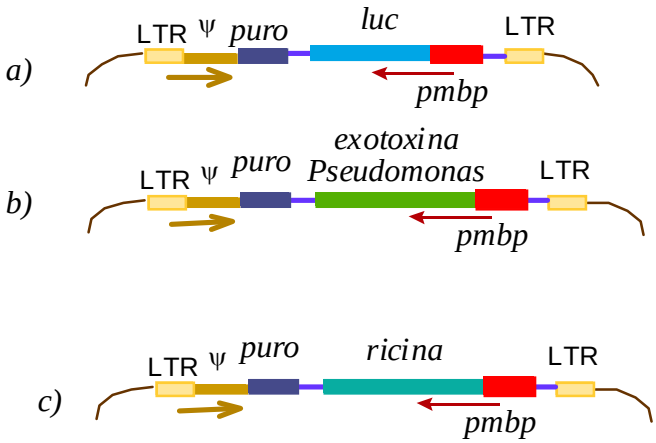

Figura 3 Vectores retrovirales con a) el gen control de la luciferasa y con las toxinas b) exotoxina de Pseudomonas o c) ricina; todos ellos bajo el control del promotor específico de tejido y controlable por la hormona tiroidea T3.

Bibliografía recomendada:

Biología Molecular del cáncer (libro) Marta Izquierdo Rojo. Editorial Sínteis. Madrid (1995).

Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? (revisión) Jack A. Roth, Richard J. Cristiano. Journal of the National Cancer Institute **89** 21-39 (1997).

An overview of gene therapy approaches to neurological malignancies Marta Izquierdo (revisión)*BioDrugs* **4** 337-349 (1998).

Successful use of a plant gene in the treatment of cancer in vivo. Cortés, M. L., de Felipe, P., Martín, V., Hughes, M.A. and Izquierdo M. *Gene Therapy* **5** 1499-1507 (1998).

Terapia génica Marta Izquierdo (revisión) *Revisiones en cáncer* **13** 9-15 (1999).

Ingeniería genética y transferencia génica (libro) Marta Izquierdo Rojo. Ediciones Pirámide, (grupo Anaya). Madrid (1999).

7 / 01

GENÉTICA DE LAS FISURAS LABIALES Y/O PALATINAS: PERFIL DE LA CONSULTA EN EL PROGRAMA EXPRESAR DE LA FUNDACIÓN COLOMBIANA DE REHABILITACIÓN

Augusto Clavijo, H.
Programa Expresar. Fundación Colombiana de Rehabilitación.
Santafé de Bogotá D.C.

El asesoramiento genético (AG) es un proceso de comunicación que trata de las enfermedades genéticas en una familia. En 1997 fue inaugurada la Unidad de Genética Clínica (Centro de Referencia en Fisuras Labiales y/o Palatinas) en el Programa Expresar de la Fundación Colombiana de Rehabilitación. El presente trabajo se encuentra basado en una muestra representativa de 50 consultas (total de consultas: 117). Además, se realizaron 22 consultas relacionadas con parientes de estos pacientes que deseaban establecer principalmente posibles riesgos reproductivos para la aparición de fisuras labiales y/o palatinas. En relación con las 50 consultas descritas, se verificó que 37 (74%) eran de sexo masculino y 13 (26%) de sexo femenino. El intervalo de edad de los pacientes fue de 3 meses a 21 años. 45 (90%) consultas se originaron en Santafé de Bogotá D.C. y 5 (10%) en otras regiones. 42(84%) casos correspondieron a fisuras labiales con o sin fisura palatina y 8(16%) casos a fisura palatina aislada. 41 (82%) casos correspondieron a procesos multifactoriales y 9(18%) casos a diversos síndromes entre los que se encuentran el EEC (fisura labial y palatina, ectrodactilia y displasia ectodérmica); Mohr y asociaciones con alteraciones en el desarrollo de primer arco braquial. En relación con la causalidad, en los casos de origen multifactorial, se observó que 32 (64%) de las familias tenían diversas representaciones de los cuales 19(38%) tenían fundamento mágico. Así mismo, se estableció que en relación con los riesgos de recurrencia en los casos multifactoriales 33 (66%) sobre-estiman el riesgo (consideran riesgos mayores de 20% para una futura gestación) y 10 (20%) subestiman los riesgos (consideran riesgos nulos para una futura gestación). Los hallazgos observados indican la necesidad de establecer un enfoque biopsicosocial y cultural en el A.G de estas familias, el cual permitirá realizar un proceso de comunicación más adecuado en la consultas.

7 / 02

ESTUDIO GENÉTICO DE UNA MOLA DIHAPLOIDE PATERNA

Ruiz Casares, E.[1], Orera, M.[2], Henriques Gil, N.[1]
[1]Sección de Genética. Universidad San Pablo-CEU. 28668 Madrid
[2]Servicio de Genética. Hospital Gregorio Marañón. Madrid

Se estudia el origen genético de una mola completa diagnosticada en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, en un embarazo doble con un feto normal. Se obtuvo DNA de la sangre de los padres y de los tejidos embronario y molar de feto y mola, respectivamente, para el estudio molecular de los siguientes marcadores genéticos: LDLR (crom. 19), GYPA (crom. 4), HBGG (crom. 11), D7S8 (crom.7), GC (crom. 4) y D1S80 (crom. 1).

El feto 46, XY tenía un genotipo normal, como es lógico con alelos tanto maternos como paternos. Por el contrario, la totalidad de la mola era homocigótica para todos los marcadores estudiados y, concretamente, para alelos procedentes del padre.

La dotación cromosómica de la mola se estudió mediante FISH con sondas centroméricas específicas de los cromosomas 18, X e Y. La obtención de una señal doble para los dos primeros y nula para el cromosoma Y demuestra que se trata de una dihaploidía 46, XX.

Por tanto, sólo la dotación genética del gameto masculino se hallaba representada y ésta sufrió después una duplicación, generando un tejido molar diploide completamente homocigótico.

7 / 03

COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS NK Y T HUMANAS EN REPOSO Y TRAS LA ACTIVACIÓN CON IL-2. APROXIMACIÓN AL CLONAJE DE NUEVOS GENES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS NK

Arce Martínez, I., Roda-Navarro, P., Weissman, S.M., Fernández-Ruíz, E.
Unidad de Biología Molecular
Hospital de la Princesa 28006 Madrid
narce@medmail.com, narce@hotmail.com

Las células Natural Killer (NK) tienen un papel directo en los mecanismos de defensa del organismo frente a infecciones y cáncer, así como indirecto mediante la participación en la regulación de la respuesta inmune. Las funciones de las células NK, así como su maduración y diferenciación, están reguladas por varios estímulos siendo interleucina-2 (IL-2) uno de los más importantes. Por otro lado las células NK y las células T derivan de un mismo precursor y están muy relacionadas tanto en función como en los mecanismos de citotoxicidad. En este trabajo hemos comparado el patrón de expresión génica de las células NK y T humanas, tanto en reposo como activadas con IL-2, y obtenido la secuencia de aquellos productos génicos presentes de forma específica en las células NK en reposo y/o activadas. Un posterior estudio de estas secuencias nos llevará a la identificación de genes no descritos candidatos a ser específicos de células NK en reposo y/o activación, así como un mayor conocimiento del patrón de expresión génica asociado a la activación en estas células.

7 / 04

SCREENING DE LA MUTACIÓN Arg91Gln EN EL GEN DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND

Torea Louzán, J., Penas Salgado, N., Batlle Fonrodona, F.J.
Servicio de Hematología y Hemoterapia: Hospital Juan Canalejo-Teresa Herrera.
As Xubias s/n, 15006 A Coruña. torea@retemail.es

La enfermedad de von Willebrand (EvW) tipo 2N está causada por anormalidades del sitio de unión del Factor de von Willebrand (FvW) para el factor VIII (FVIII). Esta forma de EvW se transmite en forma autosómica recesiva y puede confundirse con la hemofilia A. Su diagnóstico está basado en la marcada disminución de la afinidad de la unión del FvW del paciente con el FVIII normal. Este ensayo fenotípico está disponible solamente en pocos laboratorios. R854Q (Arg91Gln, G2811A) es la más frecuente de las mutaciones informadas que selectivamente inactiva dicho sitio de unión. El análisis fenotípico de algunos pacientes con esta mutación asociada con el tipo 2N no muestra inequívocamente la unión anormal FvW-FVIII. Nosotros presentamos un método de screening para la detección de la mutación R854Q en EvW tipo 2N usando sangre total y PCR-SSCP. Este método fue usado en doce pacientes (tres normales, dos homocigotos y siete heterocigotos para la mutación R854Q) de una familia no descripta anteriormente y cinco sujetos normales en los cuales la mutación no fue encontrada. Este método distingue tres patrones diferentes: homocigoto, heterocigoto y normal. La prescencia del polimorfismo R2805Q (G2805A) en los controles normales no alteró los patrones de SSCP observados. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se usó ADN purificado o sangre total. Estos dan cuenta de la importancia de este rápido y económico método de screening para la mutación Arg91Gln en la EvW tipo 2N.

7 / 05

PREVALENCE OF 231delG MUTATION AMONG USH2A PATIENTS IN THE SPANISH POPULATION

Nájera, C.[1]; Cuevas, J.M.[1], Espinós, C.[1], Millán, J.M.[2],
Ayuso, C.[3], Baiget, M.[4], Beneyto, M.[2]
1-Dpto Genética.Univ. Valencia. 2-Unidad Genética. Hosp. La Fe. Valencia.
3- Unit. Genèt. Hosp. Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.
4-Dpto Genét. F. Jiménez Díaz. Madrid.

El síndrome de Usher tipo II (USH2) es una enfermedad hereditaria, de transmisión autosómica recesiva, caracterizada por sordera sensorineural de moderada a severa y retinosis pigmentaria. Recientemente se ha aislado el gen USH2A, responsable de la patología en el 90-95% de las familias USH2 aunque se presupone la existencia de otro gen, todavía sin identificar, USH2B, que dé cuenta del resto de los casos. Se ha realizado un estudio genético en 44 familias españolas con al menos un miembro afectado de USH2. De las 19 familias susceptibles de análisis de ligamiento, 18 estaban ligadas a los marcadores situados en 1q cercanos al gen USH2A. El hecho de que sólo en 1 de las familias fallara el ligamiento al locus USH2A confirma la baja heterogeneidad genética asociada a esta forma clínica del síndrome y por tanto la importancia del análisis mutacional en el gen USH2A en aquellos pacientes que sufren síndrome de Usher tipo II. Hasta el momento sólo se han descrito tres mutaciones responsables de la enfermedad: 2314delG, 2913delG y 4353-54delCT. Hemos realizado una búsqueda de estas tres mutaciones en las 44 familias USH2 habiéndose encontrado la mutación 2314delG en 10 de ellas. Las otras dos mutaciones, que hasta la actualidad sólo se han encontrado en un único paciente en heterocigosis, no han sido halladas en nuestro estudio. El análisis de los haplotipos revela que no existe desequilibrio de ligamiento con la mutación 2314delG en nuestra población excluyendo la posibilidad de un único ancestro para dicha mutación.

7 / 06

REPETICIONES GAA EN EL GEN DE LA ATAXIA DE FRIEDREICH

González-Cabo, P.*, Cañizares, J.*, Blanca, J.M.*, De Castro, M. , Palau, F. , Moltó, M.D.*, de Frutos, R.*

*Departament de Genètica. Facultat de Ciències Biològicas. Universitat de València. 46100 Burjassot. Valencia Unitat de Genètica. Hospital La Fe. Valencia.

La ataxia de Friedreich (AF) es la forma más frecuente de las ataxias hereditarias. Se define como una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica recesiva y de inicio precoz. La prevalencia de la enfermedad se calcula en 1-4/100.000 en poblaciones europeas.

Alteraciones en el gen X25, localizado en la región pericéntrica 9q13-q21.1 causa dicha enfermedad. Este gen presenta siete exones que codifican para la frataxina, con 210 aa.

La mutación causante de la enfermedad, en un 98% de los casos, consiste en una expansión del triplete GAA (siendo la media de 8 repeticiones), presente en el intrón 1 del gen. Esta serie de repeticiones GAA se encuentra localizada en la zona central, rica en adeninas, de una secuencia *Alu* perteneciente a la subfamilia Sx. Nuestro estudio se basó en la observación de la distribución de las repeticiones GAA en diferentes poblaciones humanas. El DNA estudiado correspondía a 40 individuos Tanzanos, 30 Belgas y 40 muestras de Españoles. Las muestras fueron amplificadas por PCR con los primers GAAF y GAAR (Campuzano *et al.* 1996), y analizadas en geles de poliacrilamida para poder estimar el número de repeticiones presentes en cada individuo. Según el análisis realizado no se encontraron diferencias interpoblacionales en el número de repeticiones, si bien se observó un pequeño incremento en el número de alelos de mayor tamaño en la población española respecto a la belga y la tanzana. Algunas de las muestras fueron secuenciadas, presentando repeticiones puras, excepto una de ellas con una estructura GGAGAAGAAGAA.

7 / 07

OBTENCIÓN DE MUTANTES EN DROSOPHILA DE LA REGIÓN CROMOSÓMICA 8D

Navarro, J.A.; Blanca, J.M.; Martínez-Sebastián, M.J.; Moltó, M.D.
Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas; Universidad de Valencia.

En la región 8D del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* hemos identificado la presencia del gen DFH, gen homólogo al causante de la enfermedad conocida como Ataxia de Friedreich en la especie humana. La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa, con herencia autosómica recesiva y con un cuadro clínico bien caracterizado.

Nuestro objetivo consiste en la obtención de mutantes para este gen con el fin de poder estudiar su función. Consideramos a Drosophila como un buen organismo modelo para el estudio de la funcionalidad de este gen por su facilidad de manipulación, por ser uno de los organismos mejor caracterizados genéticamente, por el gran número de genes que comparte con el hombre, etc.

El método empleado para la obtención de mutantes para el gen Dfh, es la movilización de un elemento transponible P artificial, único, localizado citológicamente en la región de interés, en una cepa especial diseñada en el Proyecto Genoma de Drosophila de Berkeley.

Este elemento es incapaz de transponerse por si mismo, por ello el método consiste básicamente en cruzar esta cepa con otra que es portadora de fuente de transposasa y seleccionar moscas con una serie de marcadores, para escoger sólo aquellas en las que la nueva inserción sea en el cromosoma X y lo más cerca posible del gen DFH. En general, la movilización suele realizarse a zonas cercanas a la localización original(unas 100kb), entonces como consecuencia de la propia metodología han sido afectados otros genes diferentes al DFH, ubicados todos ellos en la región 8D.

7 / 08

SEVERIDAD EN EL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y SU RELACIÓN CON EL POLIMORFISMO BsmI DEL LOCUS VDR

Fibla, J. [(1)]; Esteve, P.[(1)]; Borras, M.[(2)]; Marco, M.P.[(2)]; Barber,Y.[(1)]; Torregrosa, V.[(3)]; Oliveras, A.[(4)]; Almirall, J.[(5)]; Muray, S.[(2)] y Fernández, E.[(2)]
[(1)]Dep. Ciències Mèdiques Bàsiques, UdL [(2)]Dep. Medicina UdL - Servicio de Nefrologia HAV, [(3)] Hospital Cínico, Barna, [(3)] Hospital del Mar, Barna y [(3)]Hosp. Parc Tauli, Sabadell.

Se ha demostrado la relación entre el genotipo BB y unos niveles bajos de parathormona (PTH) en pacientes con insuficiencia renal crónica (ICR) en hemodialisis (HD). Ello confiere a los pacientes con dicho genotipo un hipoparatiroidismo relativo. Sin embargo no se ha demostrado la relación de dicho polimorfismo con la severidad del hiperparatiroidismo secundario (HPS) en pacientes en HD o transplantados renales (TX).

Hemos estudiado un total de 85 pacientes en HD o TX que han requerido paratiroidectomia (PTX) dada la severidad del HPS. Como grupo control se han utilizado 120 individuos sanos y 34 pacientes en HD con valores de PTH inferiores a 12 pmol/L. Se han determinado mediante PCR-SSCP los genotipos para el locus VDR de cada uno de los individuos y las frecuencias genotípicas se han comparado mediante Chi cuadrado y tablas de contingencia.

Las frecuencias genotipicas obtenidas fueron: en la población control (BB, 13,4%; Bb, 55,8% y bb, 30,8%), en el grupo de baja PTH (BB, 32,4%; Bb, 59,9% y bb, 14,7%) y en el grupo PTX (BB, 11,8%; Bb, 44,7% y bb, 43,5%). En todos los grupos estudiados las frecuencias presentaron equilibrio Hardy-Weinberg. Al comparar las frecuencias genotipicas del grupo PTX con el grupo control estas no fueron significativamente distintas sin embargo las diferencias si fueron significativas cuando se comparo el grupo de PTX con el grupo de baja PTH ($p=0,002$). El genotipo bb esta sobrerepresentado en el grupo pTX respecto tanto al grupo control ($p=0,041$) como al grupo de baja PTH ($p=0,0029$). El riesgo de desarrollar HPS en los individuos con genotipo bb es 1,8 (IC95%: 1,029-3,30) respecto a la población control.

Según estos resultados el polimorfismo BsmI del locus VDR estaria implicado en la severidad del HPS en pacientes en diálisis y transplante renal.

7 / 09

POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y DEL GEN P-22 PHOX Y SU RELACIÓN CON EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN UNA POBLACIÓN DE BAJO RIESGO

Garrido-Ramos, M.A.; Mata-Balaguer, T.; Ruiz Rejón, F.[#];
De la Herrán, R.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M.
Departamento de Genética; Facultad de Ciencias; Universidad de Granada; 18071 Granada, y [#] Sec. de Cardiología y Unidad de Nutrición. Hospital de Móstoles. Madrid

El polimorfismo para una inserción-deleción del gen codificador de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y el polimorfismo en el sitio C242T del gen codificador de la cadena ligera de la subunidad alfa del citocromo b-558 (p-22 phox) se han implicado en la génesis de diversas formas clínicas de la enfermedad coronaria y cardiovascular. Se ha sugerido una posible asociación entre el genotipo DD de la ACE y el infarto agudo de miocardio (IAM) y de los genotipos CT y TT del gen p-22 phox con una protección frente al IAM.

Para verificar esta hipótesis desarrollamos un estudio de casos-controles en el área Sur de Madrid. Se han estudiado 47 pacientes de entre 20-70 años ingresados en la UCI del Hospital de Móstoles por un primer episodio de IAM y 41 controles seleccionados entre sujetos con procesos quirúrgicos banales y sin ningún tipo de enfermedad coronaria, de acuerdo con el cuestionario de Rose y electrocardiograma. Tanto casos como controles, no eran diabéticos, ni hipercolesterolémicos, ni hipertensos conocidos, es decir constituyen una población de bajo riesgo.

La conclusión más importante de nuestro análisis hasta el momento es que el polimorfismo del gen de la ACE es un factor predictor positivo de IAM en la población estudiada, no habiéndose encontrado asociación alguna entre los genotipos CT y TT del gen p-22 phox y la supuesta protección frente al IAM.

7 / 10

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN RELACIÓN CON LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Escribano, J.[1]; Martínez, E.[2]; Puras, A.[3]; Carrión, L.[4]; Artigao, M.[4]; Sanchis, C.[4] Divison, J.A.[4]; Massó, J.[4]; García, F.[4]; Rodríguez, B.[4]; Vidal, A.[4]; Fernández, J.A.[1]
1Sección de Biotecnología, IDR, UCLM, Albacete; 2Unidad de Investigación, Hospital General de Albacete; 3Fundación Hospital de Alcorcón; 4GEVA, Albacete. Email jescribano@med-ab.uclm

El objetivo del trabajo es analizar la relación existente entre los siguientes polimorfismos de genes del sistema renina-angiotensina (SRA): Mutaciones en las posiciones 174 y 235 del gen del Angiotensinógeno (T174M y M235T), una deleción (D), inserción (I) de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y un cambio de una A(r) C en la región 3'no traducida (nucleotido 1166) del gen del receptor tipo I de la angiotensina II (ATI-R), con los niveles de ECA en suero; y los valores de presión arterial (PA) en una población española a través de un estudio con diseño casos-control. Se obtuvo una muestra al azar de 1322 individuos de la provincia de Albacete, 205 de ellos presentaron los valores más elevados de presión arterial (PA) ajustados por edades y sexo, quinto quintil : media de PA sistólica de138 y PA diastólica de 79.8 mm Hg y 192 con los niveles menores de PA primer quintil.: Pas 117.3 y Pad 72.1 mmHg. El análisis se realizó mediante PCR y digestión con enzimas de restricción. Se observó una frecuencia significativa más alta del alelo T174 del gen AGT en individuos del 5ºquintil. Se evidenció una interesante asociación entre antecedentes familiares (historia de familiares con hipertensión y enfermedades cardiovasculares) y el genotipo T174T-T235T. Asimismo se encontró asociación significativa entre los niveles de enzima y el alelo D del gen ECA. No se encontró relación entre los polimorfismos M235T del gen AGT, y los polimorfismos de los genes ECA y AT1 R, con niveles de PA más altos.

7 / 11

ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES Y SU APLICACIÓN PARA EL ESTABLECIMIENTO DE HOMOLOGIAS EN CROMOSOMAS SEXUALES: IMPLICACIONES GENÉTICO-EVOLUTIVAS

González-Neira, A., Gusmao, L., Brión, M.J., Sánchez-Diz, P., Barral, S., Salas, A., Lareu, M.V., Carracedo, A.
Instituto de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela. España.
San Francisco s/n. 15705. Fax: 981-58 03 36. e-mail: apimlang@uscmail.usc.es

El estudio de diversos marcadores genéticos en la región no-pseudoautosomal del cromosoma Y ha permitido establecer a lo largo de estos últimos años las bases para el establecimiento de un modelo de evolución para los cromosomas sexuales.

Diversos microsatélites del cromosoma Y localizados en la región no recombinante han sido estudiados con fines genético poblacionales en diferentes poblaciones humanas con el fin de establecer sus patrones de migración a lo largo de la historia. Dos de estos microsatélites tetranucleotídicos (DYS391 y DYS393) muestran durante su análisis por PCR de varones, amplificaciones "aparentemente" inespecíficas. Un análisis posterior de estos sistemas en mujeres nos ha permitido establecer homologías entre ambos cromosomas sexuales.

En el siguiente trabajo presentamos las distribuciones de frecuencias para estos sistemas tanto en hombres como en mujeres en los tres grandes grupos poblacionales humanos (caucasoides, africanos y asiáticos).

Todos los alelos han sido secuenciados en hombres y mujeres concluyendo que existen regiones en la zona no-pseudoautosomal del cromosoma Y que son compartidas con el cromosoma X. Existe una gran homología entre las secuencias en ambos sexos, no solo en las regiones repetitivas sino también en las flanqueantes. Se describen diversos polimorfismos puntuales, además de varias inserciones y delecciones en las regiones flanqueantes.

Por otro lado, se presentan resultados preliminares obtenidos para estos sistemas STRs en diversos primates. El análisis exhaustivo de todos estos resultados consideramos que puede suponer un paso más hacia el conocimiento del origen de los cromosomas sexuales y su posterior divergencia.

7 / 12

DESARROLLO DE NUEVOS STRs HIPERVARIABLES

Barral, S., Lareu, M.V., Sánchez-Diz, P., Salas, A., Brión, M.J., González-Neira, A., Carracedo, A.
Instituto de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela. España.
San Francisco s/n. 15705. Fax: 981-58 03 36. e-mail: apimlang@uscmail.usc.es

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la gran importancia de una correcta elección de loci STRs apropiados para llevar a cabo análisis genéticos, así como la necesidad de su validación y estandarización.

La selección de los loci microsatélites se hace teniendo en cuenta criterios como sus elevadas tasas de heterocigosidad, bajas tasas de mutación, bajos porcentajes de bandas artefactuales o "sttuter bands", robustez en su amplificación y la posibilidad de desarrollar sistemas multiplex.

Aunque la mayoría de los loci STRs son seleccionados de acuerdo con estos criterios, en los últimos años se ha verificado la importancia de la elección de sistemas microsatélites que presenten porcentajes muy bajos de bandas artefactuales que aseguren una correcta asignación alélica y con pequeño tamaño que facilite su estudio en muestras degradadas.

Se llevó a cabo una búsqueda inicial en diferentes bases de datos (GeneBank, CHLC) con el fin de encontrar STRs tetranucleotídicos con tasas de heterocigosidad superiores al 75% y con condiciones de amplificación comunes.

Tras un estudio preliminar se seleccionaron 4 de éstos loci microsatélites: D1S1656, D18S535, D22S683, D6S477 que cumplen todas las características anteriormente citadas.
En este trabajo se presentan los datos del estudio poblacional de estos sistemas en la población gallega así como el estudio de secuencia de las diferentes variantes alélicas encontradas para cada locus y la construcción de "ladders" o escaleras alélicas secuenciadas.

Estos 4 loci STRs presentan una elevada hipervariabilidad que junto con su robustez de amplificación demuestran su utilidad en Genética molecular, Genética de poblaciones y Genética forense.

7 / 13

DETECCIÓN DE QUIMERISMO MIXTO EN RECEPTORES DE TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA ALOGÉNICA

de Pancorbo, M.M.[1], Bezares, R.[1], Richard, C.[2], Ortin, M.[2], Fernández-Fernández, I.[3], Anzola, M.[1], Cuevas, N.[1], López-Martínez, M.[1]

(1) Dpto. Biología Celular y C. M., Ftad. Medicina, Universidad del País Vasco, Leioa-Bizkaia, (2) Dpto. Hematología. Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, (3) DataGene, Sangroniz 6, Sondika-Bizkaia.

El trasplante de médula ósea ofrece elevados índices de curación en pacientes con leucemia aguda, crónica y algunos tipos de linfoma, no exentos de complicaciones tales como Enfermedad del Injerto contra Huésped y recurrencia de la enfermedad. Por todo ello, la determinación quimerismo/quimerismo mixto contribuye a un conocimiento exacto de la evolución del paciente además de ser un indicador temprano de posible recaída.

El análisis de regiones hipervariables de ADN es una herramienta poderosa para la detección de la presencia de quimerismo mixto. Los loci de ADN minisatélite son capaces de discriminar entre parientes muy próximos aunque requieren tiempos largos para su análisis y son de difícil incorpación en la rutina hospitalaria.

Para paliar estas desventajas, hemos realizado un trabajo encaminado a detectar el quimerismo mixto utilizando loci de ADN microsatélite.

Se han estudiado 55 pacientes trasplantados con médula ósea alogénica en el Hospital Marqués de Valdecilla (Santander). Se han analizado los loci de ADN minisatélite D1S7, D7S21 y D12S11 y los loci microsatélite HUMTH01, HUMTPOX, HUMCSF1PO, HUMF13A, HUM FES/FPS y HUM VWA/31.

El análisis de ADN minisatélite puso de manifiesto la presencia de quimerismo mixto en 5 pacientes. El análisis de ADN microsatélite también permitió detectar el quimerismo mixto en los cinco pacientes, sin embargo, fue necesario analizar simultáneamente a los donantes de médula o las raíces de cabellos de los pacientes para la detección de su genotipo constitucional.

Los resultados obtenidos indican que pese a la menor capacidad de discriminación de los loci microsatélites, éstos han sido, en la práctica, tan eficaces como el ADN minisatélite en la detección del quimerismo mixto hematopoyético.

7 / 14

VARIABILIDAD ALÉLICA DEL LOCUS CCR5 EN INDIVIDUOS VIH (+) Y VIH (-) CON CONDUCTA DE RIESGO

Fibla, J. (1); Barber, Y. (1); Rubio, M,C. (2); Utgés, M.T. (2);
Esteve, P. (1) y Rubio, M. (2)
(1) Dep. Ciències Mèdiques Bàsiques, UdL.
(2) Servei Med. Interna HUAV de Lleida. email joan.fibla@cmb.udl.es

El virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 infecta células CD4+ utilizando CCR5 como correceptor. Una variante alélica del locus CCR5 (delección de 32 pb, d32) confiere, en homozigosis, protección a la infección por el virus y se ha asociado, en heterozigosis, con una progresión más lenta de la enfermedad.

Hemos determinado la frecuencia del alelo d32 en una población de 405 individuos VIH (+) en estadios diferentes de la enfermedad (CDC 1993). De estos, 310 corresponden al grupo de riesgo de adictos a drogas por vía parenteral(ADVP) y 95 al grupo de contacto heterosexual. Así mismo, hemos estudiado una población de 81 individuos VIH (-) con conducta de riesgo para la infección por VIH, de los cuales 54 son ADVP y 27 son parejas heterosexuales de individuos VIH (+). Como población control se han utilizado 215 individuos sanos del área hospitalaria de Lleida. La frecuencia de los genotipos en la población control (+/+, 85%; +/d32, 13,5%; d32/d32, 1,4%) así como en la población VIH (+) (+/+, 86,5%; +/d32, 13,5%; d32/d32, 0%) y VIH (-) (+/+, 68%; +/d32, 12%; d32/d32, 1%) están en equilibrio Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas entre estos tres grupos se compararon mediante tablas de contingencia. El análisis conjunto de las tres poblaciones reveló diferencias no significativas entre las mismas ($p=0,2$). La comparación de los grupos dos a dos indicó diferencias significativas entre controles y VIH (+) ($p=0,049$); y no significativas entre controles y VIH (-) ($p=0,95$) y entre VIH (+) y VIH (-) ($p=0,066$). Agrupando a los pacientes VIH (+) según el ritmo en que progresa la enfermedad, las frecuencias de los genotipos en cada grupo no fueron significativamente distintas. Agrupando a los pacientes VIH (-) según el comportamiento de riesgo (ADVP y heterosexual), las frecuencias de los genotipos no fueron significativamente distintas entre ellos ($p=0,099$). Sin embargo, comparando la población VIH (+) con VIH (-) según el comportamiento de riesgo, las frecuencias de los genotipos fueron significativamente distintas en el grupo ADVP ($p=0,028$) pero no en el grupo heterosexual ($p=0,407$). Estos resultados indican que el polimorfismo d32 del locus CCR5 no está asociado con la progresión clínica en nuestros pacientes, pero si parece conferir cierta protección a la infección en los individuos VIH (-) del grupo ADVP.

7 / 15

TERAPIA GÉNICA EXPERIMENTAL EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Miana-Mena, J.; Muñoz, M.J.; Zaragoza, P.; Osta, R.
LABORATORIO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA Y GRUPOS SANGUÍNEOS.FACULTAD DE VETERINARIA DE ZARAGOZA. C/ MIGUEL SERVET 177. TEL 976 76 16 20 FAX 976 76 16 12

La inyección de ADN desnudo comenzó a ser utilizada de manera casi accidental a finales de los 80 (*Felgner, 1988*). A partir de entonces, son dos las aplicaciones principales de esta técnica. Por un lado, su utilización como vacuna, de modo que la proteína inmunógena sea producida por el propio individuo; y por otro su empleo como vector en terapia génica.

La TTC es el fragmento C atóxico de la toxina tetánica, capaz de penetrar en las motoneuronas por la placa motora y llegar al Sistema Nervioso Central mediante un transporte retrógrado. Se ha demostrado que la fusión de la β-Galactosidasa y dicho fragmento no altera las actividades enzimáticas propias de estas proteínas (*Coen y cols., 1997*).

En el presente trabajo estudiamos la expresión de dos plásmidos diferentes inyectados intramuscularmente. En ambos se encuentra el promotor eucariota de citomegalovirus, en el primero fusionado al gen de la β-Galactosidasa (CMV-LacZ), y en el segundo al gen de la proteína de fusión β-Galactosidasa y TTC (CMV-LacZTTC). Tras la inyección en el músculo hipogloso de los plásmidos CMV-LacZ y CMV-LacZTTC en 35 ratas, se observó mediante la reacción colorimétrica de la β-Galactosidasa su expresión en las células musculares.

Los resultados muestran que el grado de expresión en el músculo depende de la edad de los animales, la dosis y del tiempo transcurrido desde la inyección. Si estos resultados preliminares se confirman, podremos pensar en el vector TTC como vehiculador de actividades enzimáticas al Sistema Nervioso, abriendose posibilidades interesantes en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

7 / 16

RECONSTRUCCIÓN DE LA HISTORIA EVOLUTIVA DEL RETROVIRUS ENDÓGENO HUMANO ERV9

Costas Costas, J.
Departamento de Bioloxía Fundamental. Universidade de Santiago de Compostela
15706 Santiago de Compostela. bfcostas@usc.es

La historia evolutiva de las principales familias de elementos repetitivos dispersos del genoma humano, Alu y L1, ha sido ampliamente estudiada mediante el método "paleogenómico". La mayoría de los elementos Alu y L1 surge en cada momento concreto de la evolución debido a la retrotransposición de uno o unos pocos elementos activos. La acumulación de mutaciones en estos elementos, o su sustitución por otros elementos de su propia progenie, da lugar a subfamilias de copias pseudogénicas caracterizadas por substituciones nucleotídicas propias.

En este trabajo, se ha aplicado el método paleogenómico al estudio de la evolución del retrovirus endógeno ERV9. Comparando las secuencias del GeneBank con las primeras 676bp del LTR de ERV9, se identificaron 156 elementos distintos, que fueron clasificados en 14 subfamilias usando alrededor de 150 cambios nucleotídicos característicos. La edad de cada subfamilia fue estimada aproximadamente mediante la divergencia promedio existente entre los elementos de cada subfamilia y su secuencia consenso (la mejor reconstrucción posible del elemento activo que originó la subfamilia). La acumulación de sustituciones características a lo largo del tiempo nos permitió identificar cuatro linajes. La evolución de ERV9 ha estado dirigida por un linaje principal durante toda la evolución de los primates. De él han divergido, en épocas distintas, dos linajes que retuvieron su capacidad de transposición durante un periodo de tiempo significativo. La recombinación entre el más joven de estos linajes y el linaje principal dió lugar a uno nuevo que, al igual que el principal, ha experimentado amplificaciones importantes en un periodo evolutivo relativamente reciente.

Trabajo financiado por el proyecto XUGA 10304B97, dirigido por H. Naveira

7 / 17

LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EL GEN DE LAS PRESENILINAS: BÚSQUEDA DEL GEN HOMÓLOGO EN *Drosophila*

Cervantes, S.; Gonzàlez-Duarte, R. y Marfany, G.
Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Avda. Diagonal 645. 08028 Barcelona

La etiología de la enfermedad de Alzheimer es muy compleja. Se sabe que intervienen factores genéticos, de susceptibilidad y ambientales. El 70% de los casos de Alzheimer con herencia autosómica dominante se deben a mutaciones puntuales en los genes de las presenilinas 1 y 2 (PS-1 y PS-2). Las presenilinas son proteínas transmembrana que están ancladas en el retículo endoplasmático y aunque no se conoce su función, se cree que podrían estar implicadas en el tráfico o procesamiento intracelular de proteínas. Para abordar estudios funcionales, hemos caracterizado el gen homólogo de *Drosophila*. Se trata de un gen de copia única (PS-D) que presenta un *splicing* diferencial en una región hidrofílica, supuestamente implicada en la interacción con otras proteínas. El análisis de los productos de expresión y de las hibridaciones *in situ whole mount* revela una presencia ubicua durante el desarrollo así como en distintas bandas germinales y tejidos, incluyendo el nervioso. Actualmente, se están realizando construcciones de distintos fragmentos de D-PS para analizar en levadura la formación de oligómeros entre ellos (mediante la técnica de *two-hybrid*) y se está analizando una genoteca de cDNA de *Drosophila* utilizando esta misma estrategia para identificar otras proteínas que interaccionen con la D-PS.

7 / 18

CARACTERIZACION MOLECULAR DEL HOMOLOGO PORCINO AL CD1D HUMANO. EVIDENCIA DE CONSERVACION EVOLUTIVA.

Morera Sanz, L., Garrido Pavón, J.J., de Andrés Cara, D., Barbancho Medina, M., Llanes Ruiz, D.

Unidad Mixta CSIC-UCO (Marcadores genéticos moleculares). Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Córdoba

En el hombre el locus CD1 contiene 5 genes (A,B,C,D,E) que codifican para la familia CD1 de proteínas semejantes a las de MHC de clase I, denominadas así debido a que desde un punto de vista estructural y probablemente funcional están relacionadas con los antígenos MHC de clase I, fundamentales para la presentación de los antígenos a las células T. Recientemente ha sido demostrada la participación de las moléculas CD1 en la activación de células T mediada por un mecanismo de presentación de antígenos de naturaleza no peptídica, concretamente lípidos, lo que representa un fenómeno desconocido dentro del proceso de la respuesta inmune. En este trabajo presentamos la caracterización del homólogo porcino al CD1D humano cuya secuencia de cDNA completa ha sido obtenida mediante la técnica de RACE. Exceptuando el péptido señal, la secuencia porcina codifica un polipeptido de 312 aa con un elevado grado de homología con las de otras especies. Este nivel de conservación no es sólo secuencial sino tambien estructural: CD1D porcino muestra la típica organización genómica de las moléculas CD1: tres dominios extracelulares (a1, a2 y a3), una región transmembranaria y un corto segmento citoplasmático. El mayor nivel de homología con respecto a otros moléculas CD1 se presenta en el dominio a3, altamente conservado en todas las especies estudiadas, probablemente debido a que es a través de a3 por donde se produce la unión a la b2-microglobulina cuando CD1 es expresado en la superficie celular. Los dominios a1 y a2 muestran un menor nivel de homología con las moléculas CD1 caracterizadas en otras especies.

7 / 19

ANÁLISIS DE BLOQUES EN TRASTORNOS AUTOSÓMICOS DOMINANTES

Velasco, A. y Benito, C.
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense
28040-Madrid

Hemos desarrollado un método rápido para detectar marcadores ligados a enfermedades autosómicas dominantes. El "Análisis de Bloques" consiste en agrupar los individuos de una genealogía en dos clases, un bloque de sanos y otro de afectados, mezclando cantidades iguales de ADNs de los individuos correspondientes.

Para comprobar esta metodología, se han utilizado tres trastornos con herencia autosómica dominante, estudiándose cuatro familias: una con Corea de Huntington, dos con Retinosis Pigmentaria y la última con Distrofia Macular.

Se construyeron bloques de sanos y afectados procurando que el número de individuos de cada bloque no fuera inferior a 10. Se realizaron amplificaciones en los bloques con parejas de cebadores de minisatélites y microsatélites cercanos al gen que produce la anomalía y situados en cromosomas distintos.

Cuando el marcador estaba en un cromosoma distinto al del gen de la enfermedad, los bloques de sanos y afectados presentaban el mismo patrón de amplificación. Sin embargo, si el marcador estaba próximo al gen responsable, los bloques mostraban patrones diferentes. El análisis individual corroboró los resultados del análisis de bloques.

El "Análisis de Bloques" puede ahorrar tiempo y dinero para identificar marcadores ligados a enfermedades autosómicas dominantes. Para evitar la aparición por azar en algún bloque de marcadores no ligados, debe controlarse el número de individuos que lo constituyen: a mayor tamaño menor probabilidad.

Se discute la posible aplicación de esta metodología a otros tipos de enfermedades.

7 / 20

CLONAJE MEDIANTE HIBRIDACION SUSTRACTIVA Y CARACTERIZACIÓN DE cDNAs QUE CODIFICAN LA PROTEÍNA TIGR/MIOCILINA, IMPLICADA EN EL GLAUCOMA JUVENIL DE ANGULO ABIERTO

Escribano, J.[1], Ortego, J.[2], Coca-Prados, M.[2]
1Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha. 2Department of Ophthalmology and Visual Science, Yale Universtiy Medical, School, USA.
Email jescribano@idr-ab.uclm.es

El glaucoma juvenil de ángulo abierto es una enfermedad hereditaria originada por el aumento de la presión intraocular, capaz de producir ceguera por lesión del nervio óptico. Hemos aislado 4 clones de una genoteca sustractiva de cDNA del cuerpo ciliar humano, que muestran una similitud de secuencia del 100% con la región codificante del primer gen implicado en este tipo de glaucoma, denominado TIGR (trabecular meswork-induced glucocorticoid protein)[1]. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA predice: i) un péptido señal en el extremo N-terminal; ii) un motivo cremallera de leucina donde se repiten periódicamente residuos de leucina y de arginina cada 7 y cada 11 aminoácidos respectivamente; iii) una región situada entre los aminoácidos 72 y 179 con un 25% de similitud de secuencia con miosina y vi) otra región (259-501), donde se localizan las mutaciones implicadas en este tipo de glaucoma, con un 40% de similitud con olfactomedina, una pr! >oteína de la matriz extracelular del neuroepitelio olfativo. El RNAm de TIGR está restringido en los tejidos oculares al cuerpo ciliar y al iris, mientras que en tejidos extraoculares se localiza en corazón y músculo esquelético. Aunque la función de la proteína es desconocida, proponemos que se trata de una molécula extracelular implicada en la interacción con otras proteínas a través del motivo cremallera de leucina. Este trabajo contribuye a establecer las bases moleculares para profundizar en el conocimiento de la etiología del glaucoma.

1Stone, E.M., et al. (1997) **Science** 275, 668-670. >

7 / 21

CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA PRESENILINA EN *AMPHIOXUS*

Martínez-Mir, A., Albalat, R., Gonzàlez-Duarte, R.
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08071. Barcelona

La enfermedad de Alzheimer es una de las demencias seniles más comunes en humanos. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en tres genes, responsables de la forma familiar de esta enfermedad: el gen *APP*, que codifica para el precursor de la proteína amiloide y los genes *PS1* y *PS2*, que codifican para las presenilinas 1 y 2 con un 67% de identidad.

Los genes de las presenilinas (*PS*) se han conservado a lo largo de la escala evolutiva, desde *Drosophila* y *C.elegans* hasta vertebrados. Sin embargo, se desconoce su función y el número de copias es variable: un gen en *Drosophila*, tres en *C.elegans* y dos en veretebrados. Por tanto, es difícil establecer un patrón evolutivo claro.

El objetivo de nuestro trabajo es analizar la estructura y función de estos genes en *amphioxus*, el ancestro vivo más cercano a los vertebrados y cuya organización genómica es considerada arquetípica en los cordados. Se han aislado los cDNAs y las regiones genómicas del gen *PS* de *Branchiostoma floridae*: es un único gen, con un *splicing* diferencial que produce una inserción/deleción en pauta de 22 aminoácidos y señales de poliadenilación alternativas que generarían al menos tres secuencias distintas en la región 3’ no traducida.

Nuestros resultados indican que el gen *PS* en *amphioxus* es de copia única. El *splicing* diferencial y la existencia de diferentes regiones 3' no traducidas son rasgos comunes en la mayoría de las presenilinas.

7 / 22

CLONACIÒN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS REGIONES IMPLICADAS EN UNA TRANSLOCACIÓN X/10 ASOCIADA A UN FENOTIPO MUY COMPLEJO

Martínez Garay, I.[1], Jablonka, S.[1], Kutsche, K.[1], Nothwang, H.[2], Gal, A.[1]
[1]Institut für Humangenetik. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
Universität Hamburg, Butenfeld 42, 22529 Hamburg.
imartine@plexus.uke.uni-hamburg.de
[2]Max-Planck Institut für Molekulargenetik, Berlin.

Pacientes con un fenotipo clínico y que presentan una translocación cromosómica facilitan la clonación posicional de nuevos genes. En nuestro caso la paciente muestra un fenotipo complejo, con retraso psicomotor, labio leporino, cambios inespecíficos del epitelio pigmentado de la retina y nystagmus rotatorio, y presenta una translocación [(10;X)(q24;p22.3)].

Por medio de FISH identificamos YACs y PACs solapantes en ambos cromosomas y, en el caso del cromosoma X, incluso un cósmido. En dicho cósmido hemos localizado un gen que no ha resultado interrumpido por la translocación, pero que podría estar desregulado en la paciente, según estudios de RT-PCR. El gen muestra homología con ESTs de genotecas de testículo y su proteína correspondiente presenta una homología débil con la proteína meiótica Cor 1 de *M.auratus*. Habiendo descartado la presencia de otros genes en la zona, estudios funcionales y de expresión de este gen nos permitirán aceptar o descartar su implicación en el fenotipo de la paciente.

En relación al cromosoma 10, hemos construido un contig de 15 PACs en la zona de rotura, y todos ellos hibridan en ambos cromosomas translocados en estudios de FISH, a pesar de que algunos no comparten regiones comunes. Por ello proponemos que se ha producido una inversión previa a la translocación y que habría, por tanto, tres puntos de rotura en el cromosoma. Para hallar posibles genes implicados estamos utilizando técnicas de exon-trapping con tres de esos 15 PACs, que cubren la región entera.

7 / 23

MARCADORES GENÉTICOS DE REESTENOSIS CORONARIA

Irurita, M.[1], Zee, R.Y.L.[1], Fernández-Ortíz, A.[2], Macaya, C.[2],
Pintor, E.[2], Fernández-Cruz, A.[2], Lindpaintner, K.[1].
Email mirurita@correo.hpino.rcanaria.es
1 Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EEUU;
2 Hospital Universitario San Carlos, Madrid.

La reestenosis es la principal complicación de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), presentándose hasta en 50% de procedimientos inicialmente eficaces. Se ha comprobado la implicación de cascadas inflamatorias y distintos genes, como la E-selectina o los factores de necrosis tumoral-alpha (TNF-a) y -beta (TNF-b), en la fisiopatología de la reestenosis.

Métodos y resultados: Determinamos los polimorfismos alélicos en una serie de 779 pacientes con 2 estudios angiográficos de los que 342 habían desarrollado reestenosis (casos). Definiendo la reestenosis como una pérdida de la luz obtenida tras la dilatación 50% a los 6 meses de la angioplastia. Las frecuencias alélicas para la E-selectina, alelos E-sel E1 y E2 (alelo E1/E2, ausencia/presencia del fragmento de restricción PstI) fueron 0.11 y 0.89 en los casos, ante 0.09 y 0.91 para los controles. Las frecuencias alélicas para TNF-a N1 y N2 (alelo N1/N2, ausencia/presencia del fragmento de restricción NcoI) fueron 0.15 y 0.85 para los casos, frente a 0.14 y 0.86 en los controles. Las frecuencias alélicas para TNF-b N3 y N4 (alelos N3/N4, ausencia/presencia del fragmento de restricción NcoI) fueron de 0.70 y 0.30 en los casos, frente a 0.74 y 0.26 en los controles, respectivamente. Las frecuencias genotípicas observadas estaban en equilibrio de Hardy- Weinberg. No encontramos evidencia de asociación entre los genotipos, el desarrollo de reestenosis, ni la pérdida de la ganancia inicial ajustado para covariables. En conclusión: Nuestros datos, derivados del estudio más amplio de su género hasta la fecha, indican que los polimorfismos de la E-selectina y los factores de necrosis tumoral alfa y beta analizados no se asocian con la aparición de reestenosis postangioplastia y no son marcadores de riesgo útiles.

7 / 24

ENFERMEDAD DE HUNGTINTON: DIAGNÓSTICO MOLECULAR BASADO EN ELECTROFORESIS EN GEL DE PA-UREA DESPUÉS DE LA PCR

Beyer, K., Lao, J.I., Méndez, J., Pásaro, E.
Unidad de Genética y Diagnóstico Molecular. Facultad de Ciencias de la Educación. Universidad de la Coruña. Campus Elviña s/n, E15071. La Coruña.
Tel. 981-167000 (1709). E-mail: gedimo@udc.es

La enfermedad de Huntington es una enfermedad genética autosómico dominante con penetrancia completa, cuyo gen presenta una expresividad tardía (el debut de la enfermedad suele ser alrededor de los 40 años). La variante clínica juvenil, que es la más grave, suele transmitirse predominantemente por vía paterna.

El gen responsable se encuentra ubicado distalmente en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Este gen, llamado IT15 (interesting transcript 15') está presente en muchos tejidos incluido el cerebro aunque por ahora su función real permanece sin determinar. El defecto genético se debe a la expansión del trinucleótido CAG, con unas copias entre 6 a 28 en controles normales y entre 39 a 121 en los pacientes.

Presentamos un método fidedigno para el diagnóstico molecular de la enfermedad, basado en la PCR con primers que flanquean al gen IT-15, seguida de la separación por PAGE desnaturalizante 15% y tinción con plata. El método permite la detección del número de copias de CAG dentro del gen IT15, lo que a su vez posibilita la confirmación del diagnóstico o sospecha clínica en pacientes adultos con la enfermedad, la confirmación de las formas juveniles en menores, la posibilidad de realizar el test predictivo en individuos asintomáticos que tengan antecedentes familiares para la enfermedad (riesgo 50%) y el diagnóstico prenatal en familias de alto riesgo.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10605B98)

7 / 25

ANÁLISIS MEDIANTE FISH CON SONDAS Alu DE DERIVADOS CROMOSÓMICOS EN 20 PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

García, S., Costoya, S., Fernández, R. y Pásaro, E.
Departamento de Psicología. Área Psicobiología
Universidade de A Coruña, Elviña s/n, 15071. E-mail: ssandra@udc.es

En el presente estudio se han analizado los derivados cromosómicos de 20 pacientes con Síndrome de Turner con el fin de determinar su naturaleza y estructura. Para ello se han utilizado principalmente sondas obtenidas por amplificación de secuencias Alu mediante PCR. El empleo de estas sondas muestra un modelo de señales de hibridación que coincide con el patrón de bandas R.

Mediante la utilización de esta técnica se pudo comprobar la presencia de material de los brazos corto (Xp) y largo (Xq) en los derivados cromosómicos de cuatro de las pacientes, y la presencia únicamente de material del Xq en el fragmento derivado del X de una quinta. Los casos más significativos fueron los de cinco pacientes en las que el cariotipo inicial hubo de ser rectificado tras el empleo de las sondas Alu. En el primero de ellos, cuyo cariotipo inicial era 45,X/46,X,del(Xpter-Xcen), el fragmento cromosómico resultó ser un isocromosoma Xq de tamaño variable. El segundo, cuyo cariotipo inicial era 45,X/46,X,del(Xq13), presentaba realmente una delección completa del brazo corto (Xp). En otros dos casos, pacientes que habían sido remitidas a nuestro laboratorio como 45,X/46,XX, se encontró la presencia de un pseudoisocromosoma dicéntrico para el brazo corto, quedando establecido el cariotipo final como 45,X/46,X,psu dic(X)(Xp→Xq21::Xq21→Xpter). El quinto caso era el de una paciente que presentaba una delección al nivel de la banda Xp22.1 y que había sido diagnosticada previamente como 46,X,add(X)(p22.1). En el resto de pacientes el empleo de esta técnica permitió verificar la presencia de isocromosomas e isocromosomas dicéntricos.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10403B95 y 10605B98)

7 / 26

ESTUDIO DE LA RELACIÓN CARIOTIPO-FENOTIPO EN 40 PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

García, S., Costoya, S., Fernández, R., y Pásaro, E.
Departamento de Psicología. Área Psicobiología.
Universidade de A Coruña, Elviña s/n, 15071. E-mail:ssandra@udc.es

La complejidad fenotípica característica del Síndrome de Turner puede explicarse por dos teorías diferentes relacionadas con el mosaicismo oculto.
- Existencia de una segunda línea celular durante el desarrollo embrionario.
- Existencia de mosaicismo en otros tejidos.

Aquellos casos 45,X que presentan multitud de rasgos turnerianos pero estatura normal, son explicables gracias a las teorías anteriores. La paciente con cariotipo 46,X,del (Xp22.3), que presenta únicamente talla baja tuvo probablemente una alteración a nivel de cigoto, de tal forma que nunca existió una segunda línea celular. El cuello alado es característico de pacientes 45,X, apareciendo en un 66% de los casos.

Los pacientes con fragmentos derivados del X presentan todos talla baja y síntomas relacionados con alteraciones del sistema linfático. En el caso de la paciente con cariotipo 45,X/46,X + frag(X) (99%/1%), la ligera deficiencia que presenta está asociada a la pérdida del centro de inactivación en el derivado cromosómico.

En pacientes que presentan un cromosoma Y o un idic (Y^{nf}) el rasgo principal es el desarrollo sexual femenino completo debido, más que a la presencia del Y, a la línea 45,X que actúa como determinante del desarrollo gonadal.

Los pacientes con una segunda línea trisómica, 45,X/47XXX, presentan principalmente síntomas relacionados con alteraciones del sistema linfático. Aquellos que presentan isocromosomas e isodicéntricos muestran síntomas de tipo funcional que resultan de la adición de material de Xq más que de la ausencia de Xp.

Los pacientes triples mosaicos tienen como carácter común la ausencia del ovario izquierdo o de ambos, aunque el origen de esta alteración es desconocido.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10403B95 y 10605B98)

7 / 27

DETECCIÓN DEL *TROPHERYMA WHIPPELLII POR PCR*

Filgueira Fernández, P.[1], Lema Costa, B.[1], Prada Puentes, C.[1,2], Álvarez García, A.[1,2], Blanco García, F.[1,3] , Arnal Monreal, F.[1,2]

[1] T.E.A.P. de la Unidad de Investigación. Hospital "Juan Canalejo". A Coruña
[2] Servicio de Anatomía Patológica. Hospital "Juan Canalejo". A Coruña
[3] Servicio de Reumatología. Hospital "Juan Canalejo". A Coruña

FUNDAMENTOS

Existen “primers” para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicos para el bacilo *Tropheryma Whippellii*. Esta técnica permite el diagnóstico específico de la enfermedad de Whipple en fases tempranas o en casos dudosos.

OBJETIVOS

Estudio retrospectivo con PCR en muestras histológicas .
Valorar la posibilidad de un diagnóstico precoz.
Valorar la utilización como criterio de curación.
Comparar su utilidad con diversos fijadores tisulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos extraído ADN de biopsias fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. La PCR se realizó con dos “primers”: pW3FE y W4RB que amplifican un producto final de 154 bp de una porción interna del gen 16S. En 50µl de mezcla: 10mM Tris pH 8.5, 50mM KCl; 200 µm de dNTPs; 25 pm/µl de cada primer; 8mM de Cl_2Mg; 1.2 unidades de Taq polimerasa y 1 µl de cada ADN extraído.

RESULTADOS

Todos los casos positivos por estudio histológico resultaron positivos por PCR. En 10 estudios con histología negativa, la PCR fue positiva. La PCR persistió positiva tras tratamiento en 10 pacientes con biopsia postratamiento. No se consiguió extraer ADN de biopsias fijadas con mercuriales.

CONCLUSIONES

- La PCR es útil en el diagnóstico de la enfermedad de Whipple con una sensibilidad del 91%. Esta positividad persiste tras tratamiento de la enfermedad y “curación”, por lo tanto no es útil en el seguimiento.

- La extracción del ADN y su amplificación, no está influenciada por el tiempo de almacenamiento de la muestra.

- La fijación con mercuriales afecta a la extracción de ADN.

7 / 28

ESTUDIO MOLECULAR DEL CROMOSOMA Y EN DOS PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER

Costoya, S., García, S., Fernández, R. y Pásaro, E.
Departamento de Psicología. Área Psicobiología.
Universidade de A Coruña, Elviña s/n, 15071. E-mail: costoya@udc.es

La presencia de pequeños fragmentos cromosómicos, cuando derivan del cromosoma X y han perdido el centro de inactivación, está relacionada con la aparición de rasgos dismórficos y deficiencia mental, además de un fenotipo Turneriano. Pero cuando estos fragmentos derivan del cromosoma Y incrementan en las mujeres con síndrome de Turner o disgenesia gonadal, el riesgo de desarrollo de cáncer en gónadas.

En el presente trabajo se estudió mediante técnicas moleculares (FISH y PCR) a tres pacientes con síndrome de Turner y fenotipo femenino que presentaban en sus líneas celulares pequeños fragmentos cromosómicos de origen desconocido. En una de las pacientes se pudo definir el fragmento cromosómico como una anillo derivado del cromosoma X [ring(X)] y su frecuencia del 18%. Una segunda paciente presentó una cariotipo 45,X/46,X, psu dic(Y) (pter→q11.2::q11.2→pter) tanto en sangre como en gónadas, (59%/41%). La tercera paciente presentó en sangre un cariotipo 45,X/46,XY (96,5%/3,5%).

Mediante el estudio por PCR se verificó la presencia del centrómero del cromosoma Y y del gen SRY en ambas pacientes. La secuenciación de dicho producto nos permitió verificar que la secuencia nucleotídica de la región HMG-box coincidía en su totalidad con la de un varón control. Con el fin de comprobar los resultados obtenidos mediante secuenciación, se realizó un SSCP en el que se observó una migración normal de la cadena sencilla de ADN tras una digestión enzimática con las enzimas PvuII y Mae III.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10403B95 y 10605B98)

7 / 29

VARIABILIDAD CARIOTIPÍCA EN EL SÍNDROME DE TURNER

Costoya, S., García, S., Fernández, R. y Pásaro, E.
Departamento de Psicología. Área Psicobiología.
Universidade de A Coruña, Elviña s/n, 15071. E-mail: costoya@udc.es

Mediante la técnica de FISH (Hibridación *in* situ fluorescente) y las sondas alfa-centroméricas de los cromosomas X e Y, se estudió el origen de pequeños fragmentos cromosómicos en sangre y en gónadas, la existencia de mosaicismo críptico y la presencia de alteraciones a nivel centromérico en los derivados cromosómicos; la muestra estuvo constituída por un grupo de 15 pacientes con síndrome de Turner de edades comprendidas entre 1'8 y 38 años.

Mediante esta técnica se pudieron detectar líneas no fácilmente distinguibles mediante las técnicas de Citogenética Clásica debido a su bajo porcentaje, o bien debido a la naturaleza de la alteración estructural: cromosomas pseudodicéntricos para el brazo corto del cromosoma X [psu dic(X) (Xpter→Xq21::Xq21→Xpter)], cromosomas pseudodicéntricos para el brazo corto del cromosoma Y [psu dic(Y) (pter→q11.2::q11.2→pter)], cromosomas isodicéntricos para el brazo largo del cromosoma X [idic(Xq)], y cromosomas en anillo [ring(X)]. Estas líneas generalmente constituyeron parte de cariotipos complejos debido a su gran inestabilidad.

Nuestros datos corroboran, una vez mas, las hipótesis de Held y colaborarores (1992) que sugieren un origen mitótico y no meiótico del síndrome de Turner. Ello implica que todas las pacientes con este síndrome presentan en alguno de sus tejidos un segundo cromosoma sexual (X o Y) y que realmente el síndrome 45,X no existe.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10403B95 y 10605B98)

7 / 30

GENES CANDIDATOS PARA OSTEOPOROSIS: ESTUDIOS DE ASOCIACION EN MUJERES ESPAÑOLAS PERIMENOPAUSICAS

Garcia-Giralt, N.; Grinberg, D.; Enjuanes, A.; Nogués, X.; Mellibovsky, L.; Minguez, S.; Balcells, S.; Díez, A.
Departament de Genètica-Universitat de Barcelona,
Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques y Hospital del Mar de Barcelona

La osteoporosis afecta una de cada cuatro mujeres postmenopáusicas caucásicas. La densidad mineral ósea (DMO) y la arquitectura del hueso son los principales determinantes de esta patología y dependen tanto de factores ambientales como genéticos. Hasta un 75% de la variabilidad en DMO es atribuible a factores genéticos. Distintos grupos han propuesto y evaluado diversos genes candidatos con resultados controvertidos. El objetivo de este estudio es analizar la contribución de varios de estos genes a la DMO de 110 mujeres perimenopáusicas. La DMO fue valorada mediante un densitómetro hológico QDR 4500LL y las pacientes fueron clasificadas siguiendo los criterios de la OMS. Se valoraron varios polimorfismos ya descritos: gen del receptor de la vitamina D (BsmI y FokI), gen del receptor de estrógeno (PvuII, XbaI y microsatélite del promotor), gen A1 del colágeno de tipo I (sitio Sp1 del intrón 1) y gen de la fetuina (AHSG 1 y 2). y se utilizó el test de χ^2 para evaluar la posible asociación entre estos genes y la DMO, no encontrándose diferencias significativas. Seguidamente, se procedió a la búsqueda de nuevos polimorfismos en zonas reguladoras de estos genes. Para COL1A1, se identificaron dos nuevos polimorfismos situados a 1,7 y 2 kb a 5' del gen, en una región supuestamente implicada en la regulación del gen en osteoblastos. Estudios preliminares aportan indicios de asociación entre uno de estos polimorfismos y la DMO, que estan en curso de comprobación. Recientemente, hemos iniciado estudios funcionales de la región promotora que contiene dichos polimorfismos.

7 / 31

HOMOCISTEINA Y EL ALELO MTHFR 677 C->T EN PACIENTES ESPAÑOLES CON INFARTO PREMATURO

Grinberg, D.; Garcia-Giralt, N.; Ferrer, I.; Vilaseca, M.A.; Pintó, X.; Balcells, S.
Departament de Genètica-Universitat de Barcelona, Hospital de Sant Joan de Déu y Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge de Barcelona

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación del papel de la homocisteína y del alelo 677C->T del gen de la metilentetrahidrofolatoreductasa (MTHFR) como factores de riesgo para la enfermedad coronaria prematura. Se realizaron estudios casos-controles y familiares en una muestra de 76 pacientes varones (edad < 50), 95 controles y 89 hijos de pacientes. Se valoraron la homocisteína plasmática, sus determinantes nutricionales, el genotipo MTHFR 677C->T y factores convencionales de riesgo cardiovascular. La hiperhomocisteinemia moderada (mayor del 90 percentil de controles), presentada por 22,4% de los pacientes, resultó un predictor independiente de enfermedad coronaria prematura (riesgo relativo de 3,2). Los individuos homozigotos TT, tanto pacientes como controles, presentaron niveles de homocisteína significativamente mayores que los individuos con otros genotipos. Entre los pacientes TT, 64% presentaron hiperhomocisteinemia comparados con 23% de los controles TT, diferencia que no se puede atribuir al genotipo MTHFR 677TT. La hiperhomocisteinemia moderada tiene un fuerte componente hereditario dado que 36% de los hijos de pacientes (con cualquier genotipo) presentaron niveles de homocisteína por encima del 90 percentil, comparado con sólo el 6% de las esposas de los pacientes. Entre los hijos con genotipo TT, la proporción asciende al 83%. En conclusión, en esta población española, la hiperhomocisteinemia moderada está asociada al riesgo de enfermedad coronaria prematura y es más prevalente en hijos de pacientes que presentan esta condición. El genotipo MTHFR TT está asociado a la hiperhomocisteinemia pero deberán identificarse otros factores genéticos para una mejor comprensión de este trastorno metabólico.

7 / 32

UTILIZACIÓN DEL SISTEMA CRE/LOXP EN LA PRODUCCIÓN DE VIRUS ADENO-ASOCIADOS RECOMBINANTES

Novo, F.J., Zaratiegui, M.A., Narvaiza, I., Qian, C.
Departamento de Genética y Departamento de Medicina Interna.
Universidad de Navarra. Pamplona 31080. emailfnovo@unav.es

Métodos tradicionales de producción de virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) para transferencia génica utilizan como helper un adenovirus salvaje, que produce un título alto de adenovirus contaminantes en las preparaciones de rAAV. Para paliar este problema, hemos estudiado la utilización del sistema Cre/loxP, que se basa en una línea celular que expresa la recombinasa Cre (Cre8) y en un adenovirus en el que la señal de empaquetamiento está flanqueada por secuencias loxP (AdPsi5). Durante la producción de rAAV, las células son co-transfectadas con dos plásmidos (uno que contiene el gen de la luciferasa flanqueado por los ITR virales y otro plásmido helper que contiene los genes rep y cap del AAV) y sobreinfectadas con AdPsi5.

Para comprobar las ventajas de este sistema, hemos llevado a cabo producciones de rAAV tanto en células 293 (que no expresan recombinasa Cre) como en células Cre8, y hemos comparado los títulos de rAAV y la contaminación por AdPsi5. En teoría, la expresión de recombinasa Cre corta el genoma adenoviral por las secuencias loxP y escinde la señal de empaquetamiento, con lo que se frena la formación de viriones contaminantes. Los resultados obtenidos muestran que el título de rAAV obtenido por ambos métodos es similar (determinado por slot-blot) y que la contaminación por AdPsi5 (determinado por la dilución máxima que produce efecto citopático a los 8 días) es significativamente menor cuando se utilizan células Cre8, obteniéndose una disminución de 20 veces en el número de adenovirus contaminates por cada partícula de rAAV.

7 / 33

DETERMINACIÓN DE INDICES PROLIFERATIVOS Y CAPACIDAD ANTITUMORAL DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE *MYROXYLOM BALSAMUM*

Edreira, A.; Royo, J.L.; Ledesma, M.A.; Pinzón, R.*; Piñero, J.
Dpto. Biología Celular. Fac. Biología. Universidad de Sevilla. Ave. Reina Mercedes, s/n. 41012. Sevilla. *Dpto de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Se ha realizado un muestreo de ocho extractos vegetales (metanólicos y clorofórmicos) obtenidos a partir de diferentes partes (frutos, hojas, madera y corteza) de la planta *Myroxylom balsamum*, comúmmente conocida como Balsamo de Perú.

El objetivo de este trabajo fue determinar si los extractos de plantas, utilizadas en medicina natural en los paises latinoamericanos, presentan actividades antitumorales frente a tres líneas humanas tumorales (MCF-7, adenocarcinoma de mama; TK-10, adenocarcinoma renal; UACC-62, melanoma); para ello utilizamos el ensayo de la sulforodamina-B (SRB). Este ensayo se basa en la capacidad que tiene la SRB de unirse a proteinas básicas celulares y nos indica el nivel relativo de viavilidad y proliferación en células que han sido tratadas con el extracto vegetal. Tres parametros son medidos: **IG_{50}**, concentración de extracto que inhibe el 50% del crecimiento de la población celular; **TGI**, concentración de extracto que inhibe el 100% del crecimiento de la población celular (índice citostático); y **LC_{50}**, concentración de extracto que mata al 50% de la población celular (índice citotóxico).

Los extractos que mostraron índice proliferativos significativos se usaron para la determinación antitumoral referida a su capacidad de estabilizar los complejos de roturas establecidos por la topoisomerasa II con el ADN.

- Este trabajo forma parte de un Proyecto del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Subprograma X. Proyecto X-3 **7 / 33**

7 / 34

ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS HEREDITARIAS: CONSIDERACIONES PARA SU DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Beyer, K., Lao, J.I., Méndez, J., Pásaro, E.
Unidad de Genética y Diagnóstico Molecular. Area de Psicobiología.
Universidad de A Coruña. Campus Elviña s/n, E15071. A Coruña.
Tel. 981-167000 (1709). E-mail: gedimo@udc.es

Las ataxias espinocerebelosas constituyen un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas caracterizadas por ataxia, disartria, dismetría y debilidad muscular asociadas con espasticidad, atrofia óptica y demencia. En este grupo tenemos a las ataxias autosómico dominantes (ADCA): SCA1, SCA2, SCA3 o Enfermedad de Machado-Joseph y SCA6 (con expansión del trinucleótido **CAG)** y la SCA8 (con expansiones **CTG**) , y las de herencia autosómico recesiva, sólo representado por la ataxia de Friedreich (expansión del trinucleótido **GAA**). Estas son altamente polimórficas en el rango de controles sanos y en el de los enfermos. Respecto al tamaño de la expansión presente en los pacientes podemos establecer una correlación clínica, o sea, mientras mayor es la repetición de la secuencia de bases CAG, más temprano debuta la enfermedad y con mayor severidad suele comportarse el cuadro clínico (fenómeno conocido como anticipación).

Hoy resulta imprescindible disponer de métodos fidedignos que permitan establecer el diagnóstico diferencial entre ellas, pues de su identificación exacta dependerá el asesoramiento genético correcto, el establecimiento del pronóstico y de la evolución de la enfermedad. En este trabajo presentamos métodos de diagnóstico basados en la PCR con los primers adecuados para cada una de ellas seguido de la electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% para las ADCA y en gel de agarosa 1.5% para la Ataxia de Friedreich. El proceso culmina con el análisis de fragmentos para determinar el tamaño de la expansión en cada caso.

Financiación: Xunta de Galicia (XUGA10605B98)

7 / 35

FRAGILE SITES AND AUTISM: A STUDY IN A BASQUE SAMPLE

Arrieta Saez, I., Telez Sedano, M., Criado Alonso, B., Martinez Santiago, B., Peñagarikano Ahedo, O., Ortega Azpitarte, B., Flores Elices, P., Lostao Zuza, C..
Dpto. Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. Apdo. 644, 48080 Bilbao.

Lymphocyte cultures from peripheral blood were carried out in 27 autistic individuals and 27 age and sex matched control individuals (20 males and 7 females) to study the expression of chromosomal fragility both spontaneously and after the induction with certain break inducing agents (methotrexate and aphidicolin). We used a statistical method for the identification of fragile sites (FS) from pooled data. Cultures in R-1640 medium resulted in significant differences in the total number of chromosomal lesions (CL) and in the total number of aberrant cells between patients and control individuals ($p < 0.001$ autistic males vs. control males and $p < 0.05$ autistic females vs. control females), while no statistical differences were detected after exposure to methotrexate and aphidicolin. 57 bands were recognized as non-randomly expressed FS using the statistical method for pooled data. Of the 57 FS, 50 corresponded to common fragile sites (cFS) and 7 to rare fragile sites (rFS). As in the overall frequencies of CL, most FS presented a higher expression in autistic individuals than in control ones and in males than females. Further analysis revealed that three chromosomal bands (3p14.2, 6p23 and 16q23.2) could be considered as preferential cFS. Of the 27 autistic individuals, 5 were found to be rFS Xq27.3 positive (4 males and 1 females). All of them were confirmed by molecular techniques. Thus, the rate of incidence of X-fra mutation in the autistic sample supports their co-ocurrence.

7 / 36

ESTUDIO DE LAS ANEUPLOIDIAS DE LOS CROMOSOMAS 1, 7, 17 Y 18 EN CARCINOMAS DE COLON Y RECTO POR CITOGENETICA MOLECULAR

Arrieta Saez, I.[1], Fernandes, R.[2], Telez Sedano, M.[1], Mendez Martin, Jj.[3], Diaz Aguirregoitia, J.[3], Criado Alonso, B.[2,4,5].

[1]F. Ciencias. UPV. España, [2]IPATIMUP. Porto (Portugal), [3]F. Medicina. UPV. España, [4]Ins. Sup. Da Maia. Portugal, [5]Ins. Sup. Ciencias da Saúde. Portugal.

El estudio de las causas de la carcinogénesis colorectal ha supuesto un gran esfuerzo en los últimos años. Se cree que la etiología de estos tumores es muy compleja, con factores genéticos, ambientales y hormonales implicados en ella.
El estudio citogenético de los carcinomas colorectales juega un papel importante a la hora de determinar la frecuencia de aberraciones citogenéticas que no ocurren al azar, así como para dirigir la atención de los genéticos moleculares hacia todos los cromosomas o regiones cromosómicas que pudieran ser importantes en la carcinogénesis colorectal.

A pesar de la importancia de estos estudios citogenéticos, la metodología ha estado limitada por importantes problemas técnicos. Esta situación ha mejorado gracias a las recientes técnicas de citogenética molecular, incluyendo la hibridación genómica comparativa, que permiten no sólo realizar un cariotipo sino que también nos ofecen la posibilidad de realizar estudios retrospectivos.

En el presente trabajo utilizamos técnicas de FISH con sondas centroméricas para analizar la presencia de aneuploidías de los cromosomas 1, 7, 17 y 18 en 20 tumores de colon y recto de material de archivo y 10 mucosas normales utilizadas como controles.

Los resultados obtenidos indican diferentes niveles de aneuploidía para los cuatro cromosomas y una posible asociación entre la presencia de una anomalía numérica específica y la localización del tumor, lo que apoya la idea de que diferentes factores patogénicos son importantes en tumores de colon y recto. La posible utilización de mutaciones cromosómicas y/o submicroscópicas como marcadores genéticos es discutida.

7 / 37

DETERMINACIÓN DE MONOCLONALIDAD EN LINFOMAS B UTILIZANDO LA PCR

Filgueira Fernández, P.[1], Lema Costa, B.[1], Álvarez García, A.[2], Prada Puentes, C.[2], Arnal Monreal, F.[2]

[1]T.E.A.P. de la Unidad de Investigación. Hospital "Juan Canalejo". A Coruña.

[2]Servicio de Anatomía Patológica. Hospital "Juan Canalejo". A Coruña.

FUNDAMENTOS

La demostración de monoclonalidad en poblaciones linfoides es útil en la confirmación diagnostica de linfomas B. La utilización de la técnica de PCR está actualmente bien establecida, utilizándose generalmente cebadores consensuados en las regiones variables y de unión, en el gen encargado de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

MÉTODOS

Hemos estudiados un total de 40 linfomas B y 10 proliferaciones linfoides reactivas, en material previamente fijado en formol tamponado al 10% e incluido en parafina. En todos los casos se realizaron 2 PCR con cebadores comunes en la región de unión (LJH y VLJH), cambiando los cebadores en la región variable (Fr2A y Fr3A).

RESULTADOS

Con ambas técnicas se obtuvo una especificidad y un valor predictivo positivo del 100%. La sensibilidad fue del 90% con Fr2A y del 82% con Fr3A, aunque con Fr2A en un 20% de los casos no se extrajo ADN de suficiente calidad para la realización de esta técnica, cosa que no ocurrió con Fr3A. El valor predictivo negativo fue del 76% para Fr2A y del 58% con Fr3A.

CONCLUSIONES

Ambas técnicas de determinación de monoclonalidad de linfomas B tiene una buena sensibilidad, una especificidad y un valor predictivo positivo óptimos, con un valor predictivo negativo escaso. Si bien los resultados son ligeramente mejores con la técnica de Fr2A, ésta necesita un ADN mejor preservado, lo que puede constituir una limitación cuando se trabaja en material fijado en formol e incluido en parafina.

workshop genética de poblaciones y evolución

RELATING HORIZONTAL TRANSFER TO GENE FUNCTION

James A. Lake, Ravi Jain, R., and Maria C. Rivera, M.C.
Molecular Biology Institute and MCD Biology University of California,
Los Angeles, USA

Increasingly, studies of genes and genomes are indicating that considerable horizontal transfer has occurred between prokaryotes. The most extensive horizontal transfer has occurred for operational genes (those involved in housekeeping), whereas informational genes (those involved in transcription, translation, and related processes) are horizontally transferred infrequently. We tested two theories describing the temporal flow of horizontal transfer by the phylogenetic analysis of six complete prokaryotic genomes, and the identification of 314 sets of orthologous genes present in all six genomes. These results indicate that operational genes have been horizontally transferred continuously since the divergence of the prokaryotes, rather than having been exchanged in one, or a few, massive events that occurred early in the evolution of prokaryotes. In agreement with earlier studies, we find that differences in rates of evolution between operational and informational genes are minimal. This suggests that factors other than rate of evolution are responsible for the observed differences in horizontal transfer. It is proposed that a major factor in the more frequent horizontal transfer of operational genes is that informational genes are typically members of large, complex systems, whereas operational genes are not, thereby making horizontal transfer of informational gene products less probable (the Complexity Hypothesis).

CARTOGRAFÍA COMPARADA EN EL GÉNERO *DROSOPHILA*: PATRONES Y PROCESOS DE EVOLUCIÓN ENTRE EL GEN Y EL CROMOSOMA

Alfredo Ruiz Panadero
Dep. Genética y Microbiología, Univ. Autónoma de Barcelona

La comparación entre los genomas de distintas especies ha proporcionado clásicamente información valiosa sobre los patrones de cambio evolutivo. El desarrollo de diversas técnicas moleculares durante las ultimas décadas ha permitido la obtención de genotecas genómicas completas e información detallada sobre el genoma en diversas especies tipo. Se dispone ya de la secuencia nucleotídica completa de diversos procariotas y al menos dos eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans*) (1, 2) y se anuncia la obtención inminente de la de varios eucariotas más (la de *Drosophila melanogaster* dentro de este año y la de *Homo sapiens* quizás en dos o tres años) (3). Todos estos avances ha revolucionado la genómica comparada y han dado paso a una nueva era de los estudios evolutivos. Así como la comparación detallada de la estructura y secuencia nucleotídica de genes particulares permite estudiar las tasas de sustitución nucleotídica, la comparación detallada de los mapas físicos de regiones cromosómicas particulares o de cromosomas completos está proporcionando nuevos datos sobre los factores que afectan a la localización, orden y distancias entre los genes. Mas aún, los mapas físicos comparativos permiten la transferencia de información molecular desde las especies cuyo genoma está siendo completamente caracterizado hasta aquellas otras mucho menos estudiadas hasta ahora, facilitando con ello el estudio de los procesos evolutivos.

Durante más de 80 años, *Drosophila* ha sido un paradigma de los estudios de genómica comparada en eucariotas (4). Aunque es evidente que hoy día este tipo de estudios se puede llevar a cabo (y se están llevando a cabo) en grupos de organismos muy diversos, *Drosophila* sigue siendo un modelo de gran utilidad por diversas razones. Una de ellas es la posibilidad de disponer de genotecas completas de genes, cósmidos, fagos P1 y YAC, así como muy pronto de la secuencia nucleotídica completa, del genoma de *D. melanogaster*. Otra razón es la presencia en diversos tejidos de cromosomas gigantes que permiten obtener mapas cromosómicos y físicos con un grado de resolución varios ordenes de magnitud superior a los que se obtienen en otros eucariotas. Mediante la hibridación *in situ* de clones de DNA procedentes de *D. melanogaster* es posible determinar con precisión la localización en los cromosomas politénicos de otras especies de las secuencias homologas a aquellas contenidas en el clon. Esta técnica, combinada con otras técnicas moleculares, esta permitiendo, por primera vez, la comparación detallada de los genomas a distancias filogenéticas considerables (por ejemplo, entre subgéneros que divergieron hace 40-60 millones de años) y eventualmente proporcionará una visión unificada de la evolución de todo el género. Estudios cartográficos detallados se están llevando a cabo en las especies de los grupos *melanogaster* y *obscura*, pertenecientes al subgénero *Sophophora* (5) y en las de los grupos *repleta* y *virilis*, incluidas en el subgénero *Drosophila* (6, 7). De los trabajos llevados a cabo hasta el momento se

pueden extraer dos conclusiones significativas: (i) los elementos cromosómicos principales se han conservado a lo largo de la evolución del género pero (ii) han sufrido una extensa reorganización interna mediante la fijación de numerosas inversiones paracéntricas. Esto significa que podemos considerar los cromosomas de cualquier especie del género como un mosaico compuesto por fragmentos de los cromosomas de *D. melanogaster*. Podemos esperar además que cuanto más alejada de *D. melanogaster* se encuentre una especie más pequeños serán dichos fragmentos conservados. Este aspecto tiene una enorme importancia práctica a la hora de utilizar la información cartográfica de *D. melanogaster* para la clonación de regiones cromosómicas de otras especies.

El grupo *Drosophila repleta* comprende alrededor de un centenar de especies, la evolución cromosómica de muchas de las cuales se ha investigado mediante técnicas citológicas clásicas que han permitido elaborar una filogenia cromosómica bastante completa (7). Durante los últimos años, nuestro grupo ha realizado un considerable esfuerzo de cartografía en dos de las especies, *D. repleta* y *D. buzzatii*. El objetivo del proyecto es comparar su genoma entre sí y con el de *D. melanogaster*, y responder a preguntas como las siguientes. ¿A qué tasa se han fijado las reordenaciones cromosómicas en el genero *Drosophila*? ¿Varía la tasa evolutiva entre cromosomas (por ejemplo, cromosoma X *vs* autosomas)? ¿Y entre distintas regiones dentro de un cromosoma? ¿Qué factores evolutivos actúan sobre la localización, orden y distancias entre los genes? El proyecto pretende además obtener puntos de entrada en el genoma de *D. buzzatii* que permitan eventualmente la clonación de regiones cromosómicas de interés, como por ejemplo los puntos de rotura de las inversiones polimórficas presentes en esta especie. La clonación y secuenciación de los puntos de rotura de las inversiones naturales pueden proporcionar claves sobre los procesos que las originan, una cuestión aún sometida a debate. Aunque el proyecto no está aún terminado, se ha obtenido ya un caudal de información importante que permite contestar a algunas de las preguntas

La técnica cartográfica empleada ha sido en la mayoría de los casos la hibridación *in situ* de sondas de DNA marcadas con biotina (8), aunque también se ha usado la hibridación de fluorescencia (FISH). Los clones procedían generalmente de *D. melanogaster* y eran de distintos tipos: clones plasmídicos o fagos de tipo lambda que contenían genes que codifican proteínas, cósmidos y fagos P1. La tasa de éxito ha sido en los tres casos elevada, observándose generalmente señales de hibridación en los cromosomas politénicos tanto de *D. repleta* como de *D. buzzatii*. Los clones génicos se habían usado ya antes en hibridaciones a largas distancias (distintos subgéneros) pero nuestros datos demuestran por primera vez el enorme potencial que tienen los cósmidos y fagos P1 en los estudios de la evolución del genoma en el género *Drosophila*.

En este momento, la información más detallada de que disponemos corresponde al cromosoma 2 que es homólogo del brazo cromosómico 3R de *D. melanogaster* (elemento de Muller E). Se han cartografiado en este cromosoma 68 genes, 48 cósmidos y 49 fagos P1 (8-10). En *D. melanogaster*, el DNA del brazo 3R tiene

aproximadamente 24 Mb de longitud. Por tanto la densidad promedio de marcadores obtenida es de ~7 por Mb. Cuando se compara el orden de los marcadores entre el cromosoma 2 de *D. repleta* (o *D. buzzatii*) y el brazo 3R de *D. melanogaster* se observa una gran reorganización interna que alcanza hasta los marcadores más proximal (DS00385 en 82E) y más distal (DS00911 en 100E-F) (10). Utilizando un método de máxima verosimilitud original hemos estimado que el número de total de inversiones fijadas en este elemento cromosómico entre *D. melanogaster* y *D. repleta* (o *D. buzzatii*) es de alrededor de 130, lo que supone una tasa evolutiva muy alta (> 1 inversión fijada por millón de años) (8). Cuatro pequeñas regiones del brazo cromosómico 3R de *D. melanogaster* han sido estudiadas en detalle: 83E-84D (~1,1 Mb), 86A-E (~0,75 Mb), 95A-96A (~1,6 Mb) y 97B-E (~0,6 Mb). Los marcadores de estas regiones hibridan en 6, 6, 13 y 7 sitios distintos, respectivamente, del cromosoma 2 de *D. repleta* (o *D. buzzatii*) (9, 10). El número de interrupciones detectadas en un segmento cromosómico es una estima mínima del número de puntos de rotura que contiene. Por lo tanto estos resultados podrían sugerir una cierta variación entre regiones de un mismo cromosoma en el número de puntos de rotura fijados.

La información disponible sobre los restantes autosomas es mucho menor. En el cromosoma 3, homólogo del brazo cromosómico 2L de *D. melanogaster* (elemento de Muller B), se ha analizado en detalle la región 34C4-35D4 (~1,9 Mb) de *D. melanogaster* que rodea al locus *Adh*. Para ello se hibridaron utilizando FISH 24 fagos P1 que la cubren completamente (11). Esta región está representada en *D. repleta* (o *D. buzzatii*) en 6 sitios cromosómicos distintos, lo que indica la presencia de 5 puntos de rotura fijados. Este dato sugiere un menor dinamismo evolutivo del cromosoma 3 en comparación con el del cromosoma 2. En el cromosoma 4, homólogo del brazo cromosómico 3L de *D. melanogaster* (elemento de Muller D), se han cartografiado hasta el momento 15 genes y un fago P1 distribuidos por todo el cromosoma. Los resultados preliminares sugieren también una considerable reorganización sin que se haya podido estimar de momento el número de inversiones fijadas. Mención aparte merece el cromosoma X (elemento de Muller A). Diversas teorías predicen una tasa de fijación de reordenaciones cromosómicas superior en este cromosoma que en los autosomas. Con la finalidad de contrastar esta hipótesis se está elaborando un mapa físico del cromosoma X en *D. repleta* y *D. buzzatii*. Se dispone hasta el momento de 52 marcadores distribuidos uniformente a lo largo del cromosoma. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran de nuevo una extensa reorganización cromosómica pero no apoyan una mayor tasa de evolución de este cromosoma (al menos en comparación con el cromosoma 2).

Hemos iniciado la caracterización molecular de las inversiones polimórficas de D. buzzatii mediante la clonación y secuenciación de los dos puntos de rotura de la inversión cosmopolita *2j* (12) Este estudio ha sido posible gracias a la cercanía de su punto de rotura proximal en el cromosoma *2 standard* (*2st*) a los marcadores *Pp1-96A* y *Acr96Ac*. Los cromosomas *2j* son portadores en los puntos de inserciones relativamente grandes (0,4 y 4,4 kb) que no están presentes en los cromosomas *2st* y representan copias probablemente defectivas de un elemento transponible nuevo que

hemos denominado *Galileo*. Las secuencias de 7 bp que flanquean las inserciones pueden interpretarse como duplicaciones de las secuencias diana producidas en el momento de la inserción. Además la disposición intercambiada de dichas secuencias indica un evento de recombinación entre las dos inserciones que poseen segmentos homólogos situados en orientación invertida. Un análisis de la variabilidad nucleotídica existente en distintas líneas *2j* en los puntos de rotura indica que la inversión es monofilética. Así pues, nuestros resultados indican que la inversión surgió una única vez mediante un raro evento de recombinación ectópica entre las dos copias de *Galileo* situadas en diferentes posiciones de un cromosoma *2st*. Es la primera vez que se dilucida inequívocamente el origen de una inversión natural en *Drosophila*.

Referencias:

(1) Doolittle 1997. Nature 392: 339
(2) Wilson 1999. TIG 15: 51
(3) Dickson 1998. Nature 393: 296
(4) Hartl y Lozovskaya 1995. The Drosophila genome map. Springer
(5) Segarra, Lozovskaya, Ribó, Aguadé y Hartl. 1995. Chromosoma 104: 129
(6) Vieira, Vieira, Hartl y Lozovskaya 1997. Chromosoma 106: 99
(7) Ruiz, Ranz, Cáceres, Segarra, Navarro y Barbadilla. 1997. Braz. J. Genet. 20: 553
(8) Ranz, Segarra y Ruiz. 1997. Genetics 145: 281
(9) Ranz, Cáceres y Ruiz. 1999. Chromosoma 108: 32
(10) Ranz, Casals y Ruiz. En preparación
(11) Gonzalez, Betrán, Ashburner y Ruiz. Resultados no publicados
(12) Cáceres, Ranz, Barbadilla, Long y Ruiz. Enviado.

VARIACIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURA POBLACIONAL EN ESPECIES DEL GRUPO *OBSCURA* DE *DROSOPHILA*

Marta Pascual y Luís Serra
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

Cuando se estudia la variabilidad genética de especies sinmórficas, el primer paso es su correcta diferenciación. Los cromosomas, aloenzimas y patrones de restricción del mtDNA se han utilizado tradicionalmente con este fin pero presentan el inconveniente de que el material usado ha de ser vivo o en algunos casos congelado. La amplificación por PCR ha subsanado este problema ya que el material de estudio puede estar conservado en alcohol, lo que simplifica mucho el muestreo y su posterior conservación y utilización.

A finales de la década de los 70 *D. subobscura*, especie hasta entonces restringida a la región paleártica, colonizó la costa oeste de Norteamérica y en poco tiempo invadió áreas habitadas por otras especies endémicas del mismo grupo (Prevosti et al. 1988). Estas especies se agrupan en dos subgrupos: *D. pseudoobscura, D .persimilis* y *D. miranda*, son especies gemelas del subgrupo *pseudoobscura* , y *D. azteca* y *D athabasca* son especies gemelas del subgrupo *affinis* (Beckenbach et al. 1993). Dichas especies son difíciles de distinguir morfológicamente; los machos de estos dos subgrupos pueden distinguirse por el número de puas en los peines tarsales, pero su clasificación a nivel de especie así como la clasificación de las hembras requiere el uso de otras técnicas. Para poder estudiar la variabilidad de estas 5 especies neárticas del grupo *obscura*, y estimar la dinámica de las poblaciones de estas especies en relación a la especie invasora, hemos buscado marcadores fáciles de utilizar que permitan diagnosticar sin lugar a duda los diferentes individuos de estas especies y al mismo tiempo presenten un nivel elevado de variabilidad. Los RAPDs han demostrado ser buenos marcadores para la diferenciación de dichas especies (Pascual et al. 1997a, 1997b, 1999) ya que hemos encontrado de 2 a 7 primers por especie que producen bandas diagnóstico. Las bandas que se seleccionan como diagnóstico son bandas robustas cuyos tamaños oscilan entre 350bp y 1300bp, que se amplifican en todos los individuos de una misma especie, independientemente de su origen, y cuya repetibilidad es absoluta. Por término medio se han contabilizado 14 bandas por primer con tamaños que oscilan entre 180bp y 1920bp. Excluyendo aquellas bandas que sólo han aparecido en un indivíduo, el 99% de las bandas amplificadas son polimórficas. Al comparar los dos subgrupos por separado mediante el análisis molecular de la variancia (AMOVA) se obtiene mucha variabilidad interespecífica y sobretodo intraespecífica, y poca variación entre poblaciones. Muchas diferencias se han obtenido en función del primer utilizado, así el porcentaje de la variancia total explicado por la variabilidad interespecífica oscila entre 21.87% y 68.14%; el correspondiente a la variabilidad intraespecífica oscila entre 33.15% y 73.9% y el atribuíble a la diferenciación poblacional entre 5.26% y 35.54%. Para poder analizar variabilidad intra e interespecífica las amplificaciones se tienen que repetir como mínimo por duplicado para asegurar que los resultados son fiables, lo que dificulta el análisis.

Los microsatélites presentan la ventaja de la amplificación y a la vez por su especificidad no hay problemas de repetibilidad, aunque el trabajo previo de aislamiento, en especies con pocas secuencias conocidas, es laborioso ya que sólo se puede analizar la variación alélica por PCR si la secuencia que flanquea la repetición es conocida. En algunos casos la secuencia de DNA que flanquea el microsatélite está muy conservada lo que permite su amplificación en otras especies (Rico et al. 1996). Por ser marcadores muy variables son excelentes herramientas para estudiar la variación genética entre poblaciones de una misma especie e inferir la historia demográfica de las mismas (Schlötterer et al. 1997, Irvin et al. 1998). A partir de una genoteca parcial de *D.subobscura* hemos aislado 78 clones con repeticiones (AC)n y (AG)n. El tamaño promedio del DNA de *D.subobscura* insertado es de 525bp y un 22% de los clones presentaban dos o tres microsatélites con 5 o más repeticiones. Se han aislado un total de 99 loci con repeticiones de dinucleótidos (70% (AC)n y 30% (AG)n), aunque también se han observado 8 loci con repeticiones de trinucleótidos (3 (GCA)n, 2 (GTT)n, 1 (GCC)n, 1 (GCT)n y 1 (CTG)n) y 4 loci con repeticiones de tetranucleótidos((GCCT)n, (ATTT)n, (AAGG)n y (GGCA)n). En todos los drosofílidos analizados hasta la actualidad hay más loci con repeticiones (AC)n aunque la frecuencia varia de una especie a otra. El número de repeticiones perfectas de los microsatélites aislados de *Drosophila subobscura* oscila entre 4 y 36, con un promedio de 14.77, superior al observado por otros autores en otras especies de *Drosophila*, aunque inferior al detectado en la mayoría de peces y mamíferos (Hutter et al. 1998, revisión en Schug et al.1998). Para estudiar la variabilidad de estos marcadores se han utilizado 20 individuos de la población de Barcelona que han sido analizados con 20 loci. El número de alelos por locus varia entre 4 y 16, y el número de repeticiones del alelo mas frecuente oscila entre 7 y 23 con un promedio de 12.5. La heterocigosis esperada oscila entre 0.528 y 0.949 con un promedio de 0.776, y la variancia en el número de repeticiones oscila entre 0.225 y 31.554 con un promedio de 11.469. En *D.subobscura* hemos observado correlación significativa entre el número de repeticiones perfectas del alelo más frecuente en los 20 loci de la población estudiada y la heterocigosis ($Tau=0.35$, $p<0.05$), y la variancia en el número de repeticiones ($Tau=0.43$, $p<0.005$). En la actualidad estamos analizando la variabilidad de 10 de estos microsatélites en poblaciones europeas y colonizadoras de Norteamérica.

REFERENCIAS

Beckenbach AT, Wei YW, and Liu H, 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. Mol Biol Evol 10:619-634.

Hutter CM, Schug MD, and Aquadro CFA, 1998. Microsatellite variation in *D.melanogaster* and *D.simulans*: A reciprocal test of the ascertainment bias hypothesis. Mol Biol Evol 15(2):1620-1636.

Irvin SD, Wetterstrand KA, Hutter CM, and Aquadro CF, 1998. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *D.simulans*: Evidence for founder effects in New World populations. Genetics 150:777-790.

Pascual M, Balanyà J, Latorre A, and Serra L, 1997a. Diagnosis of sibling species of *Drosophila* involved in the colonization of North America by *Drosophila subobscura*. Mol Ecol 6:293-296.

Pascual M, Balanyà J, Latorre A, and Serra L, 1997b. Analysis of the variability of *Drosophila azteca* and *Drosophila athabasca* populations revealed by random amplified polymorphic DNA. J Zool Syst Evol Res 35:159-164.

Pascual M, and Serra L, 1999. RAPD diagnosis of the obscura group species sympatric with *D.subobscura* in North America J. Heredity (enviado)

Prevosti A, Ribó G, Serra L, Aguadé M, Balañà J, Monclús M and Mestres F, 1988. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5597-5600.

Rico C, Rico I, and Hewitt G, 1996. 470 milion years of conservation of microsatellite loci among fish species. Proc R Soc Lond B Biol Sci 263:549-557.

Schlötterer C, Vogl C, and Tautz D, 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *D.melanogaster* populations. Genetics 146:309-320.

Schug MD, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Lim RH, Hutter CM, and Aquadro CFA, 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *D.melanogaster*. Mol Ecol 7:57-70.

EL ESPACIADOR INTERGÉNICO DEL DNA RIBOSOMAL: ALGO MÁS QUE UN SIMPLE ESPACIADOR

Polanco de la Puente, Carlos
Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León,
24071 LEÓN

El DNA ribosomal (rDNA) típico de un genoma nuclear eucariótico consiste en varios cientos de copias en tándem de la unidad de transcripción separadas por una región espaciadora no codificante. El número de copias de la unidad de transcripción puede de ser de tan sólo una, como en *Tetrahymena*, o de varios miles como ocurre en ciertas especies vegetales. La región no codificante se denominó inicialmente espaciador no transcrito o NTS, aunque de forma inapropiada, ya que posteriormente se comprobó que puede ser transcrito parcial o incluso totalmente, por lo que en la actualidad se emplea el término de espaciador intergénico o IGS. Pero lejos de ser una mera secuencia espaciadora sin función, esta región está involucrada en la regulación de la transcripción de los RNA ribosomales, presenta orígenes de replicación y participa en otras funciones como el apareamiento cromosómico en *Drosophila*. Por otro lado, su estructura interna y polimorfismo hacen de este espaciador un marcador de alto interés en estudios de variabilidad genética, así como para el análisis evolutivo de familias multigénicas y estudios filogenéticos. Por todo ello son numerosos los trabajos que se han publicado referentes al análisis y función del espaciador IGS de eucariotas (ver revisiones de Hemleben y Zentgraf, 1994, Hillis y Dixon, 1991; Rogers y Bendich, 1987).

Una característica general de los IGS es su organización compleja en elementos repetidos. Distintas regiones del IGS pueden verse afectadas por procesos de amplificación y aparecer como un elemento repetido dentro del espaciador. Incluso parte de las regiones codificantes para los genes ribosomales pueden ser amplificadas. Los principales mecanismos responsables de la amplificación de secuencias y de los cambios en su número son los sobrecruzamientos desiguales durante procesos de recombinación. Esta variación en número de los elementos repetidos dentro de los IGS provocan heterogeneidad en el tamaño de los IGS y, debido a las múltiples copias presentes por genoma, se abre la posibilidad de polimorfismo intraindividual, como se ha observado tanto en animales como plantas, permitiendo la realización de análisis poblacionales de variabilidad genética.

El inicio y el fin de la transcripción del precursor primario de los RNA ribosomales tiene lugar en el IGS, encontrándose motivos con alta homología entre especies en las zonas involucradas. También se ha comprobado que los elementos repetidos localizados tanto delante como detrás del punto de inicio de la transcripción pueden actuar estimulando el proceso de inicio de la transcripción. Ello ha llevado a la realización de estudios que tratan de establecer relaciones entre el número de elementos repetidos y características derivadas de una mayor tasa de transcripción, con fines, por ejemplo en especies cultivadas, de mejora genética de caracteres agronómicos (Polanco y Pérez de la Vega, 1997; Kaufman *et al*. 1996).

La fácil disponibilidad de sondas para los genes del rDNA ha impulsado los estudios de variación y diferenciación poblacional que estudian estas regiones. Igualmente, se han obtenido, alineado y comparado secuencias del rDNA en un alto número de organismos, obteniéndose gran cantidad de información filogenética. Una dificultad potencial para interpretar los marcadores genéticos obtenidos a partir de familias multigénicas como el rDNA, consiste en conocer hasta que grado los mecanismos responsables del patrón de evolución concertada que muestran han homogeneizado las unidades de repetición. Las unidades de repetición del rDNA, al igual que las de otras familias multigénicas, presentan un mayor grado de homología de secuencia del que se esperaría si estuvieran evolucionando independientemente. Este fenómeno, denominado evolución concertada, sugiere la existencia de mecanismos capaces de homogeneizar las distintas copias, tanto si están localizadas en un mismo cromosoma o en distintos cromosomas. Para entender la dinámica evolutiva de las familias multigénicas es necesario conocer estos mecanismos, así como sus lugares de actuación, frecuencia y alteraciones (Dover *et al*., 1993).

El rDNA de *Drosophila* es un excelente sistema para estudiar la evolución de una familia multigénica situada en diferentes cromosomas al consistir en unas 250 copias localizadas en los organizadores nucleolares de los cromosomas *X* e *Y*. Así, se han realizado varios estudios de procesos de homogeneización analizando la distribución en cromosomas y poblaciones de variantes del espaciador IGS. Los estudios iniciales de distribución de variantes IGS compartidas por los cromosomas *X* e *Y*, así como observaciones directas de intercambios desiguales entre dichos cromosomas, mostraron que los procesos de intercambios intercromosómicos participaban en la homogeneización de la familia multigénica y que ésta seguía un modelo de linajes cromosómicos múltiples . Sin embargo, resultados mas recientes, obtenidos empleando los espaciadores transcritos ITS que también forman parte de la unidad de repetición del rDNA, indicaban una rápida homogeneización del rDNA dentro de linajes cromosómicos separados. Este modelo daría una explicación a cómo la selección puede operar en el rDNA, al ser la familia multigénica homogeneizada, y no las unidades individuales, quien está bajo la presión selectiva (Schlötterer y Tautz, 1994).

Analizando ambos espaciadores IGS e ITS en los mismos individuos de distintas poblaciones se ha comprobado que la homogeneización de la región ITS no está acoplada a la homogeneización de la región IGS y que, al contrario que para la región ITS, las variantes de IGS no están restringidas a linajes cromosómicos específicos. Por lo tanto, aparentemente dos modelos evolutivos opuestos tienen lugar dentro de la misma unidad de repetición del rDNA de *Drosophila*, algo que no puede explicarse por los mecanismos de conversión génica y de sobrecruzamientos desiguales, responsables principales del patrón de evolución concertada, ya que afectarían a la unidad de repetición en conjunto en uno (modelo de linajes separados) u otro (modelo de linajes múltiples) sentido (Polanco *et al.* 1998).

El descubrimiento de que el sitio de apareamiento entre los cromosomas *X* e *Y* de *Drosophila* se encuentra en las regiones IGS y que depende de la presencia de

secuencias de reconocimiento para la topoisomerasa I y promotores activos (McKee 1998; McKee, 1992) abre la posibilidad de intercambios de fragmentos restringidos a la región IGS durante el apareamiento cromosómico que pueden explicar la distribución compartida entre cromosomas *X* e *Y* de variantes de IGS, mientras que el resto de la unidad de repetición del rDNA evoluciona en linajes cromosómicos separados. Los resultados obtenidos del análisis detallado de la estructura interna de un elevado número de variantes IGS y su distribución cromosómica apoyan el modelo de intercambios y localizan las regiones involucradas (Polanco *et al*., en preparación).

En las regiones IGS también se han localizado secuencias ARS *(autonomous replicating sequences*), implicadas en la replicación del rDNA, tanto en especies vegetales como en animales (Hernández et al. 1993). Además, en *Drosophila* y en el gusano de la seda se ha encontrado una correlación topológica entre ARSs y secuencias SAR (*scaffold-attached regions*), también localizadas en los espaciadores IGS (Brun *et al*. 1993). Así pues, la región espaciadora intergénica del DNA ribosomal es multifuncional y participa en distintos niveles de organización y expresión genómica. Quizá otras funciones queden aún por ser descubiertas.

Referencias

Brun, C., P. Surdej y R. Miassod, 1993. Relationship between scaffold-attached regions, sequences replicating autonomously in yeast, and a chromosomal replication origin in the Drosophila rDNA. *Experimental Cell Research* **208**: 104-114.

Dover, G.A., A.R. Linares, T. Bowen y J.M. Hancock, 1993. The detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods in Enzymology* **224**: 525-541.

Hemleben, V. y U. Zentgraf, 1994. Structural organization and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal RNA genes. *Results and Problems in Cell Differentiation* **20**: 3-24.

Hernández, P., L. Martín Parras, M.L. Martínez Robles y J.B. Schvartzman, 1993. Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal-RNA genes. *EMBO Journal* **12**: 1475-1485.

Hillis, D.M. y M.T. Dixon, 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**:411-453.

Kaufman B, T.R. Rocheford, R.J. Lambert Y A.R. Hallauer, 1996. Change in ribosomal DNA spacer-length composition in maize recurrent selection populations. 2. Analysis of BS10, BS11, RBS10, and RSSSC. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 680-687.

McKee, B. D., 1998 Pairing sites and the role of chromosome pairing in meiosis and spermatogenesis in male Drosophila. *Current. Topics in Developmental Biology* **37**: 77-115. .

McKee, B. D., L. Habera y J. A. Vrana, 1992 Evidence that intergenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as *X-Y* pairing sites in male meiosis, and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* **132:** 529-544. .

Polanco, C. y M. Pérez de la Vega, 1997. Intergenic ribosomal spacer variability in hexaploid oat cultivars and landraces. *Heredity* **78**: 115-123.

Polanco, C., A.I. González, A. de la Fuente y G.A. Dover, 1998. Multigene family of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics* **149**: 243-256.

Rogers, S.O. y A.J. Bendich, 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* **9**: 509-520.

Schlötterer, C.M. y D. Tautz, 1994. Chromosomal homogeneity of Drosophila ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exhanges drives concerted evolution. *Current Biology* **4**: 777-783.

¿ES EL GENOMA MITOCONDRIAL DE DROSOPHILA UN MARCADOR MOLECULAR NEUTRAL?

Eladio Barrio, Ana González, Amparo Latorre y Andrés Moya
Instituto "Cavanilles" de Biodiversidad y Biología Evolutiva y Departamento de Genética, Universidad de Valencia. Apdo. de Correos 22085. 46071 Valencia.

El genoma mitocondrial es un marcador genético ampliamente utilizado en estudios evolutivos dadas sus especiales características, tales como herencia materna, ausencia de recombinación y rápida tasa de evolución. La mayoría de estos estudios asumen que esta molécula sigue un modelo neutral de evolución, lo que permite datar el tiempo de divergencia de las especies, los sucesos en sus historias evolutivas tales como los cuellos de botella, o reconstruir filogenias a partir de datos de restricción o de secuencias. Sin embargo, diversos estudios han descrito comportamientos no neutrales de variantes mitocondriales en poblaciones experimentales de Drosophila (Fos et al., 1990; García-Martínez et al., 1998). En estos trabajos se observó que el polimorfismo mitocondrial puede estar afectado por las interacciones con polimorfismos nucleares, la deriva génica y procesos de selección. También, estudios basados en análisis filogenéticos y estadísticos de secuencias del genoma mitocondrial, en los que se demuestra una heterogeneidad de las tasas de sustitución nucleotídica entre linajes de distintas especies o poblaciones de una misma especie, y el relativo exceso de polimorfismo no sinónimo intraespecífico, indican una clara desviación del modelo neutral tanto en el DNA mitocondrial de Drosophila (Kaneko et al., 1993; Ballard and Kreitman, 1994; Rand et al., 1994), como en el de ratón (Nachman et al., 1994) o en el de chimpancé y de humanos (Nachman et al., 1996).

Después de más de 10 años de estudio del genoma mitocondrial D. subobscura mediante el análisis de restricción (Latorre et al., 1986 y 1992; Afonso et al., 1990; González et al., 1994; García-Martínez et al., 1998), se ha constatado la prevalencia de 2 haplotipos ampliamente distribuidos en Europa, Norte de Africa, Oriente Medio y en las poblaciones colonizadoras del Nuevo Mundo, además de la aparición esporádica de haplotipos endémicos derivados de los haplotipos I o II, que se encuentran en baja frecuencia. La excepción a este patrón de distribución de haplotipos se presenta en Canarias, donde los haplotipos I y II, aunque presentes, son minoritarios respecto a haplotipos endémicos de estas islas (Afonso et al., 1990). Entre los haplotipos canarios, el más frecuente es el VIII, según la nomenclatura Latorre et al. (1986 y 1992), que equivale al haplotipo 2 de Afonso et al. (1990). Los demás son haplotipos raros derivados del VIII.

Las causas evolutivas que puedan explicar esta distribución particular de haplotipos mitocondriales en D. subobscura todavía nos son desconocidas, aunque de los trabajos de Fos et al. (1990) y García-Martínez et al. (1998) con poblaciones experimentales se deduce que la evolución del genoma mitocondrial de esta especie pueda estar mediada por selección y/o la interacción entre los genomas nuclear y mitocondrial. Conclusiones similares se obtuvieron con poblaciones experimentales de las especies relacionadas D. pseudoobscura y D. persimilis (MacRae and

Anderson, 1988 y 1990; Jenkins et al., 1996; Hutter and Rand, 1995), pero no con D. melanogaster (Kilpatrick and Rand, 1995).

La otra aproximación al estudio de la evolución del genoma mitocondrial proviene del análisis del polimorfismo nucleotídico de su secuencia. Como se ha señalado, este tipo de estudios en D. melanogaster demostraron que la evolución del genoma mitocondrial no se ajustaba a las predicciones del modelo neutral, que se interpretaron como debidas a la acumulación de gran cantidad de mutaciones ligeramente deletéreas (Kaneko et al., 1993; Ballard and Kreitman, 1994; Rand et al., 1994).

Para contrastar la hipótesis de evolución no neutral del DNA mitocondrial de Drosophila subobscura que se deduce de los trabajos basados en el estudio de eficacias de haplotipos mitocondriales en poblaciones experimentales, se han analizado las secuencias nucleotídicas correspondientes a unos 1000 pb del gen que codifica la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa de 48 líneas isogénicas de 3 poblaciones naturales de D. subobscura: La Cañada (Valencia), Esporles (Mallorca) y Menorca. Este trabajo se ha complementado con un análisis más detallado de los datos de polimorfismo de restricción de poblaciones naturales de D. subobscura recopilados a lo largo de una década de estudio (Latorre et al., 1986 y 1992; Afonso et al., 1990; González et al., 1994; García-Martínez et al., 1998).

Las secuencias obtenidas se han analizado tanto desde una aproximación filogenética (tasas de evolución, distribución de mutaciones, determinación de modelos evolutivos por análisis filogenético máximo-verosímil, etc.), como estadística (pruebas de Tajima, de Fu y Li, de MacDonald-Kreitman, etc.) para contrastar los modelos de evolución. Los resultados obtenidos se discuten con los que se obtuvieron del nuevo análisis de los datos disponibles de restricción y con los resultados de trabajos previos realizados con poblaciones experimentales. Además se comparan con las evidencias derivadas del estudio de la evolución del genoma mitocondrial de otros organismos.

Referencias

Afonso, J.M., A. Volz, M. Hernández, H. Ruttkay, A.M. González, J.M. Larruga, V. Cabrera and D. Sperlich. 1990. Mitochondrial NA variation and genetic structure in Old-World populations of Drosophila subobscura. Mol. Biol. Evol. 7:123-142.

Ballard, J.W.O., and M. Kreitman. 1994. Unraveling selection in the mitochondrial genome of Drosophila. Genetics 138:757-772.

Fos, M., M.A. Domínguez, A. Latorre and A. Moya. 1990. Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of Drosophila subobscura. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4198-4201.

García-Martínez, J., J.A. Castro, M. Ramón, A. Latorre and A. Moya. 1998. Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of Drosophila subobscura. Genetics 149:1377-1382.

González, A., R. Carrió, V. Fernández-Pedrosa and A. Moya. 1994 Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA of a Drosophila subobscura population. J. Evol. Biol. 7:29-38.

Hutter, C.M. and D.M. Rand. 1995. Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: Drosophila pseudoobscura vs. D. persimilis. Genetics 140:537-548.

Jenkins, T.M., C.S. Babcock, D.M. Geiser and W.W. Anderson. 1996. Cytoplasmic incompatibility and mating preference in Colombian Drosophila pseudoobscura. Genetics 142:189-194.

Kaneko, M., Y. Satta, E.T. Matsura and and S. Chigusa. 1993. Evolution of the mitochondrial ATPase 6 gene in D. melanogaster. Genet. Res. 61:195-204.

Kilpatrick, S.T. and D.M. Rand. 1995. Conditional hitchhiking of mitochondrial DNA: frequency shifts of Drosophila melanogaster mtDNA variants depend on nuclear genetic background. Genetics 141:1113-1124.

Latorre, A., A. Moya and F.J. Ayala. 1986. Evolution of mitochondrial DNA in D. subobscura. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8649-8653.

Latorre, A., C. Hernández, D. Martínez, J.A. Castro, M. Ramón and A. Moya. 1992. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of Drosophila subobscura. Heredity 68:15-24.

MacRae, A.F. and W.W. Anderson. 1988. Evidence of non-neutrality of mitochondrial DNA haplotypes in Drosophila pseudoobscura. Genetics 120:485-494.

MacRae, A.F. and W.W. Anderson. 1990. Can mating preferences explain changes in mtDNA haplotype frequencies?. Genetics 124:999-1001.

Nachman, N.W., S.N. Boyer and C.F. Aquadro. 1994. Nonneutral evolution at the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6364-6368.

Nachman, N.W., W.M. Brown, M. Stoneking and C.F. Aquadro. 1996. Nonneutral mitochondrial DNA variation in Human and Chimpanzees. Genetics 142:6364-6368.

Rand, D.M., M. Dorfsman and L.M. Kann. 1994. Neutral and nonneutral evolution of Drosophila mitochondrial DNA. Genetics 138:741-756.

8 / 01

HEREDABILIDADES PARA CARACTERES MERÍSTICOS EN UNA POBLACIÓN NATURAL DE *GASTEROSTEUS ACULEATUS*

Hermida Prieto, M., Fernández López C., Amaro González R., San Miguel Salán E.
Departamento de Bioloxía Fundamental. Área de Xenética. Universidade de Santiago de Compostela. Facultade de Veterinaria, Campus de Lugo. 27002 Lugo.

El espinoso (*G. aculeatus*) es un pez de la familia Gasterosteidae ampliamente utilizado en estudios de selección natural, bajo el supuesto de que los caracteres analizados (sobre todo el número de placas óseas laterales) presentan una importante varianza genética. No obstante, hay muy pocas estimaciones sobre la variabilidad genética cuantitativa en esta especie. Treinta y tres parejas sexualmente maduras fueron capturadas en el río Asma (Chantada, Lugo) y cruzadas en el laboratorio hasta obtener 33 familias de hermanos completos. Las familias se mantuvieron en acuarios independientes en condiciones homogéneas de luz y temperatura y cada individuo fue analizado cuando alcanzó al menos 2.5 cm de longitud estándar. Se calcularon las heredabilidades para 7 caracteres merísticos (unilaterales y bilaterales) mediante tres métodos : estimaciones en condiciones de laboratorio (por correlación intraclase); a través de ambientes (por regresión de la progenie sobre un progenitor o el progenitor medio) y mínima en la naturaleza (de acuerdo con Riska *et al.*, 1989 (1), suponiendo que vale 1 la correlación genética entre ambientes). En términos generales, las heredabilidades en laboratorio resultaron mayores, y significativas, que en la naturaleza.

La heredabilidad para la asimetría fluctuante también fue computada por el método de regresión para 6 rasgos merísticos y dos morfométricos, y por los de regresión y de carácter umbral sólo para los rasgos merísticos. Ambos procedimientos proporcionaron resultados parecidos y generalmente no significativos.

(1) Riska *et al.*, (1989). Genetics 123: 865-871.

8 / 02

EVOLUCIÓN DE LOS GENES DE LA VITELINA EN LA FAMILIA ACRIDIDAE

Garma C. y Henriques-Gil N.
Unidad de Genética, Universidad San Pablo
URB. MONTEPRÍNCIPE, BOADILLA DEL MONTEPRÍNCIPE, 28668 MADRID

Los genes de la vitelina en ortópteros pertencen a una superfamilia de genes que ha divergido un ancestro común, que dió lugar a los actuales genes de esta proteína en vertebrados, nematodos e insectos. En *Locusta migratoria* la vitelina está codificada por dos genes, *VgA* (12 kb) y *VgB* (10,5 kb), que se encuentran situados en el cromosoma X, y que producen un RNA mensajero de 6,5 kb. Mediante el diseño de cebadores específicos de la vitelina, a partir de sondas de cada uno de los genes, realizamos amplificaciones por PCR en nueve especies de la familia Acrididae. Los fragmentos obtenidos con cada pareja de cebadores fueron secuenciados y comparados entre las distintas especies.

Se observan marcadas diferencias entre las secuencias de nucleótidos, incluso entre especies del mismo género: los dendrogramas obtenidos por comparación de estas secuencias no se corresponden con el árbol filogenético de las especies estudiadas. Los datos indican que la difersificación en subfamilias y géneros debió suceder a partir de un grupo muy polimórfico.

8 / 03

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA VITELINA EN LA SUPERFAMILIA ACRIDOIDEA (Orthoptera)

Garma C. y Henriques-Gil N.
Unidad de Genética, Universidad San Pablo
URB. MONTEPRÍNCIPE, BOADILLA DEL MONTEPRÍNCIPE, 28668 MADRID

La vitelina es la proteína mayoritaria de los huevos de animales ovíparos. En ortópteros se sintetiza en el cuerpo graso y es transportada a través de la hemolinfa hasta los ovocitos.

Se ha analizado la vitelina de 23 especies pertenecientes a tres familias de Acridoidea, mediante técnicas de electroforesis. Se observa que la vitelina en todos los casos está formada por distintos polipéptidos cuyo número varía entre tres y ocho, siendo seis en la mayoría de las especies. Estos polipéptidos se encuadran en dos grupos, H y L, en función de su peso molecular. Además, en la mayoría de las especies los polipéptidos de la vitelina presentan uno o varios enlaces disulfuro intracatenarios. Existe variabilidad intraespecífica para los polipéptidos de la vitelina en dos de las especies, *Eyprepocnemis plorans* y *Chorthippus parallelus*.

El conjunto de polipéptidos de la vitelina es único en cada especie, por lo que resultan fácilmente identificables a través de su patrón electroforético; por ello, resulta ser un carácter de gran utilidad taxonómica. Además, la composición de la vitelina parece estar sometida a una serie de restricciones que posiblemente respondan a una causa fisiológica. Los patrones son más parecidos entre especies del mismo genero e incluso dentro de la misma subfamilia, pero a mayores niveles resulta imposible establecer equivalencias.

8 / 04

EXTRACCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS DE *URSUS SPELAEUS* ROS.-HEIN., ÚRSIDO EXTINTO EMBLEMÁTICO DEL PLEISTOCENO EUROPEO

Vila Taboada, M.; López González, F. & Grandal d'Anglade, A.
Instituto Universitario de Xeoloxía "*Isidro Parga Pondal*". Facultade de Ciencias s/n. Universidade da Coruña. 15071. A Coruña. (xemarta@mail2.udc.es)

La extracción de biomoléculas en materiales fósiles y subfósiles ha mejorado considerablemente su metodología durante los años 90, siendo la secuenciación de ADN extraído a partir de huesos, dientes, tejidos momificados ... una realidad que proporciona información básica tanto a nivel forense como poblacional y específico.

Este trabajo presenta los primeros resultados de extracción, amplificación y secuenciación de material genético a partir de restos óseos de *Ursus spelaeus* ROSENMÜLLER-HEINROTH (Mammalia, Carnivora, Ursidae) de la Península Ibérica, recuperados en el yacimiento de Liñares (Galicia).

Conjugando las técnicas paleontológicas con las propias de biología molecular pretendemos sacar un mayor partido de la información proporcionada por los restos fósiles. Refiriéndonos al comportamiento *post mortem* del ADN, señalaremos que el extraído a partir de restos antiguos es fundamentalmente de tipo mitocondrial.

Presentamos pues, una secuencia de 140 pb perteneciente a la región control (D-loop) del ADNmt del oso cavernario cuya extracción, amplificación - con *primers* específicos del género *Ursus* - y secuenciación se realizó de modo duplicado en dos laboratorios especializados en ADN antiguo (Université Claude-Bernard, Université Joseph-Fourier). Asimismo se compara esta región recuperada con la única publicada anteriormente de esta especie y con su hómologa en otros úrsidos actuales.

Los fósiles empleados fueron excavados en una campaña programada para tal fin, empleándose las condiciones de máxima asepsia recomendadas por la literatura; así, se han analizado un metápodo (datado por ^{14}C en **>38.000 años** BP) y una vértebra lumbar de *Ursus spelaeus* además de un metatarso de *Cervus elaphus* L. como control del yacimiento

8 / 05

EFECTO DE LA TASA DE MIGRACIÓN Y LA ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA ADAPTACIÓN Y DIVERGENCIA DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Cuevas Torrijos J.M., Miralles R., Moya Simarro A., Elena S.F.
Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Apartado 22085, 46071 Valencia

Los virus de RNA presentan un grado de variabilidad genética mucho más elevado que el observado en organismos superiores. Esto es debido al mayor número de rondas de replicación (o generaciones) por unidad de tiempo en el caso de los virus -frente a sus hospedadores-, así como a la tasa de mutación de la RNA polimerasa viral (entre 10^{-3} y 10^{-5} sustituciones nucleotídicas por sitio y ronda de replicación), que carece de actividad de corrección de errores. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) ha venido siendo empleado como modelo experimental para el estudio de la evolución de los virus de RNA. En este trabajo, se ha analizado la adaptación y divergencia de distintas poblaciones virales aisladas sometidas a un proceso de migración. Para ello, se ha empleado un sistema celular *in vitro* que simula la migración de VSV entre distintas poblaciones celulares, tanto homogéneas como heterogéneas. Nuestros resultados demuestran una correlación positiva entre la tasa de migración y la eficacia media observada entre las poblaciones virales. Además, también se observa que las diferencias entre las eficacias de las distintas poblaciones disminuyen al aumentar la tasa de migración. Estos resultados coinciden con las predicciones de la Genética de Poblaciones y se pueden explicar basándose en la dispersión, por efecto de la migración, de mutaciones beneficiosas originadas en una población aislada. En el caso de poblaciones celulares heterogéneas, se analiza el compromiso, en términos de eficacia, alcanzado al adaptarse simultáneamente a distintos ambientes. Las implicaciones epidemiológicas de estos resultados son discutidas.

8 / 06

EFECTO DEL LIGAMIENTO EN EL CONTROL DE LA CONSANGUINIDAD EN POBLACIONES SELECCIONADAS

Fernández-González, Blanca y Caballero, Armando
Dep. de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, 36200 Vigo.

La consanguinidad produce efectos indeseables en las poblaciones, tales como la pérdida de la diversidad genética y el deterioro de su capacidad reproductiva. Este problema es especialmente importante en el caso de las poblaciones seleccionadas, por lo que se han sugerido estrategias cuyo objetivo es controlar el aumento de la consanguinidad. En la evaluación de estas estrategias el modelo genético empleado es el de loci independientes en el genoma y el criterio de selección depende del parentesco genealógico entre los individuos. Sin embargo, si el tamaño del genoma es pequeño, presentando un ligamiento sustancial entre genes, la información genealógica no da una medida precisa de la probabilidad de homocigosis por descendencia y los métodos que utilizan el parentesco genealógico pueden no ser efectivos. En este trabajo se han simulado poblaciones seleccionadas artificialmente para un carácter cuantitativo, a las que se les aplica un método de control de la consanguinidad y en las que se consideran distintos tamaños del genoma. El método se basa en minimizar el parentesco genealógico o molecular (aquél basado en marcadores moleculares), restringiendo la pérdida en respuesta a la selección a un cierto porcentaje. Con ligamiento total, emplear información genealógica no es un método adecuado. En este caso, la selección de los individuos minimizando el parentesco calculado a partir de marcadores moleculares resulta más efectiva. No obstante, con un tamaño del genoma de unos cinco morgans o superior, el parentesco genealógico es una medida fiable del parentesco real, y los métodos que se basan en la genealogía son casi tan efectivos como los basados en la información molecular.

8 / 07

MATHEMATICAL THEORIES, THE GENETIC BASIS OF EVOLUTIONARY CHANGE AND SPECIATION EVENTS

Carvajal Rodríguez, A.
Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad de A Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña. (acraaj@mail2.udc.es)

The architects of modern evolutive theory were Fisher, Haldane and Wright. The bases of the theory were stated during the first half of the century. Even today some of its essential aspects, such as the different models of adaptive evolution from Fisher and Wrigth, the problem of maintenance of variation in natural populations and the paradox of genetic load, are still in force. Some of these unsolved problems certainly arise from the difficulty in describing biological evolutionary processes with traditional physical-mathematical tools.

The first goal of the work is to show, by means of a short historical review, the interrelation among evolutionary theory and several mathematical branches such as statistics, stochastic processes, differential and numerical analysis, etc.

The second goal is to attract attention to recent mathematical branches such as the theory of dynamic systems and nonstandard analysis, and to try to explain how these still evolving theories could provide a new frame for understanding evolutionary process, particularly speciation.

The genetic change analysis raises a “microscopic” view over speciation process. Diffusion and other partial differential equations allow, under certain conditions, to describe the change in gene frequencies for all genes, alleles and interactions between them. However, the solutions or, even the behaviour of equations, are extremely difficult to obtain or study due to the great number of parameters implicated.

Systems theory approach is integrative and deals more with interrelation sets (patterns) than with the analysis of parts (structures).

It will be shown that it is possible to define the series: *individual, population, species* as a sequence of variable interaction sets $\{I_1\}$, $\{I_2\}$, $\{I_3\}$ with certain properties and an associated (connected with fitness) function f_i (α, β, ...) in each case. The general condition for reproductive isolation:

$\partial f_2 [\{f_1(I_1)\}] / \partial \alpha = 0, \ \forall \alpha$; is obtained as a first step in the introduction of speciation as a result of a dynamic system.

8 / 08

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA POBLACIÓN IBICENCA MEDIANTE STRs

Tomàs C., Picornell A., Castro, J.A., Ramon M.M.
Laboratori de Genètica. Departament de Biologia
Universitat de les Illes Balears

Las poblaciones insulares del Mediterráneo son un excelente objeto de estudio para los genéticos de poblaciones, ya que permiten observar las interacciones entre las sucesivas migraciones que se han producido, así como las acciones de los procesos estocásticos que se dan en poblaciones pequeñas.

Ibiza es la menor de las Islas Baleares y difiere del resto en el origen de los primeros asentamientos humanos, ya que no existen evidencias de poblamientos anteriores a los cartagineses. La población ibicenca se ha mantenido en un número reducido de individuos y relativamente aislada hasta los años 70.

Se ha estudiado, en una muestra de la población de Ibiza, el polimorfismo para nueve STRs (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 y D7S820) mediante el sistema Profiler*plus* (Perkin Elmer). Los loci presentaron un nivel de variabilidad comprendido entre 6 y 13 alelos, y un rango de heterocigosidad entre 0.631 y 0.875. La población resultó estar en equilibrio para todos los loci a excepción de tres: FGA, D5S818 y D13S317, que presentaban un déficit de heterozigotos estadísticamente significativo, este hecho podría ser un indicio de existencia de endogamia en la población.

Al comparar la población de Ibiza con las de Mallorca y Menorca, cinco de los nueve STRs estudiados diferenciaron dichas poblaciones.

La diferenciación genética basada en STRs de la población ibicenca se comparó con los resultados obtenidos mediante marcadores clásicos y RFLPs del mtDNA, los cuales habían mostrado una estructuración de la población balear y una mayor diferenciación de Ibiza que permitía apoyar la hipótesis histórica de su origen cartaginés.

8 / 09

POBLACIONES DOMESTICADAS DE *PHASEOLUS* DEL CENTRO DE ORIGEN ANDINO

Ron, A.M. de[1]; Menéndez, M.C.[2], Makuch, M.[3], Cuadra, C.[4], Neumann,R.[3], Barcala,N.[1]

[1] MBG-CSIC. Pontevedra. España, [2] Universidad de Buenos Aires. Argentina, [3] INTA, Argentina, [4] CRF-INIA. Alcalá de Henares. España

Las provincias del noroeste argentino (NOA) representan el límite Sur del Centro Andino de origen y diversificación vegetal. Allí aún se practica una agricultura tradicional, basada en el cultivo de poblaciones locales de especies que utilizaron ya los habitantes precolombinos como el maíz, la papa o patata y los porotos o judías (*Phaseolus*), sin apenas más cambios que los debidos a la domesticación y a la selección fenotípica masal realizada por los agricultores indígenas.

En el caso de *Phaseolus*, el cambio en las costumbres y la introducción de variedades comerciales ponen en peligro la existencia de las poblaciones primitivas (Aland-races@), y por lo tanto la posibilidad de su uso como fuente de variación en los programas de mejora genética vegetal, como los que se están desarrollando en España y en Argentina.

Por ello, y con el objetivo de obtener semillas de poblaciones domesticadas de *Phaseolus*, en el mes de mayo de 1997 se realizó una expedición a diversas localidades andinas en el Departamento de Santa Victoria (Salta, Argentina, latitud: 221 14' - 221 26' S, longitud: 641 40' - 641 42' O, altitud:1300 - 1700 msnm), en una zona caracterizada por la presencia de bosques y selvas montanas, con una precipitación anual de 1300 mm.

Como resultado de esta expedición, se colectaron 85 poblaciones o cultivares primitivos de *Phaseolus vulgaris* y 12 de *Phaseolus coccineus*. Desde el punto de vista cuantitativo, la reducción en el número de muestras colectadas en esta expedición, respecto a otras anteriores, pone de manifiesto una importante erosión genética en las poblaciones primitivas de *Phaseolus* en el área andina.

8 / 10

CARTOGRAFÍA COMPARATIVA DEL CROMOSOMA X EN EL GRUPO *REPLETA* DE *DROSOPHILA*

Josefa González y Alfredo Ruiz
Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Distintas teorías predicen una tasa de fijación de reordenaciones cromosómicas superior en el cromosoma X que en los autosomas y algunos datos empíricos parecen concordar con esta predicción. El objetivo último de este trabajo es contrastar esta hipótesis en el género *Drosophila* mediante la comparación de la tasa evolutiva del cromosoma X con la de los autosomas. Para ello se pretende obtener un mapa físico detallado del cromosoma X en *D. repleta* y *D. buzzatii* y comparar su organización molecular con la del de *D. melanogaster*. *D. repleta* y *D. buzzatii* pertenecen al grupo repleta (subgénero Drosophila) y divergieron de D. melanogaster (subgénero Sophophora) hace 40-60 millones de años.

Para obtener el mapa físico del cromosoma X se están empleando clones de DNA (plásmidos y fagos que contienen genes y cósmidos) procedentes de *D. melanogaster*. La hibridación de estos clones en los cromosomas politénicos de *D. repleta* y *D. buzzatii* permite su localización precisa. Se dispone en este momento de 52 marcadores de señal única distribuidos uniformemente a lo largo del cromosoma X de *D. melanogaster*. Este mapa físico preliminar ha permitido detectar varios segmentos cromosómicos presumiblemente conservados y obtener una primera estima de la tasa de evolución de este cromosoma entre los dos subgéneros.

Estudios citológicos previos indican que el cromosoma X de *D. buzzatii* difiere del de *D. repleta* por dos inversiones dispuestas en tándem. El mapa físico que se está obteniendo permitirá también contrastar esta hipótesis y estimar la tasa de evolución de este cromosoma desde la divergencia de *D. repleta* y *D. buzzatii* hace 15-22 millones de años.

8 / 11

ORGANIZACIÓN MOLECULAR EN *D. REPLETA* Y *D. BUZZATII* DE TRES REGIONES CROMOSÓMICAS (~1Mb) DEL BRAZO 3R DE *D. MELANOGASTER*

Ferran Casals, José María Ranz y Alfredo Ruiz.
Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Los estudios de cartografía comparativa en el género *Drosophila* indican que los elementos cromosómicos se han conservado en muchos de los linajes del género pero han sufrido una notable reorganización de su contenido interno debida a la fijación de numerosas inversiones paracéntricas. Nuestro grupo está elaborando un mapa físico detallado del cromosoma 2 de *D. repleta* y *D. buzzatii*, dos especies que pertenecen al grupo *repleta* (subgénero *Drosophila*). Para ello se está empleando la hibridación *in situ* de distintos clones de DNA procedentes del elemento homólogo (3R) en *D. melanogaster* (subgénero *Sophophora*). Dentro de este proyecto se ha llevado a cabo un análisis detallado de la evolución de tres pequeñas regiones del brazo cromosómico 3R de *D. melanogaster*. El objetivo de este análisis es comprobar si la tasa de evolución es semejante en distintas regiones de un cromosoma y delimitar con mayor precisión el tamaño de los fragmentos conservados. Para ello se han cartografiado en los cromosomas politénicos de *D. repleta* y *D. buzzatii* más de 50 clones (genes, cósmidos y fagos P1) procedentes de las tres regiones. Los clones de las regiones 83E-84D (~1,1 Mb), 86A-E (~750 kb) y 97B-E(~600 Kb) hibridan en 6, 6 y 7 sitios distintos, respectivamente, del cromosoma 2 de *D. repleta* y *D. buzzatii*. Estos resultados sugieren que el número de puntos de rotura fijados por Mb es menor, y el tamaño de los fragmentos conservados mayor, en el caso de la región 83E-84D, que contiene el complejo *Antennapedia*, que en el de las otras dos regiones.

8 / 12

UN DNA SATÉLITE ESPECÍFICO DEL ROEDOR NORTEAFRICANO *LEMNISCOMYS BARBARUS* POSEE UNA NUEVA SECUENCIA SIMILAR A LA CAJA CENP-B.

Burgos Poyatos, M., Stitou, S., Díaz de la Guardia, R., Zurita Martínez, F., Barrionuevo Jiménez, F.J. y Jiménez Medina, R.
Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071 Granada, España. mburgos@goliat.ugr.es

Un DNA satélite específico del roedor norteafricano *Lemniscomys barbarus* (LB-MspISAT) mostró una elevada homogeneidad en la secuencia de diferentes monómeros, en los que no se detectó la presencia de subrepeticiones internas. Experimentos de hibridación en filtro e *in situ* demostraron que se encontraba repetido en tándem en todos los centrómeros del complemento. En este DNA fue detectado un motivo de 19 pares de bases, similar a la caja CENP-B, relacionada con la función centromérica. El motivo encontrado en LB-MspISAT conserva 12 de los 17 pb de la caja CENP-B de humanos. Sin embargo, sólo se conservan 5 de los 9 pb de la secuencia canónica, necesaria para la unión de la proteína CENPB. La comparación de las secuencias de ambos motivos revela la ocurrencia de sustituciones e inserciones que incrementan la naturaleza palindrómica del motivo de *Lemniscomys* en comparación con el de humanos y otras especies. Sus características hacen posible que aún pueda desempeñar alguna función relacionada con la actividad centromérica o que esté implicado en los procesos de homogeneización del satélite en el que se encuentra.

8 / 13

UTILIZACIÓN DE LA REGIÓN ESPACIADORA ITS-1 DEL ADN RIBOSOMAL PARA ESTUDIO DE RELACIONES FILOGENÉTICAS

Bernardo, A., Loarce, Y., Soler, C y De Adrés, M.T.
Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá
Dpto de Mejora de Plantas. CIT. INIA. Alcalá de Henares.

El número de géneros pertenecientes a la tribu *Triticeae* ha variado mucho desde la clasificación de Linneo. La confusión taxonómica ha sido una consecuencia de que las especies circunscritas a los diferentes géneros de esta tribu son muchas de ellas poliploides, con diferente tipo de ploidia y entre las que ha existido un alto grado de hibridación.

A pesar de ello, se han descrito muchas filogenias obtenidas a partir de caracteres tanto morfológicos como moleculares, aunque ninguna de ellas llega a reproducir de una forma clara la filogenia de la tribu.

En este trabajo, hemos analizado las secuencias correspondientes al espaciador de ADN ribosomal ITS-1 de diferentes especies dentro de la tribu *Triticeae* y de algunas otras especies pertenecientes a la subfamilia *Pooideae.* De los resultados obtenidos se ha estimado su posible utilización en estudios de relaciones filogenéticas.

Este trabajo ha sido financiado con cargo al proyecto SC 97-065 .

8 / 14

SECUENCIAS HOMÓLOGAS A *HOBO* EN CEPAS DE *D. MELANOGASTER*

Gas, M. E.; Sanchez., Maria D., Galindo, M. Ibo y Pascual, L.
Dpto. de Genètica. Facultat de Biològiques. Universitat de València.
Dr. Moliner 50. Burjassot 46100. València.

Hobo es un elemento transponible perteneciente a la clase II, con repeticiones terminales invertidas cortas.

Hasta la fecha se había descrito en *Drosophila melanogaster* la estructura de dos elementos completos denominados HFL1 (Calvi et al, 1991) y $hobo_{108}$. Nosotros hemos clonado y secuenciado dos tipos de elementos transponibles homólogos al elemento canónico, en tres cepas de *Drosophila melanogaster*: *Hikone*, *T-Berlin* y ry^{506}. Estas tres cepas fueron testadas previamente mediante Southern Blot y caracterizadas como vacías tanto del elemento canónico como de elementos defectivos.

La región estudiada por nosotros se encuentra dentro de la ORF1 del elemento HFL1. Las dos familias de elementos se diferencian principalmente por una deleción de 149 nucleótidos que abarca desde el nucleótido 951 al 1098 del elemento canónico, lo que da lugar a dos tipos de amplificados de 700 y 560 nucleótidos aproximadamente.

De cada una de las tres cepas se han analizado cuatro clones, pero tan sólo en dos de ellas, en *T- Berlín* y ry^{506} hemos conseguido los dos tipos de elementos, si bien por PCR se detectan los dos, en las tres cepas.

El análisis de éstas secuencias nos ha permitido atribuir el calificativo de hobo ancestral a estos elementos establecer, y discutir, hipótesis relacionadas con la evolución de éste elemento y su posible aparición, o invasión reiterada en el tiempo, en el genoma de *D.melanogaster*.

8 / 15

EVOLUCIÓN DEL RETROTRANSPOSÓN *GYPSY* EN *DROSOPHILA*

Vázquez-Manrique, R*., Martínez-Sebastián, M.J+. y de Frutos R+.
*Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe. Avda Campanar 21, 46009 Valencia.
+Departamento de Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. C/ Dr Moliner 50, 46100 Burjassot

Se ha realizado el análisis filogenético del elemento *gypsy*, en las especies: *D. ambigua, D. obscura, D. madeirensis, D. bifasciata, D. pseudoobscura, D. azteca, D. affinis y D. persimilis*. Este retrotransposón está formado por dos LTRs que flanquean tres ORFs similares a las de retrovirus, que codifican las proteínas *gag*, *pol* y *env*. Esta última no es funcional, excepto en el elemento *gypsy* descrito en *D. melanogaster*. Se ha escogido para su estudio, la región situada entre las posiciones 5375 y 5780 (correspondientes al elemento descrito en *D. subobscura* Alberola *et al*, 1996), que comprende una pequeña parte del gen *gag*, una región intergénica y gran parte de *env*. Se diseñaron primers degenerados a partir de las secuencias del elemento *gypsy* de *D. melanogaster, D. subobscura, D. virilis* y *D. hydei*. Se procedió a amplificar la región descrita y posteriormente se clonó. Se secuenciaron alrededor de cinco clones por especie. Con las secuencias resultantes, junto a las descritas hasta ahora en las especies de *Drosophila*, se contruyeron árboles filogenéticos por diversos métodos. Todos presentan la misma topología, la cual es coherente con la filogenia del grupo *obscura* propuesta por diversos autores. Sin embargo, los elementos *gypsy* de *D. virilis y D. hydei* están mucho mas cercanos a los del grupo *obscura* que lo esperado en base a las distancias filogenéticas entre dichas especies, lo que apuntaría a sucesos de transferencia horizontal. Por otro lado se discute la funcionalidad del gen *env* en las especies analizadas.

8 / 16

CARTOGRAFIA MOLECULAR DE UNA REGION CROMOSOMICA IMPLICADA EN LA RESISTENCIA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* AL PARASITOIDE *LEPTOPILINA BOULARDI*

Hita Meseguer, M*; Poirié, M+; Carton, Y+; Pascual Calaforra, L*; Periquet, G*.
*Dpto de Genética, Facultad de Biologicas, Universidad de Valencia. Dr. Moliner, 50. Burjasot 46100 Valencia.
+Université F. Rabelais. Parc Grandmont. I.R.B.I. 37200 Tours. Francia

La larva de *Drosophila melanogaster* reacciona frente a los huevos del parasitoide *Leptopilina boulardi* rodeandolos con una cápsula multicelular melanitica. La determinación genética de esta respuesta fue previamente estudiada usando cepas susceptibles (no forman cápsula) y resistentes (forman cápsula). Los resultados sugieren que las diferencias en la respuesta de encapsulación envuelven a un único gen, Rlb (Resistencia a *Leptopilina boulardi*), con dos alelos, siendo dominante la resistente (Carton & al.). Rlb proporciona protección específica frente a *Leptopilina boulardi*, lo cual es debido probablemente al reconocimiento del parasitoide. Estudios recientes han localizado este gen en el cromosoma 2R.

Usando cepas portadoras de delecciones, Carton & al. demuestran que la resistencia a *Leptopilina boulardi* está en la región 55C; 55F y que la región 55E2-E6; F3 está envuelta particularmente. Nuestro principal objetivo se basa en su localización genética y molecular.

Un mapa físico de la región 55C; 56A ha sido construido basándose en el solapamiento de cosmidos y fagos P1. Usando digestiones simples y dobles, crosshibridacion de los fragmentos de restriccion, y la localizacion de genes y STS, un mapa de restricción completo de esta región (830 Kb) ha sido obtenido.

Mediante hibridaciones in situ sobre cromosomas politénicos de las cepas deleccionadas, hemos seleccionado la región de nuestro mapa fisico que corresponde a 55E2-E6; F3.

8 / 17

HACIA UNA ESTRATEGIA PARA LA RECUPERACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE RAZAS BOVINAS ESPAÑOLAS.

García-Muro, E., Martín-Burriel, I., Zarazaga, I., Osta, R., Rodellar,C., y Zaragoza, P.
Lab. de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

Dentro de los objetivos de los Proyectos Europeos AIR 3 CT94 2066 y RES GEN PL98-118, dedicados al estudio de la diversidad genética de razas bovinas europeas, nuestro laboratorio ha centrado su estudio en la caracterización genética de las siguientes razas autóctonas españolas: Asturiana de las Montañas, Asturiana de los Valles, Menorquina, Murciana, Pirenáica, de Lidia (con especial interés en el Encaste Navarro) y Betiso. Para ello, se han estudiado 30 microsatélites estandarizados (información sobre los mismos en http://dad.fao.org/dad-is y en http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cdiv_www) y 47 antígenos de Grupos Sanguíneos, en una muestra de 50 animales por cada raza. Para procesar los datos se han utilizado los paquetes estadísticos Biosys y Phylip, obteniéndose medidas de diversidad (ej. heterocigosidad media, nº medio de alelos por locus...), distancias genéticas (Ds y Dc) y finalmente, construyéndose diferentes dendogramas basados en los métodos UPGMA y Neighbour-Joining. Al interpretar los resultados se observa que la Asturiana de los Valles es la raza con mayores valores de diversidad, mientas que la Menorquina y de Lidia muestran los menores valores. Estas dos razas son las más divergentes al interpretar las distancias genéticas obtenidas.

A partir de la información obtenida, se pretende conseguir una base de datos molecular de las distintas razas, con el fin de determinar la originalidad y la propia identidad genética de cada raza para, en un futuro próximo, determinar regiones genómicas que estén muy influenciadas por la presión de la selección y que revelarán diferencias entre las razas. Será entonces cuando se establezca una relación entre la selección y la diversidad con el fin de contribuir a la conservación de dichas razas, orientada siempre desde el punto genético.

8 / 18

IDENTIFICACION DE VARIEDADES CUBANAS DE *PHASEOLUS VULGARIS* MEDIANTE MARCADORES ISOENZIMATICOS Y RAPDS

Sosa del Castillo, Daynet; Vaquero Rodrigo, Francisca; Vences Benito, Javier.
Área de Genética, Dpto. de Ecología, Genética y Microbiología,Universidad de León.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa diploide (2n=22) de gran interés agrícola y que representa una importante fuente de proteínas en la dieta humana a nivel mundial. En Cuba constituye el elemento básico de la alimentación diaria, de manera que se están realizando grandes esfuerzos con el fin de elevar los rendimientos y la producción total para reducir las importaciones. Entre los programas de mejora genética de este cultivo se incluye la evaluación de la variabilidad del germoplasma existente.

Con este fin se ha determinado la diversidad genética inter e intra varietal de 12 variedades cubanas de uso comercial procedentes del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical de La Habana, mediante el estudio de 15 loci isoenzimáticos y el empleo de varias decenas de marcadores de RAPDs.

El grado de variabilidad detectado para loci isoenzimáticos ha sido sensiblemente inferior al estimado utilizando marcadores RAPDs. La utilización de marcadores isoenzimáticos sólo ha permitido establecer agrupaciones de variedades que presentan una elevada similitud entre sí. La técnica de PCR para marcadores RAPDs ha permitido identificar todas y cada una de las variedades.

8 / 19

CINCO CASOS DE APARENTE FIJACIÓN DE ELEMENTOS MÓVILES EN UNA POBLACIÓN NATURAL DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Xulio M. Maside y Brian Charlesworth
ICAPB, Universidad de Edinburgo, Reino Unido. Xulio.Maside@ed.ac.uk

Los elementos móviles constituyen una fracción significativa del genoma de la mayor parte de las especies hasta ahora caracterizadas a nivel molecular. Una de las hipótesis de trabajo es que en poblaciones naturales, su proliferación por transposición es contrarrestada por una o más fuerzas deterministas, como la selección contra los efectos deletéreos de las inserciones, la autorregulación de la transcripción o el intercambio ectópico, cuyo protagonismo relativo no está aún totalmente establecido. Este modelo predice que la tasa de ocupación de los lugares de inserción ha de ser baja, esperándose frecuencias elevadas únicamente cuando la inserción tiene efectos positivos en el valor adaptativo del huésped. Este trabajo, actualmente en progreso, tiene tres objetivos: esclarecer la aparente fijación de elementos de 5 familias (*297, 1731, roo, copia* y *2156*) revelada durante el estudio mediante hibridación *in situ* de una población natural (Beltsville, EEUU) de *Drosophila melanogaster*, determinar si estas fijaciones son exclusivas de esta población natural, e identificar las fuerzas evolutivas responsables mediante el estudio de la variabilidad nucleotídica en la región genómica adyacente al elemento fijado. Hasta ahora hemos podido confirmar que *1731*, *2156* y *roo* están fijados en 80B, 87C1 y 20A1, respectivamente. Asimismo, el análisis de la secuencia de una región genómica de unas 14 Kb adyacente a *1731* en 80B reveló la presencia de fragmentos de elementos móviles y de otros segmentos de ADN repetitivo, lo que sugiere que se trata de un región parcialmente heterocromatinizada, en concordancia con el papel de "cementerio" de elementos frecuentemente asignado a la heterocromatina.

8 / 20

UTILIZACIÓN DE AFLPs PARA ESTUDIAR RAZAS PRIMITIVAS DE LA PALMERA MELOCOTÓN O PEJIBAYE (*BACTRIS GASIPAES* KUNTH) EN LA AMAZONÍA BRASILEÑA

Gallego Rodríguez, F.J.[1]; Núñez Moreno, Y.[1]; Batista Picanço, D.[2]; Reis Sousa, N.[3]; Clement, C.R.[4]; Astolfi Filho, S.[2].

1. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Unidad de Marcadores Moleculares-Dpto. Mejora Genética y Biotecnología, Autovia A-6 Km 7,5, 28040 Madrid, España
2. Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos 3000, 69077-000 Manaus, AM, Brasil
3. Embrapa Amazônia Ocidental, Cx. Postal 319, 69011-970 Manaus, AM, Brasil
4. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Cx. Postal 478, 69011-970 Manaus, AM, Brasil

La palmera melocotón o pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth) fue domesticada por su fruto por los ameríndios de la Amazonía ocidental y tiene hoy un destacado potencial económico debido a su corazón o palmito. Como cultivo domesticado, el pejibaye tiene un complejo sistema jerárquico de razas primitivas, desarrolladas por diferentes naciones indígenas antes del descubrimiento de América; parte de este complejo fué caracterizado y mapeado en base a su morfología y geografía. A lo largo del Rio Amazonas, en Brasil, fueron propuestas tres razas primitivas, con fuertes indicaciones de introgresión entre ellas, tanto que la raza intermedia puede ser un artefacto del análisis morfométrico.

Mediante análisis genético con AFLPs hemos caracterizado la estrucutra poblacional de esta especie. A partir del meristemo apical, se preparó ADN de 100 plantas de diversas poblaciones de las tres razas, mantenidas en el Banco de Germoplasma de Pejibaye en Manaos, Amazonas, Brasil, generando marcadores AFLPs con 6 combinaciones de cebadores. Estos marcadores fueron sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador ABI Prism 310 y analizados mediante el programa GeneScan. Finalmente, se seleccionaron un total de 245 fragmentos de ADN con los que se estimaron las distancias genéticas mediante el coeficiente de Jaccard. Los resultados obtenidos muestran un grado notable de variabilidad presente en las poblaciones de pejibaye y han sido empleados para evaluar la hipótesis de las tres razas y para identificar zonas de hibridación.

Este trabajo ha sido financiado con fondos del “Programa Piloto de Proteção de las Florestas Tropicales” del Brasil – PP/G7.

8 / 21

A NEW APPROACH FOR ANALYSING THE VARIATION IN HUMAN MINISATELLITES: AN EXAMPLE WITH MSY1

Brión M.J., Cao R.,Salas A.,González-Neira A.,Sánchez-Diz P., Barral S.,Lareu MV., Carracedo A.

Institute of Legal Medicine. University of Santiago de Compostela. Spain

San Francisco s/n. 15705. Fax.: 981-580336. E-mail: apimlang@uscmail.usc.es

During the last years, a wide variety of different polymhorphic loci have been analysed in order to understand the human population history and evolution patterns. There is overwhelming literature on the usefulness of several nuclear markers and mitochondrial DNA variation for these purposes. However, in addition to these markers, Y chromosome carries diverse type of polymorphisms wich can be used to analysed paternal lineages.

Y-specific locus MSY1 (DIF155S1) is the most variable single marker known in this chromosome. Its extremely high degree of structural diversity can be analysed using minisatellite variant repeat PCR (MVR-PCR).

Analysis of MVR patterns is a difficult task since the general mutation process involved in the evolution of this loci is even unknow. The understanding of the biological rules implied in the evolution of MSY1 is necessary to display the alignment of codes.

In this study, we introduce a novel method to measure the MVR-MSY1 codes variability and the genetic distance between different populations groups, based on the statistical similarity of the patterns. This new statistical approach can be appied to others misatellites and it have allow us the phylogenetic reconstruction of populations.

The method was applied to five data sets from Europe and North Africa populations. A neighbour joining tree was constructed with the distance matrixes obtained. The results are in accordance with those obtained with other genetic markers and with the history of these human populations.

8 / 22

ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION CROMOSOMICA DE VARIANTES DEL ESPACIADOR RIBOSOMAL IGS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

González Cordero, Ana Isabel[1] ; Polanco de la Puente, Carlos[1] ; Dover, Gabriel A.[2]
[1]Area de Genética, Fac. Biología, Universidad de León, 24071 León (España);
[2]Dept. of Genetics, University of Leicester, Leicester LE1 7RH (Reino Unido)

El patrón de evolución concertada que presenta el DNA ribosomal de eucariotas implica la existencia de procesos de homogeneización de sus unidades de repetición. Los recientes análisis realizados en *D. melanogaster* sobre la variabilidad presente en las regiones espaciadoras IGS e ITS han revelado que dichos espaciadores siguen modelos de homogeneización diferentes a pesar de encontrarse en la misma unidad de repetición del rDNA. Basado en la función de las regiones IGS en el apareamiento entre los cromosomas X e Y, hemos propuesto recientemente un modelo de intercambio de fragmentos de cadena sencilla de la región IGS que puede explicar las distintas trayectorias evolutivas de las regiones IGS e ITS. Es necesario analizar la distribución en cromosomas X e Y de variantes en longitud y de mutaciones en el IGS para obtener evidencias directas de dichos intercambios.

Se ha analizado la estructura interna de un alto número de variantes en longitud del espaciador IGS que han sido aisladas específicamente de cromosomas X e Y determinados. Se ha encontrado distinta estructura interna para variantes IGS de idéntica longitud, lo que indica una mayor variabilidad en esta región que la revelada únicamente por análisis de variantes de tamaño. A pesar de existir variantes IGS idénticas en los cromosomas X e Y de poblaciones alejadas, el análisis comparativo de la estructura interna ha revelado aislamiento cromosómico para ciertas regiones del espaciador IGS, como ocurre para el espaciador ITS, lo que no sólo apoya el modelo de intercambios entre otras regiones, sino que define con precisión cuáles están involucradas.

8 / 23

POLIMORFISMOS DE INSERCION ALU Y HETEROGENEIDAD GENETICA

M. de Pancorbo M[1], Martínez-Bouzas C[1], Alvarez-Alvarez M.[1], Rodríguez-Tojo M:J.[1], Castro A.[2]

[1] Dpto. de Biología Celular y C. M, Ftad. Medicina, Universidad del País Vasco, Leioa-Bizkaia.

[2] DataGene, Sangroniz 6, Sondika-Bizkaia

Los elementos Alu son marcadores genéticos muy estables, particularmente útiles en los estudios genético-poblacionales (Novick et al., 1996, Bioscience 46:32-41). Además, la naturaleza bialélica y elevada heterozigosidad de los polimorfismos Alu permite utilizar un número reducido de individuos. Por último, estos polimorfismos pueden ser analizados de una forma rápida y sencilla. Todas estas características favorecen su elección para realizar estimas de la existencia de subestructura genética en las poblaciones, sin necesidad de elaborar complejas bases de datos basadas en otras clases de polimorfismos que requieren más individuos y técnicas mas complejas.

En este trabajo, hemos estudiado la población Vasca como un ejemplo para demostrar la utilidad de las inserciones Alu en el análisis la heterogeneidad genética. Hemos analizado seis polimorfismos de inserción Alu en tres muestras de poblaciones vascas autóctonas (Gipuzkoa, Bizkaia y Araba) y otra muestra formada por individuos que residen en el País Vasco.

Los valores de Fst obtenidos no muestran subestructura poblacional significativa entre estos grupos de población vasca, resultados que se correlacionan con algunos previamente obtenidos en los polimorfismos de STRs. Sin embargo, los análisis de flujo génico parecen indicar una evolución aislada de algunos de los grupos vascos, en concordancia con los registros de la evolución histórica experimentada por estos grupos de población.

En conclusión, los polimorfismos de inserción Alu han demostrado ser de gran utilidad para estimar el grado de subestrucutura de las poblaciones humanas, indicando que la evolución aislada de las poblaciones vascas no se traduce en una subestructura genética apreciable en la población actualmente asentada en el País Vasco.

8 / 24

ANALISIS DE RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *CICER* EMPLEANDO MARCADORES RAPDs.

Juan Gil[2], Josefa Rubio[1], Marta Iruela[1], Elie Hajj-Moussa[1], Teresa Millán[2], José-Ignacio Cubero[2].

[1] Dpto. de Mejora y Agronomía, CIFA Alameda del Obispo, Aptdo. 4240, 14080 Córdoba.

[2] Dpto. de Genética, Universidad de Córdoba, Aptdo. 3048, 14080 Córdoba.

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas de grano cultivadas tradicionalmente en el área Mediterránea. Esta especie, aunque presenta variabilidad para caracteres morfológicos como color de flor o forma, tamaño y color de la semilla, presenta un bajo nivel de polimorfismo molecular. Una forma de ampliar la diversidad genética de esta especie cultivada sería incluir en los programas de mejora tradicionales la introgresión de caracteres de interés a partir de especies silvestres relacionadas. El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies del género *Cicer* con el fin de facilitar futuros programas de cruzamientos. Se han empleado 75 entradas pertenecientes a 14 especies diferentes: 8 especies anuales, donde se incluye garbanzo cultivado (Sección Monocicer) y 6 perennes (5 de la Sección Polycicer y 1 de la Acanthocicer). En la mayoría de las especies silvestres se analizaron 5 entradas por especie, en el caso de *C.arietinum* se estudiaron 26 entradas de diferente origen incluyendo garbanzos tipo kabuli y desi. El análisis de la variabilidad genética se realizó empleando marcadores RAPDs. La amplificación con 13 cebadores originó más de 200 bandas diferentes. Las diferentes entradas fueron agrupadas con el método UPGMA basándonos en matrices de similaridad obtenidas con el índice de Jaccard. Los resultados revelaron un grupo claramente diferenciado que incluye *C.arietinum, C.reticulatum y C.echinospermum*. Dentro de las especies anuales *C. arietinum* fue la que menor variabilidad mostró y *C. reticulatum, C. echinospermun, C. pinatifidum, C. judaicum* y *C. cuneatum* las que mayor variabilidad mostraron.

8 / 25

MAPEO GENETICO DEL SISTEMA B DE GRUPOS SANGUINEOS BOVINOS EN EL CROMOSOMA BTA12.

Roy, R., Rodellar, C.
Laboratorio de genética bioquímica y grupos sanguíneos. Facultad de Veter inaría. Zaragoza. C Miguel Servet 177. Tel. 976761620 Fax 976761612

La localización genética en el mapa bovino de loci complejos como el sistema B es un proceso complicado. Para conseguir el mapeo genético fino del sistema B de grupos sanguíneos bovino se ha realizado el estudio presente en un panel de familias de raza NORMANDA. Se han testado 350 animales, agrupados en tres grandes familias. En cada animal se ha tipificado su grupo sanguíneo B (EAB) y cinco microsatélites, localizados en el BTA12 (INRA005, INRA209, TGLA345, ILSTS033 y BM4028).

Para el análisis de ligamiento entre los cinco microsatélites y el EAB, se ha utilizado el programa CRIMAP (versión 2.4, 1990). Con el objetivo de afinar su localización y reafirmar o no los resultados obtenidos por Kappes et al (1997), se han calculado las distancias entre los loci considerados dos a dos y considerando todos los loci en su conjunto.

La región del BTA 12 mapeada abarca 53.8 cM, con una distancia media entre marcadores de 8.96 cM. Se ha establecido el oren siguiente:
TGLA 345 - BM4028 - EAB - INRA 005 - ILST 033 - INRA 209.

La inclusión de marcadores como los grupos sanguíneos en el mapa es una herramienta muy útil para el mapeo comparativo. Es importante indicar igualmente que la generación del mapa genético de este cromosoma será una herramienta muy útil también para el mapeo de QTLs y la selección asistida por marcadores, especialmente si recordamos que el sistema B de grupos sanguíneos se ha relacionado a un QTL (Beever et al.,1990), el cual se ha observado que tiene relación con la variación de la tasa de crecimiento antes del destete y espesor de grasa de dorsal.

8 / 26

DISTRIBUCIÓN DEL DESEQUILIBRIO GAMÉTICO ENTRE LOCI MICROSATÉLITES DEL CROMOSOMA 11p HUMANO

Hermida, J. J., Zapata, C.
Departamento de Biología Fundamental, Universidad de Santiago,
15706 Santiago de Compostela. bfcazaba@usc.es

La distribución del desequilibrio gamético a lo largo de los cromosomas es muy poco conocida lo que suscita importantes interrogantes en el marco de la Genética Multilocus. Uno de estos interrogantes es si los niveles de desequilibrio son uniformes a lo largo de los cromosomas o si, por el contrario, se dan variaciones regionales en respuesta a diferencias estructurales y funcionales. En el presente trabajo hemos estudiado la distribución del desequilibrio gamético entre 10 loci microsatélites situados en las regiones intersticial y centromérica del cromosoma 11p humano a partir de un elevado número de individuos de población gallega. Los resultados obtenidos son contrastados con los que hemos obtenido previamente para la región telomérica del mismo brazo cromosómico. En la zona intersticial y centromérica se detecta un 62% de pares de loci con una asociación significativa de intensidad moderada. La frecuencia de recombinación y distancia física media, entre los marcadores que presentan asociaciones significativas, es de 10 cM y 7 Mb, respectivamente, y se detectan asociaciones entre loci separados por un máximo de frecuencia de recombinación de 23 cM y distancia física de 17 Mb. Estos resultados concuerdan en líneas generales con los obtenidos para la región telomérica aunque la intensidad de las asociaciones parece ser ligeramente superior en la región centromérica e intersticial que en la telomérica. Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de desequilibrio gamético son más bien uniformes a lo largo de regiones características (centromérica, intersticial y telomérica) del cromosoma 11p humano.

8 / 27

CARACTERIZACION DEL DESEQUILIBRIO GAMETICO ENTRE LOCI MICROSATELITES DE LA REGION TELOMERICA DEL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 11 HUMANO

Rodríguez, S.[1], Sacristán, F.[2] y Zapata, C.[1]

[1] Departamento de Biología Fundamental. Universidad de Santiago, 15706 Santiago de Compostela. [2] Anatomía Patológica. Hospital Juan Canalejo. A Coruña.

bfcazaba@usc.es

El estudio de las asociaciones no al azar entre alelos de loci diferentes (desequilibrio gamético) proporciona información sobre la localización y organización de los genes a lo largo de los cromosomas, la importancia relativa de los distintos agentes evolutivos que actúan sobre la variabilidad genética y la historia de las poblaciones. Décadas de estudios experimentales han llevado a aceptar que el fenómeno del desequilibrio gamético es sólo relevante entre loci estrechamente ligados. Sin embargo, esta valoración no está plenamente justificada a la luz de los escasos estudios de desequilibrio realizados entre loci distantes en el cromosoma. En el presente trabajo hemos caracterizado el desequilibrio gamético existente entre 12 loci microsatélites que marcan una región extensa de la zona telomérica del cromosoma 11p humano (19 cM o 14,5 Mb). Los genotipos multilocus para una amplia muestra de individuos de Galicia se obtuvieron mediante PCR. Sorprendentemente, la mayor parte de los pares de loci analizados (74%) muestran asociaciones significativas de intensidad débil o moderada. La frecuencia de recombinación y la distancia fisica máxima entre loci en desequilibrio es de 19 cM y 14,5 Mb y la media es de 7 cM y 6 Mb, respectivamente. Los resultados obtenidos conducen a la importante conclusión de que el fenómeno del desequilibrio gamético es relevante incluso entre loci muy distantes en los cromosomas.

8 / 28

EVOLUCIÓN DEL RETROTRANSPOSÓN *BLOOD* EN EL COMPLEJO *MELANOGASTER* DE *DROSOPHILA*

Costas Costas, J.[1], Valadé del Río, E.[1], Naveira Fachal, H.[2]
[1]Departamento de Bioloxía Fundamental. Universidade de Santiago de Compostela 15706 Santiago de Compostela .[2]Departamento de Bioloxía Celular e Molecular. Universidade de A Coruña, 15071 A Coruña. bfcostas@usc.es

La producción de nuevas copias de un elemento móvil mediante retrotransposición es muy poco fidedigna, debido a la falta de actividad correctora de errores de lectura de las polimerasas implicadas. Además, existe la posibilidad de recombinación durante la reversotranscripción, si dos RNA genómicos distintos son encapsidados dentro de la misma partícula de tipo retroviral. Estos procesos generan gran diversidad en los retrotransposones con LTRs. Si un retrotransposón está bien adaptado a su ambiente intracelular, la mayoría de las nuevas variantes será eliminada como consecuencia de una selección entre elementos dentro del genoma, dado que la selección natural a nivel de organismo limita el número de copias de un elemento en el genoma.

Nuestro interés se centra en saber el efecto de la selección intragenómica sobre la variabilidad de una familia de retrotransposones, usando el elemento *blood* en las especies del complejo *melanogaster* de *Drosophila* como modelo. Usamos la PCR para amplificar la región 5' no traducida de *blood* en las cuatro especies del complejo. Esto nos permitió detectar la existencia de variantes de longitud, compartidas entre distintas especies. El análisis filogenético de secuencias representativas de las distintas variantes de longitud reveló que las dos variantes más abundantes se correspondían con dos linajes cuya diferenciación precedió a la formación del complejo. La comparación de la divergencia entre elementos de diferentes especies dentro del mismo linaje sugiere que ambos linajes han estado sometidos a constricción funcional durante su evolución, representando un ejemplo de dos linajes distintos compitiendo en el mismo genoma durante un periodo de tiempo significativo.

Trabajo financiado por el proyecto XUGA 10304B97, dirigido por H. Naveira

8 / 29

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y ÉXITO EN EL APAREAMIENTO A LO LARGO DE UNA CLINA AMBIENTAL EN *LITTORINA SAXATILIS.*

Cruz Guerrero, R.[1], Rolán-Álvarez, E.[2] y García Suárez, C.[1]

[1] Departamento de Bioloxía Fundamental. Universidade de Santiago de Compostela 15706 Santiago de Compostela. bfracruz@usc.es

[2] Departamento de Biquímica, Genética e Inmunología. Universidad de Vigo. 36200 Vigo.

Las zonas híbridas son regiones estrechas que separan grupos de individuos genéticamente distintos que son capaces de hibridar. La selección (endógena o exógena) juega un papel fundamental en el mantenimiento de la mayoría de las zonas híbridas. Por ello es interesante estudiar la acción de la selección natural en distintos puntos de la clina ambiental asociada a la zona híbrida.

En las poblaciones gallegas del gasterópodo marino *Littorina saxatilis* encontramos una gran variabilidad morfólogica asociada al gradiente ambiental existente a lo largo de la zona intermareal. Existen dos formas puras que viven preferentemente en los extremos de la clina pero cuya distribución se solapa en una estrecha zona media donde aparecen también individuos fenotipicamente intermedios.

Estudios previos de la viabilidad de las formas a lo largo de la clina indican que esta zona híbrida se ajusta a un modelo de gradientes de selección. Nosotros hemos estudiado otro componente de fitness, la selección sexual, para valorar su contribución al mantenimiento de este polimorfismo.

Recogimos muestras de individuos en dos localidades y dos estaciones del año. Analizamos separadamente los individuos de las formas puras que viven en su hábitat típico (en alopatría) y los que viven en la zona media (en simpatría). En cada grupo estudiamos, mediante regresión múltiple, la relación entre caracteres fenotípicos y selección sexual. La comparación de los resultados obtenidos en los distintos puntos del gradiente parecen indicar un papel menor de la selección sexual en el mantenimiento del polimorfismo.

8 / 30

ANÁLISIS DE FECUNDIDAD EN UNA ZONA HÍBRIDA DE *Littorina saxatilis*: RELACIÓN CON LA VARIACIÓN FENOTÍPICA Y AMBIENTAL

Cruz Guerrero, R.[1], Rolán-Álvarez, E.[2] y García Suárez, C.[1]

[1] Departamento de Bioloxía Fundamental. Universidade de Santiago de Compostela 15706 Santiago de Compostela. bfracruz@usc.es

[2] Departamento de Biquímica, Genética e Inmunología. Universidad de Vigo. 36200 Vigo.

En las costas gallegas más expuestas el gasterópodo marino Littorina saxatilis presenta una clina fenotípica muy marcada asociada con el gradiente ambiental existente a lo largo de la zona intermareal. En la zona baja, más expuesta a la acción del oleaje, vive una forma pequeña que presenta una concha lisa y sin bandas y en la zona alta, más expuesta al sol, encontramos una forma mayor y cuya concha presenta bandas y costillas. Las dos formas pueden verse también en una zona intermedia viviendo en simpatría junto a individuos fenotípicamente intermedios. Este polimorfismo parece estar mantenido por gradientes de selección a lo largo de la zona intermareal.

Para estudiar la contribución de la fecundidad (medida como el número de embriones viables que porta una hembra) a esta acción diferencial de la selección natural hemos recogido hembras de las tres formas a lo largo de la clina ambiental en dos localidades y dos estaciones del año. Usamos el método de Lande y Arnold de regresión múltiple de caracteres fenotípicos sobre fitness para caracterizar la acción de este componente de la selección natural en cada forma y en cada zona de la costa. Para intentar integrar los efectos ambientales en este estudio lo hemos complementado con un “path análisis”.

Los resultados no indican un papel importante de la fecundidad en el mantenimiento de la zona híbrida pero muestran un comportamiento peculiar en los híbridos: su fecundidad es intermedia pero presentan unas características adaptativas muy distintas a los morfos puros en la zona media.

8 / 31

FILOGEOGRAFÍA MITOCONDRIAL DEL GÉNERO SCOMBER

Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Rey-Méndez, M.
Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular. Facultade de Bioloxía.
Universidade de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela.
email=bnjquint@usc.es

El primitivo género de escómbridos, Scomber, incluye a tres especies de caballas ampliamente distribuidas: Scomber scombrus, S. japonicus y S. australasicus. Las relaciones genéticas inter- e intra-específicas fueron evaluadas utilizando secuencias del dominio hipervariable izquierdo de la Región Control del ADN mitocondrial.

Las relaciones evolutivas obtenidas para el género Scomber fueron descritas utilizando valores de distancias genéticas y construcción de árboles filogenéticos por "neighbor-joining" con Rastrelliger kanagurta como grupo externo. Las topologías obtenidas indican la naturaleza parafilética de S. japonicus, con distintos grupos geográficamente distribuidos, y S. australasicus, así como la posición divergente de S. scombrus. En coincidencia con la distribución geográfica de los grupos de haplotipos en la topología de los árboles filogenéticos, el análisis de la variación genética molecular (AMOVA) intra-especifica indica en S. scombrus una ausencia de estructura poblacional en el Atlántico noroeste, nordeste y Mediterráneo, mientras que, en S. japonicus se detecta tanto divergencia intra-oceánica entre Atlántico sudoeste/noreste y Pacifico noroeste/sudoeste como inter-oceánica entre Pacífico y Atlántico.

La divergencia de las poblaciones Atlántica y Pacífica de S. japonicus, por el hecho vicariante de la elevación del Istmo de Panamá, origina un elevado valor medio de distancias genéticas, de 0,086, que permiten la calibración de la tasa de evolución de este dominio de la región control en 2,46-3,44% de divergencia nucleotídica por millón de años.

8 / 32

HERADABILIDAD Y AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN *LITTORINA SAXATILIS*: DATOS PRELIMINARES EN LABORATORIO

Carballo, M. y Rolán-Alvarez, E.
FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE VIGO, 36200 VIGO
(monica@uvigo.es / rolan@uvigo.es)

En la región intermareal de las costas gallegas existe un polimorfismo extremo en el caracol *Littorina saxatilis*, al aparecer dos ecotipos adaptados a diferentes niveles del intermareal y asociados a distintos hábitats. Además en una zona intermedia se pueden encontrar ambas formas juntas con un porcentaje variable de formas morfológicamente intermedias. Ambos ecotipos difieren anatómica y morfológicamente, presumiblemente como consecuencia de la acción diferencial de la selección natural en los diferentes hábitats, aunque se desconoce la base hereditaria de la mayoría de sus diferencias. Entre estos ecotipos ya se ha desarrollado un aislamiento reproductivo prezigótico en la zona media, aunque no existe evidencia de aislamiento postzigótico.

En este estudio evaluamos el aislamiento reproductivo postzigótico así como la base hereditaria de la variabilidad morfológica. Se aislaron individualmente 30 hembras del ecotipo de la parte alta (RB), la mitad de ellas en presencia de machos del ecotipo de la parte alta (RB), mientras la otra mitad se pusieron con el mismo número de machos del ecotipo de la parte baja (SU). Cada 10-30 días se cambiaron los machos de todos los tratamientos, con el fin de asegurar optimas condiciones de fertilización. Al final del periodo experimental se cuantificaron las diferencias en fecundidad-fertilidad entre hembras de ambos tratamientos. En otra serie de experimentos se aislaron hembras fecundadas en el campo, así como cruzamientos en el laboratorio a partir de un macho y una hembra, a partir de los cuáles se ha podido estimar la heredabilidad para diferentes caracteres.

8 / 33

VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA MULTILOCUS DE POBLACIONES DE *AVENA BARBATA* DE ARGENTINA

Guma, Rosana y García, Pedro
Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León, España

Avena barbata Pott ex Link es una gramínea anual, predominantemente autógama, tetraploide, originaria de la zona circunmediterránea. Esta especie fue introducida en América durante la colonización española y se encuentra distribuida en zonas templadas.

Estudios ecogenéticos realizados en poblaciones de *A. barbata* procedentes de España y California han demostrado que esta especie se ha diferenciado en numerosos ecotipos caracterizados por combinaciones alélicas multilocus específicas y distribuidos geográficamente en relación con parámetros ambientales, pero hasta el momento no se posee información sobre la variabilidad y estructura poblacional de esta especie en América del Sur. En tal sentido, se inició el estudio de la estructura genética de 39 poblaciones de *A. barbata* provenientes de diferentes regiones ecogeográficas de Argentina, a través del análisis de 14 loci isoenzimáticos.

Los resultados obtenidos indican que las poblaciones presentan un nivel de similitud alto, que en general no se encuentra relacionado con el origen geográfico de las mismas. En el total de las poblaciones fueron halladas 118 asociaciones multilocus diferentes, pero se ha observado la existencia de una asociación mayoritaria. Se han encontrado genotipos locus a locus ya descritos para las poblaciones españolas, sin la aparición de alelos ni genotipos nuevos. Sin embargo, las asociaciones multilocus más frecuentes en las poblaciones españolas de *A. barbata*, no coinciden con las observadas en la mayoría de los individuos de las poblaciones argentinas analizadas hasta el momento.

8 / 34

ESPECIACION HIBRIDA EN EL GENERO *Berberis*: UN ENFOQUE ISOENZIMATICO.

Bottini María Cecilia J. [(1)], Prémoli Andrea C.[(2)] y Poggio Lidia [(1)].
[(1)]Univ. de Buenos Aires - CIGen, C.C. 4 (1836) Llavallol Argentina, [(2)] Univ del Comahue, Lab Ecotono, Bariloche. email: michayhue@hotmail.com

La especiación híbrida es el orígen de nuevas especies a partir de un híbrido natural siendo una parte esencial de los mecanismos de estabilización del comportamiento reproductivo de los híbridos. Estudios morfológicos, citogenéticos y bioquímicos permitieron postular los modos de especiación en diferentes especies de *Berberis* L. (Berberidaceae) del NW de la Patagonia argentina.

Se analizaron isoenzimáticamente 31 poblaciones de *B. linearifolia, B. bidentata, B. darwinii, B. buxifolia, B. heterophylla* y *B. parodii*. Se estudiaron 5 enzimas (Aco, Idh, Pgi, 6Pgd, Sdh) que suministraron información para 9 loci enzimáticos.

Especiación Híbrida Diploide: estudios morfológicos en *B. bidentata* Lechl., *B. darwinii* Hook. y *B. linearifolia* Phil., todos con 2n=28, sugieren que *B. bidentata* sería una especie híbrida originada a partir de *B. linearifolia* y *B. darwinii*. Los estudios isoenzimáticos muestran un alto valor medio de identidad genética (I=0.92) con sus putativos padres y un valor de 0.88 entre los progenitores.*B. bidentata* crece en ambientes disturbados siendo común la reproducción vegetativa.

Especiación Poliploide: las isoenzimas de *B. heterophylla* Juss. y *B. buxifolia* Lam., ambas con 2n=56, y de *B. parodii* (2n=28) mostraron que es un grupo de especies con un muy alto grado de identidad (I=0.97-0.99). Las similitudes morfológicas entre las especies en las zonas de contacto, la presencia de multivalentes en meiosis en ambos poliploides, la evidencia de zonas híbridas entre *B. heterophylla* y *B. buxifolia* y la prevalencia de propagación vegetativa sugeriría que las tres especies constituyen un complejo poliploide.

8 / 35

UTILIDAD DE LOS MARCADORES RAPD-PCR EN LA IDENTIFICACIÓN TAXÓNOMICA DE INSECTOS PLAGAS

Ochando M.D., Callejas C., Fernández M.P., Segura D.
Departamento Genética. Fac. CC. Biológicas. Universidad Complutense. 28040-Madrid.

Uno de los más importantes retos en los programas de control integrado de plagas lo constituye la detección e identificación de especies y biotipos o razas, así como la monitorización de sus movimientos (flujo genético, colonización,….). Actualmente, el enorme desarrollo adquirido por las técnicas moleculares nos pueden proporcionar marcadores moleculares lo suficientemente sensitivos para abordar ese tipo de problemas. Y en concreto, la metodología RAPD-PCR ha evidenciado ser una de las más útiles en el campo de la identificación y taxonomía.

En el presente trabajo hemos aplicado la técnica de amplificación al azar de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) en conjunto con cortos cebadores de secuencia conocida para detectar posibles marcadores diagnóstico (especie-específicos) en cuatro especies de insectos plagas (*Ceratitis capitata, Bactrocera oleae, Bemisia tabaci* y *Lyriomiza huidobrensis*).

Hemos utilizado cuatro diferentes cebadores, de 10 nucleótidos de longitud, y con todos ellos hemos observado bandas invariables en las especies estudiadas. Marcadores que, en principio, pueden considerarse diagnóstico para las especies estudiadas (a falta de comprobar su ausencia en especies próximas). Se detectaron un total de 8 bandas diagnóstico para *C. capitata*, 10 para *B. oleae*, 10 para *B. tabaci* y 6 para *L. huidobrensis*.

En definitiva, los marcadores RAPDs se han revelado extraordinariamente útiles desde el punto de vista de la taxonomía e identificación en las especies en estudio. Con las evidentes ventajas de su aplicación en laboratorios de cuarentena, y en el posible seguimiento de los movimientos de esas plagas en los trabajos en sistemas de control integrado.

8 / 36

ANÁLISIS GENÉTICO DE OCHO ESPECIES DE ESPÁRIDOS CON DISTRIBUCIÓN ATLÁNTICO-MEDITERRANEA.

Alarcón, José Antonio; Porta, Javier; Alvarez, Mª Carmen.
Dpto. de Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga
CP 29071, MÁLAGA, e-mail: Alvarez@uma.es

El éxito conseguido en el cultivo de la dorada (*Sparus aurata),* ha despertado interés por domesticar otras especies de espáridos con valor comercial, asi como por producir híbridos interespecíficos. Para ello es de interes conocer la relación filogenética existente entre ellas. En el presente estudio se ha realizado un análisis genético poblacional de 8 de las especies con mayor valor comercial: *Sparus aurata, Dentex dentex, Pagrus pagrus, Pagellus bogaraveo, Lithognathus mormyrus, Diplodus sargus, Diplodus puntazzo* y *Spondyliosoma cantharus*. Las muestras estudiadas cubren un amplio rango de las respectivas áreas de distribución, incluyendo las costas atlánticas de Portugal y España y las mediterraneas de España, Italia y Grecia. Se utilizaron marcadores alozímicos, habiendo revelado 24 loci en cada una de las especies.

El análisis estadístico de la variabilidad alozímica intraespecífica reveló que no existen signos de heterogeneidad geográfica significativa entre las poblaciones atlánticas y mediterraneas en 3 de las especies (*S. aurata, P. pagrus y D. sargus*). Las especies donde las diferencias entre poblaciones son mas acusadas son *D. dentex* y *L. mormyrus* donde algunos loci mostraron alelos diferentes fijados a ambos lados del estrecho de Gibraltar, indicando una total ausencia de flujo genético entre los dos mares. La estructuración poblacional dentro del Mediterraneo ha sido tambien estudiada.

Con los datos de distancias genéticas se ha elaborado un arbol filogenético, donde en general se mantienen las relaciones de afinidad entre especies en base a los criterios de sistemática convencional. En cambio situan a *dorada* y *pargo*, en posiciones muy distantes, a pesar de haber sido consideradas por algunos autores como pertenecientes al mismo género.

8 / 37

RELACIONES FILOGENÉTICAS CON MARCADORES MOLECULARES EN CENTENOS (*SECALE CEREALE* L.) PORTUGUESES

Matos, M., Pinto-Carnide, O., Carnide, V., Guedes-Pinto, H., Benito,C.

Departamentosde Genética, Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro. 5000-Vila Real, Portugal, Universidad Complutense de Madrid 28040-Madrid, España.

email=cebe8183@eucmax.sim.ucm.es

Se han analizado las relaciones filogenéticas en 10 cultivares de centeno (Secale cereale L.) en su mayoría procedentes del Norte de Portugal (Trás-os-Montes).

Para llevar a cabo este trabajo se han empleado distintos tipos de marcadores moleculares: isoenzimáticos, intermicrosatélites e interminisatélites. En total se han estudiado 20 loci isoenzimáticos, 10 oligonucleótidos con secuencias de microsatélites (ISSRs) y 10 oligonucleótidos de 10pb de longitud a temperaturas altas de anillamiento
(interminisatélites).

Los datos isoenzimáticos indican que las relaciones filogenéticas obtenidas coinciden, en general, bastante bien con el origen geográfico de los cultivares mantenidos por los agricultores en el Norte de Portugal. Sin embargo, en el caso de los cultivares procedentes de selección, sintéticos o de cruzamientos, los resultados parecen apuntar que en poco tiempo pueden haberse diferenciado mucho de sus parentales. Igualmente, las relaciones filogenéticas obtenidas para un cultivar de Brasíl indican que podría proceder del Norte de Portugal.

Los resultados encontrados con los diferentes tipos de marcadores moleculares se han comparado y se discuten teniendo en cuenta el tipo de secuencias que representan.

8 / 38

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS MICROBIANOS EN LA POLILLA DE LAS CRUCÍFERAS

Ferré Juan, Granero Francisco, Ballester Victoria.
Departament de Genètica, Universitat de València, Burjassot (Valencia)

Los insecticidas microbianos utilizados más ampliamente son, sin duda, los basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis*. La única especie que se conoce que ha desarrollado niveles de resistencia considerable en campo es la polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella*). El objetivo del presente trabajo ha sido determinar si la resistencia encontrada en distintas poblaciones es debida al mismo gen que se ha extendido por migración, o si por el contrario, las poblaciones difieren en cuanto al mecanismo de resistencia, lo que sugeriría la existencia de un gen con varios alelos o más de un gen. Para ello hemos seleccionado cuatro poblaciones, una de Hawai, una de Pensilvania, una de Filipinas y una de Malasia.

En las cuatro poblaciones encontramos la modificación de uno de los sitios diana de la membrana epitelial del intestino de la larva, de manera que la toxina Cry1Ab no puede unirse a ella y, por tanto, ejercer su activiada tóxica. La unión de Cry1Ac también se encontró impedida en las poblaciones de Hawai y Pensilvania, sin embargo, tanto en la población de Filipinas como en la de Malasia su unión no se vió alterada con respecto a una cepa salvaje susceptible. Como las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comparten el mismo sitio de unión, los resultados sugieren que existen al menos dos modificaciones distintas de dicho sitio. Las poblaciones de Filipinas y de Malasia, que solo poseen alterada la unión de Cry1Ab, deben poseer otro gen o genes responsables de la resistencia a Cry1Ac.

8 / 39

RECURSOS GENÉTICOS: VARIABILIDAD EN POBLACIONES ESPAÑOLAS DE *FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB.

López Díaz, J. E. & Oliveira Prendes J. A.
Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Apdo. 10. 15080 A Coruña.

Se caracterizaron en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) 25 poblaciones naturales de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) recolectadas en forma de semilla en diversas localidades del norte de la Península Ibérica y pertenecientes a la colección de recursos genéticos que se conserva en el Centro. El ensayo se estableció en la primavera de 1998, consistiendo en dos bloques completos al azar en cada uno de los cuales se dispusieron las plantas en líneas de 10 individuos por cada población. En cada planta individual se midieron los crecimientos de otoño, invierno y primavera, y se compararon con los crecimientos de tres variedades comerciales. Sólo 17 de las 25 poblaciones se tuvieron en cuenta en el estudio debido a la pérdida de plantas. El análisis de varianza siguiendo un modelo de efectos fijos reveló diferencias significativas para el factor población en los tres periodos de crecimiento. Las poblaciones en general presentaron mejores crecimientos y una mayor variabilidad que las variedades. Las producciones medias estimadas por planta en las poblaciones para los crecimientos de otoño, primavera e invierno fueron respectivamente 11 g, 34 g y 105 g, y para las variedades de 8 g, 30 g y 94 g respectivamente. En general, los crecimientos relativos de poblaciones y variedades se conservaron durante los tres periodos de crecimiento.

8 / 40

ORIGEN DE LA VARIABILIDAD Y EVOLUCIÓN DE LOS ALELOS EN EL LOCUS MINISATELITE *HRAS1*

Vega Gliemmo, A., Ruiz Ponte, C., Carracedo Alvarez, A., Barros Angueira, F.
Unidad de Medicina Molecular. INGO. Hospital de Conxo. 15706 Santiago
Institución: Fundación INGO
email: apimlbar@usc.es

El locus minisatélite *HRAS1* está compuesto de 4 alelos "comunes", de alta frecuencia poblacional, y una veintena de alelos "raros". Se sabe que los alelos "raros" se generan a partir de alelos "comunes" cercanos en tamaño. La unidad de repetición del minisatélite *HRAS1* es de 28 pb, dos de las cuales son variables (en ambos casos: G/C). Estos polimorfismos G/C pueden estudiarse mediante la técnica PCR-MVR. El análisis mediante PCR de la variación interna de las unidades de repetición del minisatélite permite obtener códigos o secuencias MVR que identifican inequívocamente a cada alelo. A partir de dichas secuencias es posible inferir el proceso mutacional en línea germinal que ha dado lugar a los distintos alelos.

Se presenta en este trabajo un estudio poblacional a partir de 109 individuos gallegos sanos de la variación MVR del minisatelite *HRAS1*. Se analizan los patrones de variación MVR de cada uno de los alelos detectados y los mecanismos evolutivos más verosímiles para su formación.

El mecanismo teórico implicado en la evolución de algunos alelos puede inferirse de las secuencias MVR como consecuencia de eventos mutacionales sencillos. Sin embargo, en ciertos alelos otros mecanismos moleculares serían los implicados.

8 / 41

MUTATION RATE HETEROGENEITY IN THE mtDNA SECOND HYPERVARIABLE REGION (HVII)

Salas A, Lareu MV, Calafell F, Bertranpetit J y Carracedo A
Institute of Legal Medicine (University of Santiago de Compostela) C\ San Francisco s/n, 15705. Santiago de Compostela. La Coruña. Spain
e-mail: apimlang@usc.es

Variation in the human mitochondrial DNA (mtDNA) has been used to infer the origin of populations and migration patterns in history. mtDNA analysis has been focused mainly on the study of the first hypervariable region (HVI). In order to study the correlation between the first and the second hypervariable regions (HVII), we have analysed 71 individuals for the HVII region of a well-known west European population and we have used additional available HVII sequence information of other 19 European populations. Our results show a high concordance between the two hypervariable regions, not only at the variability levels but also in other phylogenetic aspects. Moreover, the study of the population structure through an AMOVA analysis shows the low level of heterogeneity in these European populations. Nevertheless, we have found same disagreement in those results related to the mutation rate in these regions, probably due to differences in the evolution pattern.

8 / 42

VARIABILIDAD PARA LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL PIÑÓN EN PINO PIÑONERO (*PINUS PINEA* L.)

Toledo Plá, M.J.[1], Alvarez Cabello, J.B.[1], Abellanas Oar, B.[2], Martín Martín, L.M.[1]
[1] Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.
[2] Departamento de Ingeniería Rural, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie cuya espontaneidad ha sido bastante discutida dentro del Mediterráneo pues ha sido frecuentemente cultivada desde antiguo para la recolección de piñas.

Tanto estudios polínicos como diferentes hallazgos en las series estratigráficas revelan la espontaneidad del piñonero en la parte oriental y occidental del Mediterráneo, asi como en las zonas intermedias italo-balcanicas.

En Andalucia encontramos tanto rodales naturales como procedentes de antiguas repoblaciones en las que no se controló la procedencia de la semilla. Con el fin de caracterizar la variabilidad genetica de dicha especie en Andalucía y tratando de identificar dicho carácter natural o de repoblación, utilizaremos las tecnicas de analisis de proteinas del endospermo del piñón (tejido haploide procedente del árbol madre).

En este estudio han sido analizadas las proteínas de reserva de piñones procedentes de 120 clones de pino piñonero de 20 localizaciones (o rodales) distribuidas por Andalucía. Estas proteínas han sido separadas mediante electroforesis en geles lineales de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Los resultados indicaron la presencia de un patrón de proteínas de bajo peso molecular (< 50Kd), en el cual se pueden distinguir hasta 4 zonas diferenciadas dentro de las cuales se han observado la presencia de bandas polimórficas. En cualquier caso, la mayor parte del patrón presenta una gran uniformidad entre los diferentes individuos analizados.

Los datos obtenidos han sido correlacionados con la distribución geográfica de la especie en Andalucía al fin de establecer las rutas de dispersión de la especie, así como la presencia de material no autoctono.

8 / 43

VARIABILIDAD DE *HORDEUM CHILENSE* MEDIANTE EL USO DE GLIADINAS COMO MARCADORES MOLECULARES

Atienza Peñas, S.G.[1], Giménez Alvear, M.J.[1], Martín Muñoz, A.[2], Martín Martín, L.M.[1]

[1] Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

[2] Departamento de Agronomía y Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

Se ha analizado una colección de 88 líneas de la especie *Hordeum chilense* Roem. et Schult. representativa de la variabilidad existente en su área de distribución. El trabajo se ha llevado a cabo mediante el análisis de las prolaminas monoméricas (fracción proteica equivalente a las gliadinas del trigo) con la técnica electroforesis desnaturalizante sobre geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Posteriormente, el estudio de las diferentes posiciones de bandas se llevó a cabo utilizando el programa informático *BioImage Whole Band Analyzer* combinado con la observación directa de los geles. Para realizar la agregación se utilizó el método de ligamiento medio entre grupos o algoritmo UPGMA (Unweigted Pair-Group Method, Arihmetic Average) en el que la distancia entre dos grupos es igual a la media de las distancias entre cada dos pares de individuos. Los resultados muestran una gran variabilidad entre las diferentes líneas estudiadas para las posiciones de bandas de prolaminas monoméricas apareciendo 68 patrones distintos en las 82 líneas con las que nos quedamos tras el descarte de 6 de ellas por diversos motivos. Además ninguna de las 42 posiciones de bandas encontradas resultó ser monomórfica. Como resultado del análisis de grupos se obtuvo un dendrograma en el que puede observarse cierta tendencia a que las líneas se agrupen por su latitud de origen. Se concluye que *H. chilense* es un importante reservorio de variabilidad para proteínas de almacenamiento, lo que podría ser de utilidad en la Mejora Genética de cereales.

8 / 44

POBLACIONES ESPAÑOLAS DEL GENERO *FESTUCA* : CARACTERIZACION Y EVALUACION

Gómez PJ, De la Cruz M[1], Ruíz J[2], Monte JV, Casanova C y Soler C.
Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología. INIA (SGIT). La Canaleja. Alcalá de Henares. 1) ETSI. Agrónomos. Madrid. 2) IMIA (CAM). Alcalá de Henares.

Los recursos fitogenéticos silvestres que incluyen las especies del género *Festuca* son de gran interés y vario.

En primer lugar, el género está siendo sometido a una profunda revisión taxonómica, y por otro lado, muchas de sus especies pueden ser utilizadas tanto en aspectos de jardinería y céspedes, como en forma de cubiertas vegetales para la protección de suelos alterados y suelos agrícolas sometidos a erosión.

Dado el estrecho parecido morfológico entre las especies, la clasificación de **Flora Europea** está siendo revisada actualmente, pero reduciéndola a un estudio morfológico más minucioso, acompa ado en algunos casos de estudios de microscopía electrónica. En el presente trabajo se hacen aportaciones a este tema utilizando marcadores moleculares de PCR (principalmente RAPDs). Para el estudio se han utilizado poblaciones silvestres espa olas pertenecientes a 5 taxones, entre los que se encuentran 3 endemismos: *Festuca rothmaleri* (Litard.)Markgr Dannenb, *F. rivas-martinezii* Fuente & Ortú ez, *F. curvif*olia Lag. ex Lang*e,* F. *trichophylla* (Ducros ex Gaudin)K. Richter y *F. heterophylla* Lam.

Además, se presentan los primeros resultados de la evaluación que se está llevando a cabo con estos materiales en orden a su utilización. Las observaciones realizadas se refieren principalmente a la capacidad tapizante o cubridora de suelos de las distintas poblaciones, a la duración de su ciclo de floración, capacidad de producír semilla y tolerancia a situaciones de estrés ambiental.

8 / 45

VIABILIDAD DE HEMBRAS HIBRIDAS EN CRUCES ENTRE HEMBRAS DE *DROSOPHILA SIMULANS* Y MACHOS DE *D. MELANOGASTER*. I. HALLAZGO Y CARACTERIZACION DE UN NUEVO GEN DENOMINADO *Shfr*.

Carracedo Cabanas Mª Carmen, Casares Guillem Pelayo, Asenjo Ferreiro Ana y Rodríguez Martínez David

Area de Genética, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, 33071 Oviedo

Como regla general, cruces entre hembras de *D. simulans* por machos de *D. melanogaster* producen únicamente machos estériles. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios trabajos que resaltan la aparición de hembras en la progenie, pudiendo llegar en algunos casos a alcanzar un cociente de sexos próximo a 1. En un estudio de aislamiento postcigótico entre varias poblaciones de las dos especies con diferente origen geográfico, encontramos gran variabilidad en la aparición de hembras en la descendencia de distintas poblaciones, destacando una población procedente de Israel (T) con valores máximos y otra procedente del norte de España con valores mínimos. A partir de estas dos poblaciones realizamos cruzamientos entre ellas estudiando el comportamiento de las hembras de la F_1, demostrando que la viabilidad de las hembras híbridas está determinada un sistema genético que ajusta a la segregación de un único gen dominante con un importante efecto de la temperatura, sin influencia citoplasmática ni materna y no es el *Lhr* (*Lethal hybrid rescue*), gen de caracteristicas similares descrito en *D. simulans.* El nuevo gen se denomina *Shfr* (*simulans hybrid females rescue*).

8 / 46

VIABILIDAD DE HEMBRAS HIBRIDAS EN CRUCES ENTRE HEMBRAS DE *DROSOPHILA SIMULANS* Y MACHOS DE *D. MELANOGASTER*. II. LOCALIZACION DEL GEN *Shfr*.

Carracedo Cabanas Mª Carmen, Casares Guillem Pelayo, Asenjo Ferreiro Ana y Rodríguez Martínez David

Area de Genética, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, 33071 Oviedo.

El gen *Shfr* (*simulans hybrid females rescue*) de *Drosophila simulans* rescata la viabilidad de la descedencia femenina procedente de cruces entre hembras de *D. simulans* y machos de *D. melanogaster*. Para localizar este gen hemos realizado en primer lugar un análisis de contribución cromosómica a partir de una población procedente de Israel, que presenta una alta proporción de rescate, y una cepa con los tres cromosomas mayores (X, II y III), los cuales están marcados con mutaciones recesivas. Sólo el cromosoma II tiene efecto en la viabilidad de las hembras híbridas indicando que el gen está localizado en este cromosoma. Posteriormente se construyeron líneas sintéticas cruzando la población de Israel con una cepa homocigota para 5 mutaciones recesivas que abarcan ambos brazos del cromosoma II. Cada línea lleva diferentes fragmentos de dicho cromosoma de la población en estudio y de la cepa marcadora. Los resultados permiten localizar el gen *Shfr* entre los marcadores *black* (2L- 43.0) y *pearly* (2R-74.0).

8 / 47

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *E. PANORMITANUS* PARL. VAR. *HISPANIUS* (BOISS.)

Nieto, Rosa María. Casanova, Carlos. Soler, Consuelo
Departamento de Mejora Genética y Biotecnología (La Canaleja). INIA. Alcalá de Henares, Madrid

Según la clasificación genómica de Löve, el género *Elymus* es el más extenso de la tribu *Triticeae.* Muchas de sus especies poseen buenas cualidades forrajeras, altas producciones, gran capacidad adaptativa y resistencia a enfermedades. Según Flora Europea, en España existen dos especies pertenecientes a este género: *E. caninus* (L.) y una variante de *E. panormitanus*, *E. panormitanus* Parl. var. *hispanicus* (Boiss.). En 1986, Talavera, basándose también en el estudio de caracteres morfológicos, le dio a esta variante el rango de especie, *E. hispanicus* (Boiss.) Talavera. Con el presente trabajo y mediante el uso de técnicas moleculares de PCR, se pretendió hacer aportaciones sobre la posición taxonómica de esta forma vegetal.

En el estudio se utilizaron poblaciones españolas de *E. caninus* y *E. hispanicus*, junto con formas de las especies: *E. panormitanus, Hordeum chilense, Pseudoroegneria spicata* y *P. geniculata* de otros paises, que comparten genomios con los *Elymus* españoles. En las reacciones de PCR se utilizaron 22 cebadores inespecíficos y 13 específicos. Los resultados se analizaron mediante el coeficiente de similitud de Jaccard y se expresaron en forma de dendrogramas.

Entre las poblaciones españolas de *Elymus* se observó cierto grado de variabilidad apareciendo siempre las poblaciones de la misma especie en el mismo subgrupo. Las separaciones entre las especies de *Elymus* estudiadas, están más en concordancia con la clasificación española de Talavera que considera *E. hispanicus* como especie diferente de *E. panormitanus,* que con la de Flora Europea que la considera una variante de esta última.

8 / 48

ANALISIS DE LA ESTRUCTURA GENETICA Y ASIGNACION RACIAL EN POBLACIONES DE CABALLOS DE ORIGEN CELTA MEDIANTE EL USO DE MICROSATELITES

J. Cañón, Mª. L. Checa, C. Carleos*, M. Vallejo, J. L. Vega, S. Dunner
Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid.
* Departamento de Estadística e Inv. Operativa. Universidad de Oviedo. 33071 Oviedo.

Con el fin de analizar la distribución de la variabilidad genética (entre y dentro de poblaciones) así como las relaciones entre 7 razas de caballos de origen Celta (Caballo Gallego, Asturcón, Losino, Pottoka, Jaca Navarra, Mallorquín y Menorquín) hemos utilizado la información que proporcionó la amplificación por PCR de 13 marcadores moleculares del tipo microsatélite, que en 541 individuos dieron lugar a 120 alelos diferentes, con un número medio por marcador de 9,2. En el análisis están incluidos 60 animales de la raza Pura Sangre Inglés. El valor de la heterocigosis observada y el número medio de alelos fueron más elevados en las poblaciones de caballos Atlánticos que en las razas de las Islas Baleares. El 8 % de la variabilidad genética total detectada es atribuida a diferencias genéticas entre las razas incluidas en este trabajo ($F_{ST} \approx 0.08$; $P<0.01$). Los árboles filogenéticos, basados en las distancias entre parejas de individuos considerados como UTOs (unidades taxonómicas operativas), reflejan un claro agrupamiento de dos razas (Astrucón y Losino) en el caso de las poblaciones Atlánticas, y en un cluster distinto, próximos al Pura Sangre Inglés, aparecen bien agrupados los animales de las razas de las isla Baleares (Mallorquín y Menorquín). La distribución espacial basada en un análisis de correspondencia muestra una clara discriminación en la distribución entre las razas Asturcón, Losina, Mallorquín y Menorquín y, entre estas y el resto de las poblaciones analizadas. La capacidad de discriminación del conjunto de los microsatélites utilizados fue analizada utilizando la distribución del LOD (logaritmo decimal del cociente de dos probabilidades condicionales) obteniéndose potencias (1 – probabilidad del error tipo II) superiores al 99 % para una valor de probabilidad del error tipo I de 0,05.

8 / 49

RESPUESTA FRENTE A LA SELECCIÓN CON LA TOXINA CRY1Aa DE *BACILLUS THURINGIENSIS* DE UNA CEPA DE *PLUTELLA XYLOSTELLA*.

González-Cabrera, J.[1], Ferré, J.[2]
[1]Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.
[2]Departament de Genètica, Universitat de València, Burjassot, España.

Los insecticidas biológicos basados en cultivos esporulados de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 han sido los más usados históricamente en la práctica agrícola mundial. En la actualidad el fenómeno de la aparición de resistencia se puede convertir en el principal freno para el uso de estos preparados. La selección para la resistencia de la polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella*) frente a las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac ha sido estudiada anteriormente; no ha sido este el caso de Cry1Aa, para la cual se propone que el gen de resistencia sea dominante en la población.

Nuestro propósito en este trabajo ha sido seleccionar con la toxina Cry1Aa una población de *P. xylostella* que ha desarrollado resistencia en campo a Dipel® (formulado comercial que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A). Se utilizaron concentraciones cercanas a la LC_{50} de cada generación. Al final del proceso se analizó la respuesta de la cepa seleccionada frente a Cry1Ab y Cry1Ac, que presentan una alta homología con Cry1Aa. Los cruzamientos realizados con la población sensible muestran el tipo de herencia que presenta el carácter de la resistencia en nuestra cepa.

8 / 50

VARIACIÓN EN EL ADN MITOCONDRIAL DE *Merluccius gayi.*

Vidal, R., Quinteiro, J., Izquierdo, M.y Rey-Méndez, M.
Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular. Facultade de Bioloxía. Universidade de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela.

La familia Merluccidae es un grupo complejo de teleósteos que incluye a los géneros, *Merluccius, Macruronus* y *Lyconus*. De estos géneros, *Merluccius,* es el que presenta la mayor diversidad de especies, las cuales están ampliamente distribuidas en los márgenes continentales de los océanos Pacífico y Atlántico.

Los estudios sobre la estructura poblacional de diferentes especies de merluzas han estado basados principalmente en aproximaciones ecológicas-pesqueras y en polimorfismo enzimático. Los recientes avances en técnicas moleculares, tales como PCR y secuenciación automática, ha permitido el desarrollo de nuevas aproximaciones moleculares para el estudio microevolutivo de diversos grupos de teleósteos. Se utilizaron secuencias del dominio izquierdo de la región control del ADN mitocondrial, para evaluar la estructura genética poblacional de la merluza chilena, *M. gayi gayi*. Asimismo, también se analizaron las relaciones evolutivas de esta especie con la merluza peruana, *M. gayi peruanus*.

Tras el alineamiento de las secuencias, fueron obtenidos 22 sitios polimórficos que definieron 18 haplotipos. Los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron 0,92 y 0,85% respectivamente. En ambas subespecies fueron detectados haplotipos idénticos. Los análisis de varianza molecular (AMOVA) y estadísticos basados en la frecuencia de haplotipos, indicaron que el mayor porcentaje de variación ocurre entre individuos dentro de poblaciones con un alto grado de flujo génico. Estos resultados sugieren que las distintas poblaciones de *M. gayi gayi* analizadas, conforman una sola unidad panmíctica, y que la clasificación de *M. gayi* en dos subespecies (chilena y peruana) puede no reflejar una división evolutiva histórica.

8 / 51

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *VITIS VINIFERA* FROM DOURO REGION

Costa, D.*, Monteiro, F. F.** and Guedes-Pinto, H.*
* Departamento de Genética e Biotecnologia, UTAD, Portugal
** Instituto de Ciências Biomédicas, UP, Portugal

In Trás-os-Montes e Alto Douro region is the most ancient and important area of vitiviniculture – The Demarcated Douro Region. Touriga Nacional, Touriga Francesa e Tinta Roriz are some of the *Vitis* varieties cultivated in this region and are considered as very good varieties. Therefore they are one of the aims of Clonal Selection of Vitis National Program study and of this work.

The knowledge of genetic variability and molecular identification of the different varieties of *Vitis vinifera* is important because not only alows the formulation of hypothesis about their origin, evolution and age but also permits to know the material available for clonal and massal selection.

In this study the technique of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used; after the extraction and quantification of the DNA, amplifications with arbitrary primers were done. Gels containing 10g/l agarose in TBE buffer were used to separate amplification products and these were detected and photographed under ultraviolet light.

Different patterns were obtained for the different varieties and clones which confirms that there is genetic variability between them.

This method showed how it is useful in *Vitis* characterization as well as in distinguishing different varieties and clones, sometimes difficult with other methods.

8 / 52

EVOLUCIÓN DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA DE DROSOPHILA

Atrian, S.[1]; Fibla, J.[2]; Benach, J.[3]; Ladenstein, R.[3] y Gonzàlez-Duarte, R.[1]

[1] Dep. de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona. [2] Dep. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida. [3] Center for Structural Biochemistry, Karolinska Institutet-NOVUM, Huddinge, Suecia.

El sistema alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Drosophila* ha sido paradigmático en los estudios de evolución molecular y selección natural. La reciente descripción de la estructura tridimensional de la ADH ha permitido abordar la relación estructura/función para explicar los aspectos adaptativos y evolutivos derivados de substituciones de aminoácidos en esta proteína. En primer lugar, se ha determinado la estructura 3D de la ADH de *D.lebanonensis*, y sobre ésta se han elaborado modelos moleculares para tres alelomorfos de la espécie *D.melanogaster:* ADH^S, ADH^F, y ADH^{UF}. Se ha estudiado la correlación entre arquitectura molecular, potencial electrostático y energía de enlace del coenzima con la eficiencia catalítica, y se ha valorado el efecto adaptativo de las correspondientes substituciones de aminoácidos. La comparación entre formas antiguamente divergentes (*D.lebanonensis*-*D.melanogaster*) y recientemente divergentes (alelomorfos de *D.melanogaster*, y también *D.simulans*) ha permitido describir dos estrategias distintas de evolución molecular. En el primer caso, los cambios afectan toda la molécula, si bien se agrupan en la superfície exterior de los elementos de estructura secundaria, y no en bucles o regiones de conexión. En el segundo caso, los cambios aminoacídicos no causan alteraciones estructurales que afecten la eficiencia catalítica, sinó alteraciones en el carácter electrostático del sitio activo que modifican considerablemente la velocidad de la reacción de oxidación llevada a cabo por esta enzima.

8 / 53

ATRACTIVO SEXUAL Y RECEPTIVIDAD EN HEMBRAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Casares Guillem Pelayo, Piñeiro Belloso Rafael, Carracedo Cabanas Maria del Carmen

Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo

En *Drosophila melanogaster* se han encontrado diferentes compuestos cuticulares que funcionan como feromonas y determinan el "atractivo sexual" de las hembras. El "bouquet" de las hembras estimula a los machos, quienes responden dirigiendo a las mismas un intenso cortejo sexual. Estos compuestos afrodisiacos muestran variación interpoblacional tanto en cantidad absoluta como relativa. Se ha demostrado que el apareamiento está influido tanto por el "atractivo sexual" de las hembras como por su receptividad o tendencia a aceptar al macho. En el presente trabajo demostramos que el éxito en el apareamiento en *D. melanogaster* depende principalmete de la receptividad de la hembra, por lo que resulta inútil pretender deducir el comportamiento sexual de una cepa, línea o población en base a la composición de feromonas que presenta.

8 / 54

EL TEST DE ELECCION MULTIPLE Y LA DETECCION DE AISLAMIENTO SEXUAL INTRAESPECIFICO EN DROSOPHILA

Casares Guillem Pelayo, Jamart González José Antonio,
Carracedo Cabanas María del Carmen
Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina.
Universidad de Oviedo

La presencia de un incipiente aislamiento sexual intraespecífico entre poblaciones, líneas de selección, líneas endogámicas, mutantes, etc., de *Drosophila*, viene realizándose, desde los años 40, por los denominados “tests de elección”. El más comúnmente utilizado es el “test de elección múltiple” que consiste en examinar la frecuencia de los tipos de emparejamiento que ocurren entre los dos genotipos, cepas, líneas o poblaciones que se examinan. Hemos demostrado que si los participantes en el test difieren en la propensión relativa al apareamiento, los resultados pueden interpretarse equivocadamente como un incipiente aislamiento sexual. Es así posible que algunos resultados publicados sugiriendo aislamiento sexual sean erróneos.

workshop
tendencias actuales en la genética bacteriana

FASE ESTACIONARA EN BACTERIAS: COMPORTAMIENTO GASP

Antonio Tormo Garrido.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I.
Universidad Complutense de Madrid.

El ciclo vital de *Escherichia coli* (y en general el de bacterias) es una alternancia entre la fase de crecimiento o exponencial y la fase estacionaria. Esta alternancia es función de la presencia/ausencia de nutrientes, llegandose a definir el ciclo bacteriano como una sucesión de cortos períodos de banquete y largos períodos de ayuno. La respuesta bacteriana a la escasez nutricional es muy variable, desde diferenciaciones complejas como la esporulación hasta el desarrollo de mecanismos fisiológicos para hacer frente al estrés medioambiental.

Durante la fase estacionaria, en contra de lo supuesto, es un proceso dinámico en el que ocurren variedad de procesos fisiológicos, morfológicos y genéticos que llevan a la célula a adaptarse a un medio agotado en nutrientes. Se produce una reducción del tamaño celular, adquiriendose una forma redondeada. La composición lipídica de la membrana varia, con transformación de los ácidos grasos insaturados en derivados ciclopropílicos. Se produce una disminución en la concentración de fosfolípidos. El citoplasma sufre condensación y el periplasma aumenta de volumen. La síntesis global de proteínas y de RNA se reduce. Los cambios topológicos que ocurren en el DNA contribuyen a aumentar la estabilidad de éste, con variación en la densidad de superenrollamiento e interacción con la proteína Dps.

En la fase estacionaria se produce la entrada en actividad de un factor sigma alternativo, el factor s^s (codificado por el gen *rpoS*). Como consecuencia, se produce la expresión de un conjunto de genes que se encontraban inactivos durante la fase exponencial. Además del producto del gen *rpoS* otras moléculas intervienen en la regulación de la expresión y supervivencia durante la fase estacionaria, como son, entre otras, las proteínas codificadas por los genes *dnaK*, *surA*, surB .

Los mecanismos que controlan la expresión y actividad de *rpoS* son todavía relativamente desconocidos. Es posible que se produzca una regulación transcripcional positiva mediada por guanosina tetrafosfato (ppGpp), como consecuencia de una disminución en la concentración intracelular de aminoácidos. Ciertos ácidos débiles como el ácido benzóico, acético y propiónico parecen inducir la expresión de *rpoS*. Se produce una regulación transcripicional negativa modulada por AMP_c-CRP. El RNA producto del gen *dsrA* interviene en una regulación traduccional a través de una interacción con la región 5' del mRNA que conduce a un bloqueo del lugar de unión al ribosoma. Finalmente, se produce una regulación post-traduccional mdulada por la proteasa ClpXP que reconoce una determinada región de RpoS.

RpoS controla la expresión durante la fase estacionaria de más de 30 genes cuyos productos intervienen en procesos tales como cambios en la morfología y división

celular, adquisición de resistencia frente a agentes oxidantes, osmolaridad e irradiación. La expresión del regulón RpoS produce cambios en las características patogénicas de diversas enterobacterias, síntesis de microcinas, etc. Esta respuesta global y dependiente de RpoS conduce a *E.coli* a la adquisición de resistencia frente a diversas agresiones ambientales y a la adaptación a un ambiente agotado.

Un fenómeno recientemente descrito es el comportamiento GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*). Durante la fase estacionaria surgen espontáneamente ciertos mutantes que desplazan a la población original durante la fase estacionaria. La muerte de la población causa la liberación de nutrientes que pueden ser utilizados por los mutantes para su crecimiento y división. De manera similar, durante el crecimiento de la población desplazante aparecen nuevos mutantes que a su vez desplazarán a la población materna. Estos ciclos de mutación/crecimiento/desplazamiento continuan produciendose de manera indefinida llegando a la aparición de formas incapaces de crecer en medios ricos en nutrientes. Uno de los genes que intervienen en estos ciclos de muerte y crecimiento es el gen *rpoS* . Mutantes en este gen con fenotipo de disminución (no eliminación) de la actividad de la proteína RpoS presentan comportamiento GASP. El estudio de este fenotipo en diversas bacterias apunta claramente a la existencia de mecanismos no relacionados entre sí que ocasionan un fenotipo GASP.

Un aspecto particularmente interesante, inquietante, discutido y desconocido en sus bases moleculares son las mutaciones denominadas SIMS (*Selection Induced Mutations*). Durante la fase estacionaria en *E.coli* se producen mutaciones aparentemente como respuesta a la presión de selección impuesta.

La fase estacionaria es una fase dinámica en la que se superponen ciclos de muerte y crecimiento celular, adaptándose las células a un medio agotado y adquiriendo resistencia a diversas agresiones medioambientales. A la luz de este comportamiento podríamos definir la fase estacionaria no como tal sino como una fase cripto-logarítmica.

TOPOLOGÍA DEL DNA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS

Juárez, A. *, Nieto, J. M., Prenafeta, A., Miquelay, E. y Madrid, C.,
Departament de Microbiología. Facultat de Biología. Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

El DNA bacteriano presenta un estado de superenrollamiento variable. Sobre el mismo influyen factores tanto internos como externos a la célula. Entre los primeros, cabe citar a la transcripción o a la replicación. Entre los factores externos se encuentran la osmolaridad del medio, la presión parcial de oxígeno y la temperatura. Las topoisomerasas juegan un papel esencial, bien manteniendo constante el nivel de superenrollamiento cuando varian determinadas condiciones ambientales, o bien adecuandolo a nuevos niveles en respuesta a cambios ambientales de diferente índole.

Desde hace ya algunos años se conoce que existe una relación entre la topología del DNA y la expresión de ciertos genes bacterianos. Ejemplos de ello son los operones *his* y *leu* de *Salmonella typhimurim* (1, 2), los genes implicados en la capacidad de invasión de células epiteliales por parte del mismo microorganismo (3) o los propios genes que codifican para la topoisomerasa I (*topA*) (4) y girasa (*gyrA*, *gyB*) (5) de *Escherichia coli*. A pesar de ello, ha sido en la última década cuando, mediante el estudio de las denominadas proteínas "tipo histona" o, más propiamente, "asociadas a la cromatina" ha adquirido especial relevancia la relación entre el estado topológico del DNA y la regulación de la expresión génica en bacterias. Ello ha sido así fundamentalmente porque ha podido plantearse un modelo que explicaría el mecanismo por el que las bacterias, detectando ciertos estímulos ambientales, se adaptan a los mismos modulando la expresión de determinados genes.

A finales de los años ochenta y principios de los noventa, diferentes grupos de investigación identificaron una serie de mutaciones que afectaban a la expresión dependiente de temperatura o de osmolaridad de genes diferentes. La mutación *virR* fue identificada en *Shigella flexnerii* por su efecto desregulador dependiente de la temperatura de diferentes genes de virulencia (6). La mutación *osmZ* fue identificada por su papel desregulador de la expresión del operón *proU* de *Salmonella typhimurium* (codifica para un sistema de transporte de alta afinidad de la glicina betaína) dependiente de la osmolaridad (7). Finalmente, la mutación *drdX* fue identificada por su papel desregulador de la expresión dependiente de la temperatura de las fimbrias *pap* de *E. coli* (esenciales para la adherencia de las cepas uropatógenas al epitelio urinaro) (8). Una ulterior caracterización de los tres *loci* permitió demostrar que se trataba de alelos de un mismo gen, que codifica para la proteína asociada a la cromatina H-NS.

La proteína H-NS, con una masa molecular de 15, 6 kDa, es considerada como muy abundante en el citoplasma de *E. coli* (aproximadamente 20.000 copias/célula). Aún cuando puede unirse al DNA de forma específica en regiones que son ricas en AT y casi siempre incluyen secuencias curvadas de DNA, esta proteína es también capaz de

unirse al DNA sin mostrar especificidad de secuencia (9, 10). Mutantes *hns* presentan una elevada pleiotropía, siendo fenotipos característicos de los mismos la desregulación de la expresión dependiente de factores ambientales de determinados genes, alteraciones en la topología del DNA y modificaciones en la frecuencia de transposición de elementos de inserción.

El hecho de que mutaciones en el gen *hns* produjesen alteraciones en la topología del DNA llevó a plantear la hipótesis de que el mecanismo por el que H-NS influenciaba la transcripción era asociándose al DNA y modificando su topología. No obstante, esta hipótesis está hoy día en entredicho, ya que no todos los mutantes *hns* caracterizados presentan un efecto sobre la topología del DNA y, en cambio, siguen alterando la expresión de los mismos genes. Por otra parte, para algunos genes afectados por H-NS, existen regiones de alta afinidad de unión que se solapan con los propiuos promotores (*proU* y *rrnB* en *E. coli* y *virB* en *Shigella*). En estos ejemplos, se ha sugerido que el mecanismo de acción de H-NS sería impidiendo la interacción de la RNA polimerasa con el promotor, aún cuando no existen evidencias conclusivas de que, en estos ejemplos, H-NS actúe como un represor. Finalmente, en otros operones (operón *proU* de *S. Typhimurium* o *hns* de *E. coli*), parece ser que los lugares de unión de H-NS caen fuera de la región promotora. En estos ejemplos se ha propuesto que H-NS actuaría "silenciando" la transcripción modificando localmente la topología del DNA. De hecho, los diferentes modelos no son mutuamente exclusivos (9). En cualquier caso, una modificación de la transcripción mediada por H-NS a través de los cambios locales de la topología afectaría solamente a aquellos promotores dependientes de H-NS.

Además de H-NS, otras proteínas bacterianas asociadas a la cromatina tales como HU, IHF o FIS se asocian al DNA con mayor o menor grado de especificidad, facilitando la formación de estructuras curvadas (11). En todas ellas se acepta que puedan modular la expresión génica bien modificando la estructura del cromosoma o bien influyendo la arquitectura de promotores específicos.

Hace algunos años, se describió una nueva familia de proteína que, al igual que sucede con H-NS, participan en la modulación de la expresión génica en respuesta a cambios ambientales. Se trata de las proteínas Hha de *Escherichia coli* e YmoA de *Yersinia entericolitica* (12, 13). Estas proteína presentan un elevado grado de homología entre sí (82% de identidad) y parecen cumplir funciones equivalentes en *E. coli* y *Y. Enterocolitica*: modulación de la expresión génica en respuesta a cambios ambientales como la temperatura o la osmolaridad (13, 14). Adicionalmente, también a podido demostrarse que mutantes *hha* presentan alteraciones en la topología de plásmidos de referencia. Siendo dimilares los fenotipos de mutantes *hns* y *hha/ymoA*, se sugirió que las proteínas Hha e YmoA son también proteínas asociada a la cromatina.

Por lo que respecta a la proteína Hha, estudios de interacción de la misma con el DNA han podido confirmar que, tal como se presumía, la proteína Hha se une al

DNA. *In vitro*, la proteína Hha presenta propiedades de unión al DNA similares a las que presenta H-NS: es difícil poner de manifiesto la existencia de secuencias específicas de unión, requiriéndose una elevada concentración de proteína para poder detectar la formación *in vitro* de complejos DNA-proteína. Dentro del contexto del papel de la proteína Hha como modulador de la expresión génica, resultados obtenidos recientemente introducen un aspecto nuevo en referencia a la interacción de las proteínas asociadas a la cromatina con el DNA: en ensayos de interacción proteína-proteína realizados *in vitro*, ha podido ponerse de manifiesto que la proteína Hha se une a H-NS. Dicha unión resiste concentraciones de sal de hasta 0,5 M de KCl, lo que sugiere una fuerte interacción entre ambas proteínas. Esto ha hecho plantear un nuevo modelo, que contempla la interacción conjunta de las dos proteínas para modular la expresión génica. Teniendo en cuenta que ambas proteínas son moduladoras de la expresión de la toxina α-hemolisina en *E. coli* (14, 15), se ha utilizado como modelo el operón *hly* para obtener información acerca del papel del complejo Hha-H-NS. Ha sido posible poner de manifiesto que ambas son capaces de formar con el DNA complejos diferentes a los formados indvidualmente por cada una de ellas. Asimismo el análisis de mutantes *hha*, *hns* y *hha hns*, ha permitido poner de manifiesto que ambas proteína, probablemente mediante una directa interacción entre ellas, modulan la expresión del operón *hly* en respuesta a cambios en la osmolaridad y la temperatura.

Los resultados arriba referidos plantean la interacción proteína-proteína como un factor a tener en cuenta en las interacciones macromoleculares que tienen lugar entre las proteínas bacterianas asociadas a la cromatina y el DNA.

Referencias:

1. Pruss, G. J. & Drlica, K. (1985). *J. Bacteriol.* **164**, 947-949.
2. Trucksis, M. *et al.* (1981). *J. Bacteriol.* **147**, 679-691.
3. Galán, J.E. & Curtiss III, R. (1990). *Inf. Immun.* **58**, 1879-1885.
4. Menzel, R. & Gellert, M. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 1272-1278.
5. Tse-Dinh, Y.C. & Beran, R.K. (1988). *J. Mol. Biol.* **202**, 735-742.
6. Maurelli, A.T. & Sansonetti, P.J. (1988). *PNAs* **85**, 2820-2824.
7. Hulton, C.S.J. *et al.* (1990). *Cell* **63**, 631-642.
8. Göransson, M. *et al.* (1990). *Nature* **344**, 682-685.
9. Atlung, T. & Ingmer, A. (1997). *Mol. Microbiol.* **24**, 7-17.
10. Williams, R. M. & Rimsky, S. (1997). *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 175-185.
11. Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1997). *Ann Rew. Microbiol.* **51**, 593-628.
12. Nieto, J.M. *et al.* (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 1285-1293.
13. Cornelis, G.R. *et al.* (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 1023-1034.
14. Mouriño, M. *et al.* (1996). *Inf. Immun.* **64**, 2881-2884.
15. Nieto, J.M. *et al.* (1997). *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 39-44.

METILACIÓN DAM: UN MECANISMO DE MEMORIA DE LA CÉLULA BACTERIANA

Josep Casadesús [1], Joaquín Torreblanca [2], Eva M. Camacho [1], Silvia Marqués [3], David A. Cano [1], Graciella Pucciarelli [4] y Francisco García del Portillo [4]

[1] Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

[2] Institut für Genetik und Mikrobiologie, Universität München

[3] Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

[4] Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", UAM-CSIC, Madrid

El DNA de las Enterobacterias contiene pequeñas cantidades de 6-metil-adenina, que constituye un 0.5% del genoma. La formación postreplicativa de 6-metil-adenina es catalizada por la metilasa Dam, que metila la adenina de los sitios 5'-GATC-3'. La metilación Dam regula la iniciación de la replicación cromosómica (Boye y Løbner-Olesen 1990), el reparto de los cromosomas hijos (Ogden et al. 1988) y otras interacciones entre DNA y proteínas (Marinus 1996). Desde los años 80, también se conocen ejemplos de promotores sensibles a la metilación (Messer y Noyer-Weidner, 1988, Noyer-Weidner y Trautner 1993, Casadesús y Torreblanca 1996).

Regulación de la conjugación por metilación Dam:

Nuestro laboratorio ha diseñado un escrutinio genético para la búsqueda de loci regulados por metilación Dam. El ensayo se basa en el análisis de fusiones *lac* generadas por transposición de Mu*dJ* y detecta directamente genes regulados por metilación (Torreblanca y Casadesús 1996). Empleando este escrutinio, se descubrió un locus reprimido por metilación Dam, situado en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Torreblanca y Casadesús 1996).

La secuenciación de los bordes de la fusión *lac* reprimida por Dam indicó que el elemento Mu*dJ* se había insertado en un homólogo del gen *traB* del episoma F. La fusión fue reconstruida por recombinación homóloga (rescate alélico) en un fragmento de pSLT de sólo 9,5 kb, y ello permitió trabajar con plásmidos más pequeños y manejables que el plásmido de virulencia, que tiene 90 kb. El análisis de subclones indicó que todos los elementos necesarios para la regulación por metilación Dam se encontraban en una región de 4,5 kb situada corriente arriba de la fusión *traB1*::Mu*dJ*. La secuenciación de la región (EMBL AJ011572) reveló una alta homología con el operón *tra* del episoma F, con presuntas fases abiertas de lectura homólogas de los genes *traM, traJ, traY, traA, traL, traE, traK* y *traB*. También se encontró un presunto gen *finP* solapado con *traJ* (Torreblanca et al. 1999).

Mediante el análisis de fusiones *lacZ* construidas in vitro, se buscaron promotores regulados por metilación Dam en el operón *tra* de pSLT. Se observó que el promotor del gen *finP* era más activo en un fondo Dam$^+$. El efecto de la metilación Dam sobre la actividad del promotor *finP* es opuesto al detectado inicialmente en *traB*, y ello

encaja en el modelo de regulación que opera en F (Frost et al. 1994). El gen *finP* especifica un pequeño RNA antisentido que inhibe la traducción del RNA mensajero de *traJ* (Finlay et al. 1986). La proteína TraJ es el activador transcripcional del promotor *traY*, que gobierna la expresión de los genes *tra*. Por tanto, una disminución del nivel de FinP se traduce en un aumento en la expresión del operón *tra* (incluido *traB*). Si el gen *finP* es activado por metilación, en un fondo Dam$^-$ habrá menor cantidad de RNA FinP, y por tanto mayor traducción de TraJ. Ello desreprimirá el operón *tra*. Un dato que apoya este modelo es que una fusión traduccional *traJ::lac* sufre desrepresión en un fondo Dam$^-$ (Torreblanca et al. 1999).

Con los datos disponibles, el efecto de la metilación Dam sobre la transcripción de la región *tra* de pSLT puede ajustarse al siguiente modelo: en un fondo genético Dam$^+$, la metilación del sitio GATC situado en el módulo -10 del promotor de *finP* activa la transcripción. La activación podría ser directa (facilitando la unión de la RNA polimerasa) o indirecta (ej., impidiendo la unión de un represor). Al haber mayor cantidad del RNA antimensajero FinP, el RNAm de *traJ* se traduce con menor eficacia; por tanto hay menos proteína TraJ. Como ésta es un activador transcripcional del promotor P$_Y$, el resultado final es la inhibición de la transcripción del operón *tra*. En un fondo genético Dam$^-$ todo ocurre a la inversa: hay menor cantidad de RNA antimensajero *finP*, menor inhibición de la traducción del RNAm de *traJ*, mayor cantidad de proteína TraJ y por tanto mayor actividad transcripcional a partir de P$_Y$.

El modelo predice que la metilación Dam debería regular la conjugación. Experimentos de transferencia de F entre estirpes Dam$^+$ y Dam$^-$ han confirmado que la metilación Dam reprime la conjugación, tanto en *Salmonella* como en *E. coli*. El fenómeno se ha observado para tres plásmidos del grupo IncFI: F, pSLT y R100 (Torreblanca et al. 1999; Camacho et al., enviado). Nuestra hipótesis es que la regulación del gen *finP* por metilación Dam refleja la existencia de señales ambientales y/o fisiológicas que regulan la conjugación.

Función de la metilación Dam de *Salmonella typhimurium* en la patogénesis:

Experimentos de infección de ratones han indicado que los mutantes Dam$^-$ de *S. typhimurium* son avirulentos, tanto si se administran por vía oral como por vía peritoneal. La disminución de la virulencia debida a carencia de metilación es espectacular, y el fenotipo silvestre se recupera por complementación con un clon portador del alelo *dam*$^+$: por tanto, la asociación entre metilación y virulencia es inequívoca (García del Portillo et al., en prensa). Un rasgo inesperado es la persistencia (asintomática) de *Salmonella* en el hígado y el bazo de los animales infectados. Ello convierte a los mutantes Dam$^-$ de *S. typhimurium* en una vacuna ideal.

Dada la pleiotropía de las mutaciones *dam*, la relación entre metilación y virulencia no es obvia ni fácil de desentrañar. Ahora bien, ensayos en cultivo de tejidos han indicado que los mutantes Dam$^-$ de *S. typhimurium* tienen disminuida la capacidad para invadir células epiteliales. Como dicha capacidad está relacionada con la secreción de proteínas (Bowe et al. 1998, Hensel et al., 1998), hemos investigado si los mutantes Dam$^-$ de *S. typhimurium* presentaban defectos de secreción. Los patrones de secreción de proteínas son claramente diferentes en fondos genéticos Dam$^+$ y Dam$^-$, y los mutantes deficientes en metilación secretan menores cantidades de dos proteínas relacionadas con la invasión, InvJ y SipC . Además, ensayos en asas de íleon han indicado que los mutantes Dam$^-$ no son citotóxicos sobre las células M de las placas de Peyer (García del Portillo et al., en prensa). En conjunto, estos datos indican que la metilación Dam regula la virulencia de *Salmonella*.

Regulación de los patrones de metilación Dam:

La remetilación de determinadas dianas GATC puede regularse de dos formas: (i) mediante la unión de proteínas; (ii) mediante la formación de estructuras especiales en el DNA (ej. cruciformes). Dependiendo de su duración, el bloqueo de la remetilación de una diana tiene consecuencias diferentes. Si se limita a un breve lapso del ciclo celular mantiene el DNA en estado hemimetilado. Si dura más de una generación, origina la formación de DNA desmetilado. La existencia de dianas GATC hemimetiladas o desmetiladas en el cromosoma de *E. coli* ha sido descrita por Hale et al. (1994). En algunas de esas dianas, el estado de metilación varía según la fase de crecimiento y/o el medio de cultivo (Hale et al. 1994). Diversos indicios indican que lo mismo ocurre en *Salmonella*. La posibilidad de regular el estado de metilación de determinados sitios GATC plantea la posibilidad de que la célula los use como un mecanismo de memoria celular a corto plazo (Casadesús y Torreblanca 1996).

Referencias

Bowe, F., Lipps, C.J., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F., Kusters, J.G. Infect. Immun. 66: 3372-3377, 1998

Boye, E., Løbner-Olesen, A. Cell 62: 981-989, 1990

Casadesús, J. Torreblanca, J. En "Epigenetic mechanisms of gene regulation", editado por R. A. Martienssen, V. E. A. Russo y A. Riggs, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, págs. 141-153

Finlay, B. B., Frost, L. S., Paranchych, W., Willetts, N. S. J. Bacteriol. 167: 754-757, 1986

Frost, l. S., Ippen-Ihler, K., Skurray, R. A. Microbiol. Rev. 58: 162-210, 1994

García del Portillo, F., Pucciarelli, G., Casadesús, J. En prensa

Hale, W. B., van der Woude, M. W., Low. D. A. J. Bacteriol. 176: 3438-3441, 1994

Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vázquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. Holden, D. Mol. Microbiol. 30:

163-174, 1998

Marinus, M. G. En "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology", editado por F. C. Neidhardt et al. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1996. Págs. 782-791

Messer, W., Noyer-Weidner, M. Cell 54: 735-737, 1988

Noyer-Weidner, M., Trautner, T. A. En "DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance", editado by J. P. Jost and H. P. Saluz, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993. Págs. 39-108

Ogden, G. B., Pratt, M. J., Schaechter, M. Cell 54: 127-135, 1988

Torreblanca, J., Casadesús, J. Genetics 144: 15-26, 1996

Torreblanca, J., Marqués, S., Casadesús, J. Genetics 172: 31-45. 1999

INDUCCIÓN TÉRMICA DEL INICIO DE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN *ESCHERICHIA COLI*

Alfonso Jiménez Sánchez y Emilia Botello
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz.

El cromosoma de *E. coli* inicia la replicación en una secuencia específica de 258 pb denominada *oriC* que contiene todos los requerimientos necesarios para el inicio de la replicación que actúan en *cis*. En la última década se ha obtenido un conocimiento bastante detallado de los requisitos para el inicio de la replicación y de los pasos necesarios para llevarlo a cabo (Messer y Weigel, 1996; Marians, 1992). Por el contrario, muy poco es lo que sabemos sobre su control. Cualquier propuesta de un mecanismo de control debe satisfacer tres puntos esenciales: i) La señal de inicio, cualquiera que sea, debe ser cíclica y con la misma periodicidad que el ciclo celular, es decir que en cada ciclo celular debe tener lugar solamente una iniciación. ii) La iniciación debe darse a la vez en todos los *oriC* presentes. iii) En cada iniciación todas las copias presentes de *oriC* deben iniciar una sola vez. Los intentos para explicar el control del inicio de replicación dieron lugar a la hipótesis del requerimiento de un iniciador (Sompayrac y Maaloe, 1973) o a la de la dilución de un inhibidor (Pritchard et al., 1969) que dan explicación al primer punto. Ambos modelos adolecen de falta de explicación de algunos de los resultados más recientes. El punto ii), sin embargo, no ha recibido ninguna consideración en los modelos propuestos. Por el contrario, el punto iii) ha sido explicado convenientemente mediante el secuestro de *oriC* hemimetilado tras la replicación (Lu et al., 1994).

En trabajos previos realizados por nosotros para estudiar el control de la replicación encontramos mutantes de *E. coli* termosensibles en el número de copia del cromosoma (Guzmán et al., 1988). En ese mismo trabajo observamos que el cambio de la temperatura de incubación en estirpes silvestres, induce una replicación transitoria del cromosoma bacteriano (Guzmán et al., 1988; Jiménez-Sánchez et al., 1993). El estudio de esta replicación inducida por el estrés térmico nos ha llevado a la descripción de una replicación cromosómica con un control y requerimientos en el inicio diferentes de la replicación normal, a la que denominamos HIR (*heat induced replication*) (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

Cuando a un cultivo de *E. coli* creciendo exponencialmente se le incrementa la temperatura de incubación en 10 o más grados, se produce el inicio de nuevas replicaciones en un 15 a 80 % de los orígenes existentes. Esta proporción es directamente proporcional a la tasa de crecimiento, μ, y al incremento de la temperatura.

El análisis del inicio de esta replicación térmica muestra que se origina en *oriC* pero que, a diferencia de la replicación normal, no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni síntesis de proteínas, requisitos imprescindibles en el inicio de la replicación cromosómica normal; 20 min después de inhibir la actividad de la RNA

polimerasa con rifampicina o la síntesis de proteínas con carencia de aminoácidos, la activación térmica de la replicación continúa teniendo el mismo valor y disminuye a partir de este tiempo. También discrepa la replicación térmica de la replicación normal en requerir en el inicio la funcionalidad de las proteínas RNasa H y RecA.

La incubación de un cultivo exponencial durante breves períodos de tiempo a la temperatura elevada y en presencia de rifampicina antes de devolverla a la temperatura original, muestra que la inducción de HIR se lleva a cabo durante los primeros 30 minutos. Tiempos más largos de incubación a la temperatura elevada con el antibiótico no incrementa el número de inicios de replicación.

La inducción de HIR por el cambio de temperatura hizo pensar en la dependencia de esta nueva replicación con algunas de las funciones de choque térmico controladas por σ^{32}. Dado que la inducción del choque térmico requiere síntesis de RNA y de proteínas, podría ser suficiente para descartar esta implicación. Pero para estudiar esta posible relación de forma más detallada y distinguir entre el efecto de la expresión del gen *rpoH* y el efecto causado por el incremento de la temperatura de forma separada, estudiamos por un lado la replicación tras el incremento de la expresión de *ropH* sin cambio de temperatura, y por otro lado el efecto de una subida de la temperatura sin expresión de *rpoH*. El primer ensayo lo hicimos clonando al gen *rpoH* con el promotor de *lac*, induciendo su expresión con IPTG y cuantificando su expresión mediante la expresión de un gen *lacZ* controlado por un promotor de choque térmico P*groE*. El incremento de σ^{32} por adición de IPTG no afectó a ninguno de los parámetros de la replicación cromosómica a 30°C ni afectó a la replicación inducida por cambio de la temperatura. El segundo ensayo, para estudiar el efecto de una subida de la temperatura sin expresión de *rpoH,* lo realizamos por incremento de 10°C a un cultivo exponencial de un mutante *rpoH* nulo. La subida de la temperatura de incubación del mutante carente de σ^{32} indujo una HIR de características similares a las analizadas en las estirpes silvestres. Estos resultados demuestran que HIR no está afectada por ninguna de las funciones de choque térmico aunque la causa que origine a ambas sea la misma.

Estos resultados y el de que a doble incremento de temperatura se observa doble proporción de HIR nos llevan a concluir que la inducción de la replicación por el cambio de la temperatura debe tener una causa termodinámica más que un efecto fisiológico complejo. Dos interpretaciones pueden explicar estos resultados: una alteración de la estructura de *oriC* o una alteración en la fluidez de la membrana. La replicación normal de *oriC* requiere una alteración del estado topológico de esta secuencia y se conoce la sensibilidad de la apertura de las cadenas para la iniciación a modestos cambios en la estructura del DNA. El hecho de que no se requiera la actividad de la RNA polimerasa para iniciar HIR puede indicar que la actividad de esta enzima de separación de las cadenas del DNA puede ser sustituida por el efecto de la temperatura. Por otro lado, el estado crítico de la fluidez de la membrana y la interacción de los fosfolípidos ácidos requeridos para la actividad de DnaA en el

inicio de la replicación podrían ser modificados por el cambio de temperatura y explicar la HIR.

Cuando HIR tiene lugar en más del 20% de los orígenes existentes, lo que ocurre en los cambios de 10 grados en medios ricos y en medios mínimos con casaaminoácidos y con cambios de 20 grados en cualquier medio, esta inducción de la replicación fuera del control del ciclo celular conlleva el aumento de la relación DNA/masa a valores alrededor del doble de la concentración antes del cambio de temperatura. Este cambio de temperatura induce también un aumento del número de células por encima del crecimiento de la masa celular lo que lleva a una disminución del tamaño celular hasta un cuarto de su valor normal medido tanto en masa como en longitud celular a los 90 min aproximadamente, manteniendo sin alteración la cantidad de DNA por célula. Estos resultados indican que o bien el cambio de temperatura induce que las células se dividan antes de alcanzar el tamaño normal de división o que la inducción de una replicación extra conlleva a la señal que lleva a una división celular que será, consecuentemente, extra. Dado que esta división celular extra se da también en presencia de cefalexina y rifampicina podemos deducir que no requiere la funcionalidad de la proteína FtsI. Pasados aproximadamente 90 min tras el cambio de la temperatura de incubación a 41°C, durante los que tienen lugar una replicación fuera del control del ciclo y una división extra, las células alcanzan un aumento de la relación DNA/masa y una disminución del tamaño junto con el mantenimiento de la relación DNA/célula y continúan en crecimiento exponencial controlado, sin ulterior modificación de los parámetros del ciclo. Estos resultados indican que, tras el cambio de las condiciones del cultivo, el control del inicio de replicación se debe mantener con una masa de iniciación menor, sin afectar por ello al control del inicio de la replicación.

Referencias:

Botello, E. and Jiménez-Sánchez, A. (1997). A temperature upshift induces initiation of replication at *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. Molec. Microbiol. **26:** 133-144

Guzmán, E. C., Jiménez-Sánchez, A., Orr, E., and Pritchard, R. H. (1988). Heat stress in the presence of low RNA polymerase activity increases chromosome copy number in *E. coli*. *Mol Gen Genet* **212:** 203-206

Jiménez-Sánchez, A., Guzmán, E. C., and Botello, E. (1993). An approach to the control of the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Current Topics in Mol Genet* **1:** 33-48

Lu, M., Campbell, J. L., Boye, E., and Kleckner, N. (1994). SeqA: a negative regulator of replication initiation in *E coli*. *Cell* **77:** 413-426

Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Ann Rev Biochem* **61:** 673-719

Messer, W., and Weigel, C. (1996). Initiation of chromosome replication. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. 2 edit. Neidhardt, F.C. *et al*. (eds). Washington, ASM. pp. 1579-1601

Pritchard, R. H., Barth, P. T., and Collins, J. (1969). Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp Soc Gen Microbiol* **19:** 263-297

Sompayrac, L., and Maaloe, O. (1973). Autorepressor model for control of DNA replication. *Nature* **241:** 133-135.

AMPLIFICATION OF THE *ftsQAZ* GENES IN *ESCHERICHIA COLI*

Richard D'Ari and Daniel Vinella
Institut Jacques Monod (CNRS, Université Paris 7, Université Paris 6)
2, place Jussieu
F-75251 Paris Cedex 05, France

Growth of rod-shaped bacteria such as *Escherichia coli* takes place in two different modes: (i) lateral extension of the cylindrical portion of the rod, and (ii) formation, at midcell, of a septum, or cross wall, which becomes the new pole of each daughter cell. It is the elongation phase of growth that distinguishes bacilli from cocci, which grow and divide by pure septation. Septation requires a large set of specialised proteins, including the tubulin-like FtsZ, common to all bacteria. In *E. coli*, the elongation process specifically requires penicillin-binding protein 2 (PBP2). In rapidly growing wild type *E. coli* cultures, a block of elongation, brought about by inactivation of PBP2, results, surprisingly, in an arrest of cell division, although PBP2 is not required for septation[1]. Division in the absence of PBP2 activity is restored when the three cell division proteins FtsZ, FtsA and FtsQ are all overexpressed[1,2]. We took advantage of this observation to select for mutants that overproduce these proteins, in the hope of identifying regulators of cell division functions.

In *E. coli*, PBP2 can be inactivated either genetically, by mutations in the structural gene *pbpA*, or by the highly specific b-lactam mecillinam. We selected mutants that had become resistant to mecillinam through insertion of a mini-Tn*10* transposable element. Amongst 15 mutants isolated and characterised, 7 seemed to increase the FtsZ level, as judged either by quantitative immunoblot or by suppression of the *ftsZ84*(Ts) mutation (overexpression of the mutant FtsZ84 protein is known to confer temperature resistance[3]).

An increased pool of the nucleotide ppGpp is also known to restore cell division in the absence of PBP2 activity[4], although without increasing the FtsZ concentration[2]. Our 7 mutants, however, remained mecillinam resistant in the complete absence of ppGpp (in a Δ*relA* Δ*spoT* genetic background).

Curiously, 6 of the 7 insert mutants proved to be diploid for one, two or all three of the markers *thr*::Tn*10* (0.0 min), *leu*::Tn*10* (1.8 min) and *pro*::Tn*10* (5.6 min). These genes are all in the region of the *ftsQAZ* operon (2.2 min), and in 5 cases we showed that the mutants were in fact diploid for *ftsZ* as well. Large duplications would not be expected to be transducible by phage P1, which cannot package more than 2 min of DNA, yet in all cases mecillinam resistance was 100% cotransducible with the mini-Tn*10* insert.

All 7 of these insertions are unstable: cultures contain a low frequency of apparently wild type segregants (mecillinam sensitive, loss of the mini-Tn*10*). The insertions are stabilised in a *recA* genetic background, in which homologous recombination is

abolished. The diploidy and RecA-dependent instability suggested the presence of tandem duplications.

The chromosomal DNA adjacent to the 7 unstable inserts was cloned and the plasmids were partially sequenced to identify these regions. At least 6 of the mutants resulted from an event more complex than simple insertion. The picture that emerges is that in each mutant a specific region covering *ftsQAZ* has been duplicated, with the mini-Tn*10* located at the join. Transduction of the mini-Tn*10* introduces this join into recipient bacteria, where, by recombining with two resident chromosomes, it recreates the same duplication of recipient genes, as confirmed by genetic evidence.

Duplication of the *ftsQAZ* operon is not *per se* sufficient to confer resistance to mecillinam and restore cell division in the absence of PBP2 activity, as shown by the mecillinam sensitivity of strains harbouring an F′ plasmid (1 to 2 copies per chromosome) covering the *ftsQAZ* operon. However, the tandem duplication on the chromosome can lead to further amplification by unequal crossing over. In agreement with this interpretation, some cells were shown to harbour at least three copies of the *leu* operon, and mecillinam resistance requires RecA function (presumably to produced the unequal crossing over).

Our selection for strains overproducing the FtsZ, FtsA and FtsQ proteins is thus seen to have worked in 7 mutants out of 15. However, the mutants are not deregulated in *ftsQAZ* expression. Instead, each strain has a tandem duplication covering the *ftsQAZ* operon and permitting further amplification by unequal crossing over.

REFERENCES

[1]Vinella D., Joseleau-Petit D., Thevenet D., Bouloc P., D'Ari R. J. Bacteriol. (1993) 175:6704-6710.

[2]Navarro F., Robin A., D'Ari R., Joseleau-Petit D. Mol. Microbiol. (1998) 29:815-823.

[3]Wang X.D., de Boer P.A., Rothfield L.I. EMBO J. (1991) 10:3363-3372.

[4]Vinella D., D'Ari R., Jaffé A., Bouloc P. EMBO J. (1992) 11:1493-501.

9 / 01

GENES DE *MUCOR CIRCINELLOIDES* CONTROLADOS POR EL GEN REGULADOR DE LA CAROTENOGENESIS *crgA*.

Torres-Martínez, S., Quiles, M. D.,y Garre, V.
Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, Spain. storres@fcu.um.es

La luz es uno de los factores físicos que influyen en un mayor número de procesos en los seres vivos. Una o varias rutas de transducción de señales deben estar implicadas en las respuestas a la luz. Una de estas respuestas, presente tanto en eucariotas como procariotas, es la síntesis de carotenoides.

En *M. circinelloides,* como en otros hongos, la biosíntesis de carotenoides es inducida por luz azul. Recientemente, se ha aislado y caracterizado en nuestro laboratorio el gen *crgA,* que probablemente es un elemento implicado en la transducción de la señal luminosa. La introducción de copias adicionales del gen *crgA* o su eliminación provoca una alteración de la regulación de la carotenogénesis, evidenciada por una sobreacumulación de β-caroteno, tanto en la oscuridad como en la luz.

El objetivo del trabajo que se presenta es el estudio de genes regulados por la proteína CrgA. Mediante la técnica de *differential display* se han clonado los genes *cig1* y *cig2* (*crgA induced genes),* cuya expresión es inducida por la introducción de copias adicionales de *crgA.* Análisis de la expresión de estos genes, mediante *Northern*, ha confirmado esta inducción, así como la inducción de uno de ellos, *cig1*, por la luz. Este resultado sugiere que la proteína CrgA está implicada en la regulación de la transcripción de genes regulados por la luz, así como en otras rutas de regulación génica. El análisis de la secuencia de estos genes y la generación de mutantes en los mismos ayudará a comprender el papel de CrgA en la regulación génica.

9 / 02

crgA, UN REGULADOR NEGATIVO DE LA CAROTENOGENESIS EN MUCOR CIRCINELLOIDES

Torres-Martínez, S., Navarro, E., García Castillo, J., Lorca, J.M., Quiles, M.D., Garre, V., y Ruiz-Vázquez, R.
Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia. storres@fcu.um.es

El análisis molecular de la síntesis de carotenos en el hongo Mucor circinelloides ha permitido el aislamiento de un gen, crgA (carotenogenesis regulatory gene), implicado en la inducción por la luz de la síntesis de carotenos en dicho hongo. El gen crgA cifra una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta motivos estructurales propios de proteínas reguladoras, entre otros, un dominio RING-finger, una región acídica y dos regiones ricas en glutaminas. La introducción en la estirpe silvestre de M. circinelloides de copias adicionales del gen crgA, completas o truncadas en su extremo 3', provoca la sobreacumulación de ß-caroteno en la oscuridad, eliminando así el requisito de la luz para activar la biosíntesis de carotenos. El fenotipo constitutivo, provocado por la presencia de las copias adicionales de crgA, se observa también en estirpes mutantes afectadas en genes estructurales de la ruta de síntesis de carotenos, en cuyo caso se sobreacumulan los correspondientes productos intermediarios.

La expresión del gen crgA es estimulada por la luz. Además, la introducción de copias extras de crgA provoca la sobreexpresión del gen crgA endógeno en la oscuridad, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de autorregulación. Para realizar un análisis detallado de la expresión del gen crgA se ha desarrollado una sonda de promotores para M. circinelloides. Dicha sonda está basada en la expresión del gen uidA de Escherichia coli, que cifra la enzima ß-glucuronidasa.

El estudio de la función del gen crgA se ha abordado mediante la construcción de estirpes mutantes en dicho gen. El desarrollo de un sistema que facilita la sustitución génica ha permitido obtener mutantes en los que se ha eliminado, total o parcialmente, el gen crgA endógeno. El análisis del fenotipo constitutivo que muestran estos mutantes sugiere que crgA cifra una proteína que actúa comoregulador negativo de la síntesis de carotenos en la oscuridad. Partiendo de este supuesto, se presenta un modelo de regulación por la luz de la síntesis de carotenos en M. circinelloides que permite explicar estos y otros resultados obtenidos.

9 / 03

TOPOLOGIA DE LOS INTERMEDIARIOS DE REPLICACION

L. Olavarrieta-Scappini; M.L. Martínez-Robles; D.B. Krimer; P. Hernández y J.B. Schvartzman

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Centro de Investigaciones Biologicas (CSIC). Velázquez 144, 28006 Madrid.

Durante la replicación del DNA, los plásmidos circulares adoptan una topología que varía a lo largo del proceso, lo que dificulta significativamente su estudio. Con el fin de conocer la topología de intermediarios de replicación específicos, hemos clonado los 23 pares de bases que constituyen el terminador terE del cromosoma de E. coli entre los sitios EcoRI y HindIII o entre StyI y AvaII de pBR322. Las secuencias ter son reconocidas por la proteína TUS, y los complejos ter/TUS actúan como barreras polares para el progreso de las horquillas. Los intermediarios de replicación correspondientes se analizaron por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Los resultados indican que las horquillas de replicación iniciadas en el origen ColE1 del plásmido se detienen al llegar a terE dando lugar a la acumulación de un intermediario específico con una burbuja interna. La población de intermediarios acumulada no se detecta como una única señal discreta, sino como una serie de señales ordenadas como un collar de cuentas, que corresponden a estereoisómeros del intermediario acumulado con distinto grado de superenrrollamiento negativo. Los resultados obtenidos demuestran además que: a) los intermediarios de replicación acumulados pueden presentar nudos en la región ya replicada del plásmido; b) el Bromuro de etidio elimina el superenrrollamiento negativo e induce superenrrollamiento positivo, pero sólo en la región no replicada del intermediario acumulado; c) en presencia de Bromuro de etidio, los topoisómeros de intermediarios parcialmente replicados, y sólo éstos, muestran un comportamiento electroforético heterogéneo cuyas causas son hoy por hoy desconocidas.

9 / 04

INTERACCIONES MOLECULARES EN SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

Salinas, P., Martínez-Argudo, I., Martín Nieto, J., Maldonado, R. y Contreras, A.
División de Genética. Universidad de Alicante. Campus Universitario San Vicente. E-03080. Alicante

Las proteínas pertenecientes a las familias de los reguladores de los denominados sistemas de dos componentes están implicadas en transducción de señales en un gran número de procesos de interés en bacterias. Esta señalización implica fosforilación, que a su vez determina la activación del componente regulador de respuesta por el componente sensor o histidina quinasa.

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de estos sistemas de transducción de señales, estamos analizando, mediante el sistema del doble híbrido de levaduras, las interacciones que tienen lugar entre las proteínas NtrB y NtrC de Klebsiella pneumoniae, implicadas en la regulación del metabolismo del nitrógeno. El análisis implica la construcción de proteínas híbridas entre variantes de NtrB o NtrC y GAL4-AD o GAL4-BD. Las variantes de NtrB y NtrC incluyen distintos dominios individuales, combinaciones de estos dominios y variantes mutantes.

Los resultados obtenidos sugieren una fuerte interacción física entre ambas proteínas y aportan información sobre las interacciones entre el módulo transmisor de NtrB y el módulo receptor de NtrC, así como sobre el papel de otros dominios de estas proteínas en la comunicación de señales. Estos resultados abren una vía para el estudio de los determinantes implicados en la transducción de señales entre proteínas sensoras y reguladoras de los sistemas de dos componentes. La incorporación a estos análisis de otras proteínas homologas a NtrB y NtrC nos permitirá arrojar luz sobre la especificidad de estas interacciones, el fenómeno de comunicación cruzada ("cross-talk") y sobre las posibilidades de explotar esta información para la búsqueda de inhibidores de estos sistemas de comunicación fundamentales en bacterias.

9 / 05

RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCION EN NtrB. ANALISIS MUTACIONAL

Martínez-Argudo, I., Martín Nieto, J., Maldonado, R., Salinas, P. y Contreras, A.
División de Genética. Universidad de Alicante. Campus Universitario San Vicente. E-03080. Alicante

La proteína NtrB, clave en el control del metabolismo del nitrógeno en enterobacterias, es miembro de la familia de proteínas de los sistemas de dos componentes, implicadas en transducción de señales. En función de los niveles de nitrógeno existentes, NtrB, una histidina quinasa bifuncional, promueve la fosforilación o desfosforilación de NtrC, el regulador transcripcional de los promotores ntr. NtrB posee homología en su región C-terminal (dominio "transmisor", aminoácidos 125-349) con otras histidina quinasas, implicadas en la detección de diferentes señales ambientales. Con el propósito de contribuir a la comprensión de la relación estructura-función en NtrB, hemos construido proteínas híbridas entre distintos segmentos de NtrB y los dominios activador y de unión a DNA de GAL4. La utilización del sistema del doble híbrido de levaduras nos ha permitido analizar tanto los determinantes de la dimerización en NtrB, que según nuestros resultados se localizan fundamentalmente en el dominio sensor, como otras interacciones moleculares entre distintas regiones de la proteína. Para definir los segmentos del gen ntrB a incorporar en las distintas construcciones hemos tenido en cuenta tanto información de secuencias de homólogos de NtrB como mutaciones previamente descritas. Los resultados obtenidos al analizar la expresión de los genes testigo HIS3 y lacZ en presencia de las distintas proteínas híbridas se discuten en relación con los posibles mecanismos moleculares por los que el componente sensor del par NtrB-NtrC altera su actividad en respuesta a estímulos específicos.

9 / 06

DOBLE HÍBRIDO Y ANÁLISIS DE INTERACCIONES ENTRE DOMINIOS DE NtrC

Martín Nieto, J., Maldonado, R., Martínez-Argudo, I., Salinas, P. y Contreras, A.
División de Genética. Universidad de Alicante. Campus Universitario San Vicente. E-03080. Alicante

En la respuesta metabólica a las cambiantes condiciones ambientales que encuentran las bacterias, juegan un papel fundamental las proteínas de los denominados sistemas de dos componentes, implicadas en rutas de transducción de señales. La proteína NtrC de enterobacterias, implicada en el control del metabolismo del nitrógeno y miembro "regulador de respuesta" del sistema NtrB-NtrC, es un activador transcripcional de promotores dependientes del factor σ54. Con el objetivo de contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la transducción de señales mediada por NtrC, hemos utilizado el sistema del doble híbrido de levaduras para poner de manifiesto interacciones moleculares entre distintos dominios estructurales de NtrC de Klebsiella pneumoniae. En Saccharomyces cerevisiae, la interacción entre las proteínas de fusión GAL4AD-NtrC y GAL4BD-NtrC reconstituye la actividad transcripcional de GAL4, induciendo la expresión de genes testigo. Además de esta interacción, que afecta a las subunidades del dímero NtrC, se han analizado interacciones entre distintos dominios de la misma subunidad. Para ello se han construido diversas fusiones génicas que permiten expresar los dominios N-terminal, central y C-terminal de NtrC de forma individual y en combinaciones de dos dominios. Los resultados obtenidos localizan los principales determinantes de la dimerización en el dominio C-terminal, confirman la validez de la aproximación experimental utilizada y nos permiten profundizar en la relación estructura-función de NtrC.

9 / 07

INSERCIONES CROMOSÓMICAS ADYACENTES A oriC AFECTAN AL CICLO CELULAR EN ESCHERICHIA COLI

Molina Rodríguez, Felipe, Alfonso Jiménez-Sánchez, Elena C. Guzmán
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura, Badajoz 06080.

En este trabajo se analizan los efectos de inserciones (Ω y Tn10) localizadas próximas al origen de replicación del cromosoma de E. coli, oriC, sobre los parámetros de ciclo celular. Estas inserciones causan una disminución de la velocidad de elongación de la replicación cromosómica (periodo C) y en el caso de la inserción de Tn10, además una disminución de la velocidad de crecimiento. Hemos encontrado que existe una relación inversa entre la velocidad de elongación y la distancia a oriC y que estos efectos son dependientes de la posición en el cromosoma, ya que las inserciones localizadas en otras regiones del cromosoma no afectan a los parámetros del ciclo celular.

El análisis de la frecuencia de marcadores muestra que en los mutantes con inserciones cerca de oriC hay una reducción general del movimiento de la horquilla de replicación a lo largo de todo el cromosoma. Por citometría de flujo se comprobó que en los mutantes no estaba afectada la sincronía de iniciación ni la relación DNA/masa.

Estudios recientes muestran que deleciones en los genes mioC y gid adyacentes a oriC no tienen ningún efecto en los parámetros de ciclo celular. En este trabajo se demuestra que la inserción de Ω o Tn10 en estos genes afecta al periodo C. De estos resultados concluimos que el fenotipo encontrado no se debe a la inhibición de la expresión génica de mioC y gid sino una alteración estructural introducida por las inserciones en el origen de replicación. Esto afectaría a la unión de proteínas requeridas para iniciar o bien a la curvatura del DNA introducida por otras proteínas dando lugar a un complejo de replicación alterado que se movería más despacio a lo largo del cromosoma.

9 / 08

MODIFICACIONES DEL CICLO CELULAR POR ESTRÉS TÉRMICO EN E. COLI

Botello Cambero, Emilia, y Jiménez Sánchez, Alfonso
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética.
Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura. 06080 Badajoz.

El ciclo celular bacteriano está constituido por una serie de procesos esenciales como son la replicación del cromosoma, el reparto del genoma duplicado y la división celular. Estos procesos están coordinados entre sí y con el crecimiento de la masa, teniendo lugar cíclicamente y una sola vez en cada duplicación de la masa. Así, durante un crecimiento celular equilibrado, hay parámetros en un cultivo que definen el ciclo y se mantienen constantes de generación en generación: masa/célula, DNA/célula, DNA/masa, orígenes/célula.

Trabajos previos, realizados por nuestro grupo de investigación, llevaron a detectar y caracterizar una replicación extra, fuera de control, que se induce por estrés térmico (HIR) (1, 2, 3). En el presente trabajo se analizan los ajustes que experimenta un cultivo de E. coli creciendo en diferentes medios al cambiar su temperatura de incubación de 30° a 41°C. Como metodología específica se utiliza citometría de flujo y microscopía. Los resultados más significativos indican que tras la subida de temperatura, las células inducen una replicación extra (HIR) de forma inmediata y transitoria, aumentando orígenes/célula de forma transitoria y DNA/masa permanentemente; reducen su masa como consecuencia de una división extra y mantienen así la relación DNA/célula. Un dato interesante es que esta división extra, inducida por aumento de temperatura, ocurre incluso en presencia de cefalexina, un inhibidor de la división celular. Tras un período de ajustes el cultivo alcanza un crecimiento equilibrado, manteniendo los nuevos parámetros. Se discutirán las implicaciones en los controles del ciclo celular.

1. Botello, E., and A. Jiménez-Sánchez. 1997. Mol. Microbiol. 26:133-144.
2. Guzmán, E. C., Jiménez-Sánchez, A., Orr, E., and R. H. 1988. Mol. Gen. Genet. 212:203-206.
3. Jiménez-Sánchez, A, Guzmán, E. C, and E. Botello. 1993. Current Topics in Mol. Genet. 1:33–48.

9 / 09

GENÉTICA DE LA PROLIFERACIÓN DE *SALMONELLA* EN CELULAS EUCARIÓTICAS

Cano, D. A.[1], Puciarelli[2], G., García del Portillo, F. [2], Casadesús, J.[1]

[1] Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

[2] Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Cantoblanco

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo, y puede multiplicarse en diversos tipos de células eucarióticas, tanto fagocíticas (macrófagos) como no fagocíticas (ej. células epiteliales). Como la capacidad de proliferación intracelular es un factor clave en la infección, la identificación de funciones bacterianas implicadas en la proliferación intracelular podría permitir el control de la infección mediante fármacos de diseño. Para identificar funciones implicadas en la proliferación de *Salmonella* en células eucarioticas usamos el análisis genético, combinando dos estrategias: (i) Búsqueda de mutantes de *S. typhimurium* con capacidad de proliferación intracelular alterada. (ii) Estudio de la proliferación intracelular en mutantes avirulentos de *S. typhimurium*. Esta segunda estrategia trata de discernir si un determinado mutante incapaz de causar fiebre tifoidea en el ratón está afectado en su capacidad para proliferar en uno o más tipos de células eucarióticas. Actualmente, nuestro trabajo se centra en: (i) Mutantes carentes de lipoamida deshidrogenasa, que muestran mayor capacidad de proliferación que el silvestre en determinados tipos celulares. (ii) Mutantes deficientes en metilación de adenina, que presentan defectos en la secreción de proteínas necesarias para la invasión. (iii) Mutantes deficientes en recombinación, que son incapaces de soportar el daño oxidativo cuando se encuentran en el interior de los macrófagos. Los mutantes RecA$^-$ son especialmente interesantes, ya que de las mutaciones *recA* no se conocen supresores. Por tanto, la proteína RecA podría ser una diana apropiada para inhibir la proliferación intracelular. Una ventaja adicional es la ausencia de homología entre la proteína RecA bacteriana y su equivalente eucariótico Rad51.

otras comunicaciones

10 / 01

ENFOQUE DE LA IMPLANTACIÓN DE PROGRAMAS DE GENÉTICA EN LAS FACULTADES DE ODONTOLOGÍA

AUGUSTO CLAVIJO, H.
Facultad de Odontología. Universidad El Bosque.
Santafé de Bogotá D. C.

La genética es una ciencia en continuo crecimiento y de evidente pertinencia. La genética actualmente se relaciona con temas muy diversos que van desde los estudios evolutivos y sus recientes enfoques moleculares hasta sus aplicaciones en las diferentes áreas de la salud. La naturaleza del progreso evidenciado en los diferentes campos de la genética en el área de la Odontología justifican la implantación de Programas de Genética en el Pregrado en la Facultades de Odontología como reflejo de la realidad científica, cultural y educacional. En los últimos años la genética como asignatura hace parte de algunos programas académicos de Pregrado en las Facultades de Odontología en Colombia y en el mundo y cada vez se incorporan más Facultades a esta realidad. En el presente trabajo se identifica la experiencia de la Facultad de Odontología de la Universidad el Bosque que ofrece desde hace dos años las asignaturas de genética básica y de genética clínica, en el pregrado, a sus estudiantes. Temas tratados incluyen, entre otros, tópicos relacionados con evolución, biología molecular del gen y el fenotipo adaptativo (curso básico) y síndromes genéticos (existe un importante número de enfermedades genéticas con compromiso oro-craneo-facial), diagnóstico pre-natal, proyecto del genoma humano y terapia génica (curso clínico). Así mismo, se realiza una integración transversal con diferentes asignaturas en donde se encuentran áreas relacionadas con la genética (odontopediatría, periodoncia, cirugía maxilo-facial, ortodoncia. etc.). Los métodos educativos incluyen la exposición, los seminarios, la implicación y la resolución de problemas, entre otros. Las implicaciones éticas, sociales, de atención del núcleo familiar en el asesoramiento genético y de salud pública justifican el enfoque bio-psico-social y cultural que tiene el Programa de Genética en la Facultad.

10 / 02

EXPRESION DE *KlHIS4* EN DIFERENTES CEPAS DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

Lamas Maceiras, M., Cerdán, E. y Freire Picos, M.A.
Area de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. Biol. Cel. y Mol.Univ. La Coruña.
Facultad de Ciencias, Campus da Zapateira s/n 15071. La Coruña.

El gen *HIS4* de *Kluyveromyces lactis* (*KlHIS4*) codifica para una proteína que presenta una homología del 81% con la codificada por su homólogo(*HIS4*) en *Saccharomyces cerevisiae*. La regulación transcripcional de este último responde a dos tipos de señales: a) en condiciones de carencia de un aminoácido en el medio se produce una activación transcripcional mediada por el factor Gcn4, y b) los factores Bas1 y Bas2 dan lugar a la activación en ausencia de limitación de aminoácidos. Ademas el factor Rap1 es impotante para los dos sistemas de regulación de *HIS4.* Los primeros análisis de *Northern blot* indicaron que en la cepa NRRL-Y1140 de *K. lactis* los niveles de mRNA de *KlHIS4* aumentan apenas 2 veces al comparar células creciendo en medio sintético completo o privado de algún aminoácido. Esta variación en los niveles de mensajero es baja si se compara con el aumento de 7-10 veces de su homólogo *HIS4* bajo las mismas condiciones

Las cepas de *K. lactis* de forma natural se engloban en dos grupos diferentes en lo que se refiere a su metabolismo respiro-fermentativo. Así, las cepas *rag+* son capaces de crecer en presencia de antimicina A a expensas de su capacidad fermentadora mientras que las cepas *rag-* no crecen en estas condiciones y se sabe poco sobre variaciones la regulación de otras rutas metabólicas. Experimentos de *Northern blot* con dos líneas *rag+* y una *rag-* revelan que la línea MW98-8c (*rag-*) pese a crecer peor en glucosa es capaz de expresar muy altos niveles de *KlHIS4* en medios sintéticos, si bien no se aprecia inducción en ausencia de aminoácidos. Estos datos apuntan a diferencias en la regulación de la biosíntesis de aminoácidos en *K. lactis* y a la interconexión del metabolismo respiro-fermentativo con la biosíntesis de aminoácidos.

10 / 03

SEXADO UNIVERSAL DE AVES MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES: SSCP-PCR vs PCR

Cortés Gardyn, O., Barroso, A., Dunner, S.
Laboratorio de Genética - Dpto. Producción Animal- Facultad de Veterinaria
Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid
ocortes@eucmax.sim.ucm.es

La falta de dimorfismo sexual en muchas aves hace necesario recurrir a métodos alternativos para determinar el sexo de los individuos. Los métodos moleculares por sus ventajas (fiabilidad, mínimo riesgo, análisis en cualquier estadío,...), son los más extendidos y dentro de éstos la PCR y la SSCP-PCR. El fundamento teórico coincide en ambos: visualización de las diferencias del gen CHD (chromobox-helicase-DNA-binding gene), dependiendo de su localización cromosómica (W o Z), vía PCR (salvo en ratites). Con el objetivo de comparar ambos métodos se seleccionaron 11 especies de aves pertenecientes a 5 órdenes distintos (falconiformes, estrigiformes, ciconiformes, galliformes y psitaciformes). El método PCR presenta unas necesidades de tiempo (3 horas) menores que la SSCP-PCR (9 horas), estas diferencias se deben al tipo de soporte en el que se realiza la electroforesis, agarosa en la PCR y acrilamida en la SSCP-PCR. No obstante la elevada homología del gen CHD entre especies (82%) permite en el caso de la SSCP-PCR discriminar los sexos de manera simultánea en todos los órdenes representados en este estudio, mientras que con la PCR en determinadas especies es necesario recurrir a técnicas alternativas de mayor sensibilidad (electroforesis en geles de poliacrilamida o SSCP) para identificar las diferencias entre sexos. Por tanto en aquellas especies donde la PCR no es discriminante, la SSCP-PCR sería, a pesar de su mayor complejidad, la técnica de elección por su universalidad.

10 / 04

OBTENCION DE MARCADORES MOLECULARES DISCRIMINANTES EN PEPINO (*Cucumis sativus*) PARA SU APLICACION EN EL REGISTRO DE VARIEDADES

Bernet, G.P.; Bretó, M.P.; Bramardi, S.; Calvache, D.; Carbonell, E.; Asíns, M.J.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera, Km 4.5
46113 Moncada (Valencia)

Para proteger los derechos de los obtentores de variedades vegetales, la U.P.O.V. (International Union for the Protection of new Varieties of Plants), sugiere utilizar para el registro de nuevas variedades una serie de caracteres sobre los que realizar las pruebas D.U.S. (distinción, uniformidad y estabilidad). En la actualidad está en discusión la incorporación de datos moleculares a dichos caracteres, sobre todo en aquellos casos, como en pepino, en los que la especie cultivada presenta escasas diferencias entre sus variedades para estos caracteres.

Con el objetivo de comparar la caracterización según las normas U.P.O.V. y la caracterización molecular, se utilizaron 41 entradas de pepino (*Cucumis sativus*), entre las cuales se introdujeron, “a ciegas”, accesiones repetidas, accesiones pertenecientes a distintos lotes, y accesiones rechazadas en el Registro por ser idénticas en los ensayos comparativos. Los productos de PCR se resolvieron en acrilamida que demostró detectar, en comparación con la agarosa, un mayor número de bandas y polimorfismos. Se obtuvieron 33 marcadores RAPD capaces de diferenciar todas las variedades y detectar las “trampas” anteriormente mencionadas. Igualmente se obtuvieron dendogramas que se compararon con los resultantes de la caracterización morfológica de todas las entradas, analizandose la correlación entre ambos. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad y eficiencia de los marcadores moleculares en la diferenciación varietal y su utilidad en el Registro de variedades, especialmente en especies cultivadas, donde la variabilidad para caracteres U.P.O.V. es muy restringida.

10 / 05

AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y ESTUDIO DE 3 NUEVOS MARCADORES POLIMÓRFICOS EN LA ESPECIE PORCINA MEDIANTE INTENSIVE RANDOM SPECIFIC AMPLIFICATION (IRSA)

Calvo, J.H., Osta, R. y Zaragoza, P.
Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. Tel .976761620 Fax 976761612

La búsqueda de nuevos marcadores en el genoma porcino tiene un gran interés para la realización de mapas de alta resolución que permitan el conocimiento de zonas poco estudiadas y su posible relación con caracteres productivos. Las tendencias actuales de los nuevos planes de mejora necesitan de un alto número de marcadores dispersos por todo el genoma, para poder relacionar estos marcadores con caracteres productivos. Estos son los denominados QTLs.

Según Ellegren et al. (1993) los microsatélites (mononucleótidos y dinucleótidos) se asocian con SINEs y LINEs, siendo éstas secuencias dispersas altamente repetidas en el genoma.

IRSA (Intensive Random Specific Amplification) consiste en la selección de cebadores que se unan en el genoma porcino al azar, con el fin de producir amplificaciones inespecíficas. Supusimos que las bandas más intensas corresponderían a regiones repetidas del genóma porcino. Clonamos y secuenciamos dichas bandas. Mediante esta metodología fueron clonados y secuenciados 10 fragmentos, de los cuales 3 presentaban secuencias que podían corresponder a microsatélites (sZ001, sZ002 y sZ003). Las tres secuencias presentaban homología, en las zonas cercanas a las repeticiones, con zonas en humana relacionadas con secuencias Alu, pero no presentaban homología con los SINEs porcinos descritos hasta el momento. El sZ001 tiene homología en humana con una región flanqueada por secuencias Alu, en el caso del sZ002 con un LINE2 humano que a su vez está flanqueado con secuencias Alu, y el sZ003 con rDNA de invertebrados que se ha asociado a secuencias satélite (Pérez et al., 1997).

Finalmente se sintetizaron cebadores internos en los tres clones positivos, encontrando en los tres polimorfismo y herencia mendeliana. Por último se han estudiado estos polimorfismos en distintas razas porcinas: Ibérico, Chato Murciano, Pie Noire du Pays Basque, Landrace, Large White, Pietrain, Duroc, híbridos de Hampshire e híbridos comerciales.

10 / 06

UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE TEJIDO

Gómez, E.; Royo, J.; Sanz, Y. y Hueros, G.
Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá. Nacional II, Km. 33,600 28871-Alcalá De Henares. Madrid. Email Elisa.Gomez@uni.alcala.es

La identificación de genes que se expresan específicamente en un tejido del organismo es un elemento central en el estudio de los mecanismos de diferenciación y funcionamiento de ese tejido. El objeto de nuestro estudio, las células de transferencia del endospermo de maíz, es una capa de células situadas en la base de la semilla y que están altamente modificadas para facilitar el transporte de nutrientes al interior de la semilla en crecimiento. Estas células se desarrollan en el curso de 6 ó 7 días después de la polinización y fenotípicamente se caracterizan por la presencia de invaginaciones de la pared celular que incrementan hasta 20 veces la superficie de membrana disponible para el intercambio. Constituyen un atractivo objeto de estudio como modelo de desarrollo y diferenciación celular en plantas, así como un claro blanco para los esfuerzos destinados a mejorar, cualitativa y cuantitativamente, el proceso de llenado del grano.

Con el fin de aislar genes expresados específicamente en las células de transferencia, hemos utilizado un método alternativo a los más comúnmente usados de hibridación diferencial y "differential display". Este método, basado en la amplificación al azar de fragmentos de cDNA, resulta notablemente más sensible que el de la hibridación diferencial al permitir el aislamiento de genes muy poco representados en la población de mRNAs. Comparado con el método de "differential display" es técnicamente más simple y proporciona una información inicial más completa sobre los genes candidatos. La especificidad de tejido de algunos de los genes candidatos ha sido posteriormente confirmada mediante hibridación en Northern blot e hibridación "in situ".

10 / 07

ORGANIZACIÓN INTERFÁSICA DE LA CROMATINA DE CENTENO EN LINEAS DE ADICION TRIGO-CENTENO NORMALES Y MUTANTES PARA EL LOCUS *Ph1*

Corredor, E.[1], Maestra, B.[1], Díez, M.[1], Shepherd, K.[2], de Jong, J.H.[3] y Naranjo, T.[1]
[1] Departamento de Genética, Facultad de Biología, UCM, España. [2] Dep. Plant Science, U. Adelaide, Australia. [3] Dep. Genetics, WAU, The Netherlands

La organización de la cromatina en núcleos en interfase de células somáticas ha sido abordada utilizando la técnica de hibridación genómica *in situ*. El DNA genómico de centeno fue marcado con fluoresceina y utilizado como sonda para visualizar un par de cromosomas homólogos de centeno, el brazo largo del cromosoma 5R o el cromosoma 7R, en núcleos en interfase de células meristemáticas de raíz de sendas líneas de adición trigo-centeno. En cada una de las líneas de adición se estudiaron dos genotipos diferentes para el locus *Ph1* que regula el apareamiento cromosómico en trigo, el genotipo normal y el mutante *ph1b*. De acuerdo con su disposición los cromosomas de centeno se agruparon en tres categorías: cromosomas independientes con un dominio por cromosoma, cromosomas independientes con más de un dominio por cromosoma y cromosomas que compartían un mismo territorio. El genotipo normal de ambas líneas de adición mostró un claro predominio de la primera categoría mientras que las otras dos categorías resultaron más abundantes en las líneas mutantes. La mutación *ph1b* causó además una distorsión de la orientación espacial del par de homólogos de centeno, de modo que, la disposición en paralelo del par 5RL y la disposición en forma de V del par 7R fueron menos frecuentes en las líneas mutantes. No se observó, sin embargo, ningún efecto del alelo mutante en la ocurrencia de asociación o no entre cromosomas homólogos. Estos resultados confirman que el gen *Ph1*, u otro gen localizado en la deleción *ph1b*, está implicado en la organización de la cromatina en interfase.

10 / 08

IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA PUREZA VARIETAL EN CHOPO (*Populus* spp.) MEDIANTE RAPDs

García, P.; Martínez, R. y Pérez de la Vega, M.
Area de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León

Los chopos (*Populus* spp.) constituyen uno de los géneros de mayor importancia económica entre las especies forestales ya que en muchas ocasiones son la única solución a las crecientes demandas madereras y proporcionan una buena alternativa en procesos de repoblación forestal. Gran parte del éxito se debe a la facilidad de obtención de híbridos interespecíficos con características de interés y a la posibilidad de multiplicarlos clonalmente. Sin embargo, durante los distintos procesos de multiplicación y manipulación de clones es frecuente que se produzcan mezclas, por ello es necesario disponer de métodos que permitan la correcta identificación de cada uno de los clones. En este trabajo se han utilizado marcadores RAPD para establecer su utilidad en la identificación de los clones, así como para analizar la posible variabilidad intraclonal o mezclas que se han ido produciendo durante el manejo de los mismos. En concreto se han estudiado 7 clones (6 de *P. x euroamericana* y uno de *P. nigra*) entre los más utilizados en populicultura, mediante 71 cebadores. De ellos 4 no produjeron amplificaciones o no resultaron repetibles, 18 no dieron lugar a patrones variables y 49 mostraron bandas polimórficas. Entre estos últimos se escogieron 10 para analizar varios individuos de cada clon. Los resultados muestran la gran utilidad de estos marcadores para su utilización en identificación de los distintos clones, así como para la detección de mezclas.

10 / 09

CARACTERIZACIÓN VARIETAL MEDIANTE RAPDS DE GERMOPLASMA DE NÍSPERO (*Eriobotrya japonica Lindl.*)

Vilanova Navarro, S.; Badenes Maria, L.; Llacer, G.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Apdo. Oficial 46113- Moncada- Valencia (España)

En el contexto de un proyecto de conservación de recursos filogenéticos se estableció en el IVIA una colección de níspero japonés (*Eriobotrya japonica Lindl*.). Esta colección se está caracterizando pomológica y molecularmente con el fin de identificar todas las posibles entradas y eliminar sinonimias. En este trabajo se presentan los resultados de una caracterización por medio de marcadores tipo RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) en un grupo de 34 variedades pertenecientes a esta colección.

Previamente se realizó un muestreo con 180 oligonucleótidos en un subgrupo de 8 variedades, con el fin de seleccionar aquellos oligonucleótidos que presentan polimorfismo y reproductibilidad. De este muestreo se seleccionaron 24 oligonucleótidos que dieron lugar a 28 marcadores.

A partir de estos marcadores se calcularon las distancias entre variedades usando el índice de Nei y Li (1979). Se realizó un análisis tipo cluster con el que se obtuvo un diagrama de agrupamiento de variedades

índice

A

Abad, J.P. 198
Abel, M 64
Abellanas, B. 385
Abuin, M. 109
Agudo, M. 198
Aguirre, A. 267
Alarcón, J. A. 379
Albalat, R. 309
Almirall, J. 296
Alonso Rojas, R. 150
Alonso, F. 65
Altarriba, J. 85
Alvarez , J.B. 113
Álvarez García, A. 315, 325
Alvarez Herrero, M.C. 55
Alvarez, J. B. 114, 115
Alvarez, J. B. C. 385
Álvarez, L. 157
Alvarez, M. A. 366
Alvarez, M.C. 262, 379
Alvarez. 66
Amaro, R. 344
Amezcua, O. 70, 72
Amrani, S. 151
Amurrio, J. 97, 98
Angosto, T. 179, 184, 243
Anzola, M. 301
Araujo Prado, M. 145
Arce Martínez, I. 291
Arnal Monreal, F. 315, 325
Arrieta Saez, I. 150, 323, 324
Arús, P. 187
Asenjo, A. 388, 389
Asíns, M.J. 83, 100, 221, 222, 430
Astolfi, S. 363
Atienza, S. G. 386
Atrian, S. 395
Augusto Clavijo, H. 289, 427
Ayuso, C. 293

B

Baars, J.J. 217
Badenes Maria, L. 435
Baeza, G. 262
Baguñà, J. 161
Baiget, M. 293
Balcells, S. 318, 319
Ballester, V. 381
Barbancho Medina, M. 306
Barber, Y. 296, 302
Barcala,N. 352
Barja M.D. 71
Barral P., J. 241, 242
Barral, S. 299, 300, 364
Barrio, E. 341
Barrionuevo, F. 177
Barrionuevo, F.J. 175, 206, 355
Barros, F. 383
Barroso, A. 429
Barth, R. J. 115
Basurco, F. 111
Batista, D. 363
Batlle Fonrodona, F.J. 292
Bayascas, J. R. 161
Becerra, M. 261
Bel, Y. 265
Belarbi, E. 263
Beltrán, J. P. 180
Benach, J. 395
Beneyto, M. 293
Benítez, T. 247
Benito, C. 307
Bernardo, A. 356
Bernet, G.P. 430
Beroiz, B. 65
Bertranpetit, J. 384
Bettencourt, E. 244
Beyer, K. 149, 312, 322
Bezares, R. 301
Blanca, J.M. 212, 294, 295
Blanco García, F. 315
Blanco, G. 67, 68
Blázquez, S. 69, 216

Borras, M. 296
Botello, E. 410, 423
Bottini, M. C. 377
Bouza C. 71
Bramardi, S. 430
Bravo, J. M. 258
Bretó, M.P. 221, 430
Brichette, I. 118
Brión, M.J. 299, 300, 364
Brooke, N. 164
Burgos, M. 175, 177, 206, 355
Butrón, A. 107

C

Caballero, A. 349
Caballero, L. 114
Cabré Fabré, O. 142
Cabrera, A. 210
Cagigas, E. 68
Calafell, F. 384
Callejas, C. 378
Calvache, D. 430
Calvo, J.H. 431
Camacho, E. 406
Cano, D. 406, 424
Cantoral, J.M. 215
Cañizares, J. 294
Cañón, J. 116, 391
Cao, R. 364
Capel, J. 178, 184, 243
Carballo, M. 375
Carbonell, E. 83, 100, 430
Carcelén, N. 237
Carleos, C. 391
Carnide, V. 380
Carpenter, R. 167
Carracedo, A. 271, 299, 300, 364, 383, 384
Carracedo, M. C. 388, 389, 396, 397
Carranza, S. 161
Carrasco A. 259
Carrillo, J. M. 104, 105
Cartea, M.E 107
Cartea, M.E. 106
Carton, Y. 359
Carvajal, A. 350
Carvalho, A.M. 244
Casadesús, J. 406, 424
Casals, F. 354
Casanova, C. 103, 387, 390
Casares, P. 388, 389, 396, 397
Castro J. 71
Castro, A. 366
Castro, J. 351
Castro, P. 118
Ceballos, E. 260
Cerdá Olmedo, E. 158
Cerdán, E. 261, 428
Cervantes, S. 305
Chacón 156
Charlesworth, B. 31, 362
Checa, M. L. 391
Chiavarino, A.M. 229, 230
Clement, C. 363
Clemente, A. 236
Coca-Prados, M. 308
Coen, E. 167
Cohen, R.J. 158
Comendador, M.A. 147, 148, 157
Contreras, A. 419, 420, 421
Corces, V. 25
Cornelius, P. 81
Cornudella, L. 47
Corredor, E. 433
Cortés Gardyn, O. 429
Cortés, F. 126, 154, 155
Corujo, M. 68
Costa, D. 394
Costas Costas, J. 304
Costas, J. C. 371
Costoya, S. 313, 314, 316, 317
Creus, A. 143, 151
Criado Alonso, B. 150, 323, 324
Cross, I. 70, 72
Crossa, J. 81
Cruz, R. 372, 373
Cuadra, C. 352
Cuadrado, A. 199
Cubas, P. 167
Cubero, J.I. 112, 224, 367
Cuevas, J.M. 293, 348

Cuevas, N. 301
Cuñado, N. 61, 69, 211, 216, 237

D

D'Ari, R. 414
Dakir, EL-H. 219, 220
Daza, L. 205
De Adrés, M. 356
de Andrés Cara, D. 235, 306
De Bustos, A. 203, 204
De Castro, M. 294
de Frutos, R. 212, 213, 294, 358
de Jong, J.H. 433
de la Cruz, M. 387
De la Herrán, R. 61, 211, 218
de Pancorbo, M.M. 301, 366
del Cerro A. 69
Delgado-Jarana, J. 247
Devos, K.M. 190
Diaz Aguirregoitia, J. 324
Díaz de la Guardia, R. 206, 355
Díaz, E. 249
Díaz, S. 261
Díaz-Valdés, N. 148
Díez, A. 318
Díez, M. 99, 240, 433
DogMap Consortium 231
Dominguez, I. 155
Dorado Pérez, G. 214
Dover, G. 365
Dunner, S. 231, 391, 429
Durán, Y. 225

E

Edreira 153
Edreira, A. 321
Elena, S. 348
Enjuanes, A. 318
Escribano, J. 308
Escriche, B. 117
Espinós, C. 293
Esteve, P. 296, 302

F

Fernandes, R. 324
Fernández Martínez, M. 223
Fernández, A. 67
Fernández, B. G. 349
Fernández, C. L. 344
Fernández, E. 296
Fernández, J. 74, 111
Fernández, M.P. 378
Fernández, R. 313, 314, 316, 317
Fernández-Cruz, A. 311
Fernández-Fernández, I. 301
Fernández-Ortíz, A. 311
Fernández-Ruíz, E. 291
Ferrandis, D. 265
Ferrándiz, C. 180
Ferré Manzanero, J. 239
Ferré, J. 117, 265, 266, 381, 392
Ferreiro J.A. 147
Ferrer, I. 319
Ferrier, D. 164
Fibla, J. 296, 302, 395
Filgueira Fernández, P. 315, 325
Flores Elices, P. 150, 323
Flores, R. 158
Fominaya, A. 232, 233, 234
Forner, J. B. 100
Fratini, R. 102
Freire Picos, M.A. 428
Freire, R. 76
Frutos, R. 265
Fuentes 66

G

Gal, A. 310
Galán, B. 249
Gale, M.D. 190
Galindo, M. 357
Gallego, F. J. 363
García del Portillo, F. 406, 424
García, C. S. 372, 373
García, E. 243
García, E. M. 360
García, J. C. 417

Garcia, J. F. 161, 164
García, J. L. 249
García, M. 176
García, M. R. 100
García, P. 103, 220, 376, 434
García, R. 222
García, S. 313, 314, 316, 317
Garcia-Giralt, N. 318, 319
Garma, C. 345, 346
Garre, V. 416, 417
Garrido Pavón, J.J. 235, 306
Garrido Vázquez, J. 144, 145
Garrido-Ramos, M.A. 61, 211, 218, 297
Gas, M. 357
Gil, J. 224, 367
Giménez, M. J. 386
Ginja, C. 236
Gómez, C. 15, 152
Gómez, E. 432
Gómez, J. L. S. 172
Gómez, M. 105
Gómez, P. 184
Gómez, P.J. 387
González, A. 73, 74, 75, 341
González, A. I. C. 365
González, A. N. 364
González, F. 222
González, J. 353
González, J. C. 392
Gonzalez, J. L. 161
González, J.M. 207, 208
González, M.J. 210
González, O. 281
Gonzàlez, R. D. 395
González, S. C. 169
González-Cabo, P. 294
Gonzàlez-Duarte, R. 281, 305, 309
González-Guzmán, M. 213
González-Neira, A. 299, 300
Grandal, A. 347
Granero, F. 381
Grinberg, D. 318, 319
Guedes, H. 380, 394
Guigó i Serra, R. 278
Guma, R. 376
Gusmao, L. 299
Gusmão, L. 244
Gutierrez, J. P. 116
Guzmán, E. 422

H

Hajj Moussa, E. 224
Hajj, E. M. 367
Hasmy, A. 241, 242
Henriques-Gil, N. 290, 345, 346
Hermida, J. J. 369
Hermida, M. 344
Hernández Molina, P. 214
Hernández, C.S. 266
Hernández, J. 97
Hernández, P. 418
Herrero Sendra, S. 239
Herrero, S. 117
Heslop-Harrison, J.S. 199
Hiraldo F. 154
Hirvonen A. 143
Hita, M. 359
Holland, P. 164
Houben, A. 226
Hueros, G. 432

I

Infante, J.J. 215
Insua L. 71
Insua, A. 76, 77
Irigoyen, M. 232, 233
Iruela, M. 367
Irurita, M. 311
Izquierdo, M. 284, 374, 393

J

Jablonka, S. 310
Jain 329
Jamart, J. A. 397
Jamilena, M. 178, 179, 184
Jimenez Sanz, R. 150
Jiménez, A. S. 410, 422, 423

Jimenez, E. 161
Jiménez, G. 209, 226, 229, 240
Jimenez, J. 242
Jiménez, R. 175, 177, 206
Jiménez, R. M. 355
Jouve, N. 199, 203, 204, 205, 207, 208
Juárez, A. 403
Juárez, V. 265

K

Korochkin, L. 181
Krimer, D. 418
Kutsche, K. 310

L

Ladenstein, R. 395
Laffon, B. 149
Lake, J. 329
Lamas Maceiras, M. 428
Lao, J.I. 312, 322
Lareu, M.V. 299, 300, 364, 384
Larraya, L. 217
Latorre, A. 341
Laurent, P. 228
Laurentin, H. 94
Ledesma, M.A. 153, 321
Leira, F. 75
Lema Costa, B. 315, 325
Limón, M.C. 247
Linares, C. 232, 233
Lindner, R. 96
Lindpaintner, K. 311
Llacer, G. 435
Llanes Ruiz, D. 306
Loarce, Y. 205, 234, 356
López, A. 146
López, D. 263
López, F. G. 347
López, J. E. D. 382
López, J. L. 66
López-Martínez, M. 301
López-Piñón M.J. 77
Lorca, J.M. 417
Lorenzo, P. 267
Lostao Zuza, C. 150, 323
Lozano, R. 178, 179, 184, 243
Lucero, L. 15, 152
Luo, D. 167

M

Maçãs, B. 264
Macas, J. 112
Macaya, C. 311
Madrid, C. 403
Madueño, F. 180
Maestra, B. 238, 433
Magallanes, J. 95, 97, 98
Maggese, M 64
Makuch, M. 352
Maldonado, R. 419, 420, 421
Malvar, R.A. 107, 108
Manzanero, S. 209, 226, 229
Marcano, A. 242
Marco, M.P. 296
Marcos Dauder, R. 142
Marcos, R. 15, 131, 143, 146, 151, 152
Marcos, S. 227
Marfany, G. 281, 305
Mariñas, L. 73
Marqués, S. 406
Martín Muñoz, A. 214
Martín, A. 89
Martín, A. M. 386
Martín, I. 360
Martín, J. 419, 420, 421
Martín, L. M. 115, 385, 386
Martín, L.M. 113, 114
Martínez de la Hidalga, A. 260
Martínez Garay, I. 310
Martínez P. 71
Martinez Santiago, B. 150, 323
Martínez, A. 73, 74, 75
Martínez, C. B. 366
Martínez, I. 118
Martínez, I. A. 419, 420, 421
Martínez, J. M. Z. 167

Martínez, M. 237
Martínez, M. J. S. 358
Martínez, M. L. 418
Martínez, R. 434
Martínez-Mir, A. 309
Martínez-Sebastián, M.J. 213, 295
Maside, X. 362
Mata-Balaguer, T. 297
Mateos, S 155
Matos, J. 236
Matos, M. 380
Mazón, L. 267
Mellibovsky, L. 318
Mendez Martin, Jj. 324
Méndez, J. 73, 74, 75, 76, 77, 149, 312, 322
Menéndez, M. 352
Mesa, J.J. 215
Miana-Mena, J. 303
Micol, J.L. 119, 182
Mikhailov, A. 181, 183
Mikosch, T.S.P. 217
Millán, J.M. 293
Millán, T. 224, 367
Minguez, S. 318
Minguillón, C. 164
Miquelay, E. 403
Miralles, R. 348
Molina, F. 422
Molinero, N. 178, 179
Moltó, M.D. 294, 295
Monte, J. 103, 387
Monteiro, F. 394
Montero, I. 95
Montilla, D. 94
Montoya, J. L. 104
Moreno, J. 118
Moreno, J. G. 92
Morera Sanz, L. 235, 306
Morera, B. 158
Mosquera J. M . 66
Moya, A. 341, 348
Muñiz, L.M. 207, 208
Muñoz, M.J. 303
Muray, S. 296
Murillo, I. 258

N

Nájera, C. 293
Naranjo, C.A. 230
Naranjo, T. 238, 433
Narvaiza, I. 320
Navarro, C. 180
Navarro, E. 417
Navarro, J.A. 295
Navarro, P. 176
Navas, J.I. 218
Naveira F., H. 241
Naveira, H. 371
Neumann,R. 352
Nieto, J. 403
Nieto, R. M. 390
Nivard, M.J.M. 138
Noel, X. 146
Noguera, J. 243
Nogueras, I. 207, 208
Nogués, X. 318
Norppa H. 143
Nothwang, H. 310
Novo, F.J. 320
Nuez, F. 99
Núñez, Y. 363

O

Ochando, M.D. 65, 378
Olavarrieta, L. 418
Oliva, S. 262
Oliveira, J. A. 382
Oliveras, A. 296
Ordás, A. 109, 110
Ordás, B. 108
Orera, M. 290
Ortega Azpitarte, B. 150, 323
Ortego, J. 308
Ortin, M. 301
Ortiz 153, 156
Ortiz Lastra, E. 150
Osta, R. 303, 360, 431

P

Palau, F. 294
Paredes, M. 179
Parra, D. 231
Parrón, T. 15, 152
Pasantes, J.J. 63
Pásaro, E. 149, 312, 313, 314, 316, 317, 322
Pascual, L. 357, 359
Pascual, M. 334
Pastor, N. 126, 154, 155
Pastor, S. 15, 152
Patanita, M. 264
Paz, M. 181
Penas Salgado, N. 292
Peñagarikano Ahedo, O. 150, 323
Peñas, M. 217
Perera, E. 238
Pérez de la Vega, M. 219, 220, 223, 225, 434
Pérez Ortín, J. 195
Pérez, G. 217
Pérez, J. M. 182
Pérez, M. 176
Pérez-Muñoz, A. 213
Periquet, G. 359
Perucho, M. 35
Picornell, A. 351
Pineda, D. 161
Pinto, O. 380
Pintó, X. 319
Pintor, E. 311
Pinzón, R. 321
Piñeiro, R. 396
Piñero 153, 156
Piñero, J. 126, 321
Piqueras, P. 119, 182
Pisabarro, G. 217
Pitarque M. 143
Pleite 156
Poggio, L. 377
Poirié, M. 359
Polanco de la Puente, C. 365
Polanco, C. 223, 337
Ponce, M.R. 119, 182
Porta, J. 379
Pozarkova, D. 112
Prada Puentes, C. 315, 325
Prémoli, A. 377
Prenafeta, A. 403
Presa P. 71
Pucciarelli, G. 406
Puciarelli, G. 424
Puertas, M.J. 209, 229, 240
Pueyo de la Cuesta, C. 123

Q

Qian, C. 320
Queiroz 244
Quesada, V. 119
Quiles, M. 416, 417
Quinteiro, J. 374, 393

R

Ramírez, L. 217
Ramon, M. 351
Rangel, T. 236
Ranz, J. M. 354
Rebordinos, L. 70, 72, 215
Rego, I. 75
Reis, N. 363
Revilla P. 110
Revilla, P. 109
Rey, M. 374, 393
Rey, M. 247
Richard, C. 301
Rios, J. 73
Ritter, E. 217, 259, 260
Riutort, M. 161
Rivera 329
Rizki, M. 151
Roda-Navarro, P. 291
Rodellar, C. 228, 360, 368
Rodiño, A. 96
Rodríguez de Córdoba,S. 274
Rodríguez, A. 104
Rodríguez, D. M. 388, 389
Rodríguez, F. 74, 75

Rodríguez, J. 263
Rodríguez, M. J. T. 366
Rodríguez, S. 238, 370
Rolán, E. 372, 373
Rolán-Alvarez, E. 375
Román, B. 112
Romero, C. 237
Ron, A. 95, 96, 97, 98, 352
Rosato, M. 229, 230
Roselló, S. 99
Rosi, P. 230
Roy, R. 228, 368
Royo, J. 432
Royo, J.L. 321
Rubiales, D. 112
Rubio, J. 367
Rubio, M,C. 302
Rubio, M. 302
Rubio, P. 203, 204, 205
Rufat, M. 258
Ruiz Casares, E. 290
Ruiz de Galarreta, J. I. 259
Ruiz Rejón, C. 61, 211, 218
Ruiz Rejón, F. 297
Ruiz Rejón, M. 61, 211, 218
Ruíz Sánchez, M.L. 223
Ruiz, A. 353, 354
Ruiz, A. P. 330
Ruiz, C. 221, 222
Ruiz, C. P. 383
Ruiz, I. T. 161
Ruíz, J. 387
Ruiz, M.L. 102, 219, 220
Ruiz, R. V. 417
Ruiz-Herrera, J. 158
Rumoroso, J. 67

S

Saavedra, C. 62
Sacristán, F. 370
Salas, A. 299, 300, 364, 384
Salinas, P. 419, 420, 421
Saló, E. 161
San Miguel, E. 344
San Segundo, B. 258
Sánchez L. 71
Sánchez, A. 252
Sánchez, J.A. 67, 68
Sánchez, L. 50
Sánchez, M.F. 281
Sánchez, P. D. 364
Sanchez, M. 357
Sánchez-Diz, P. 299, 300
Sánchez-Morán, E. 69, 216
Santalla, M. 96
Santiveri, P. 101
Santos, J.L. 61, 69, 211, 216
Sanz, Y. 432
Schvartzman, J. 418
Schwarzacher, T. 199
Segura, D. 378
Serra, L. 334
Seyfert, H.M. 227
Shepherd, K. 433
Sierra, L.M. 134, 147, 157
Sierra, M. 148
Sineiro, R 73
Siso, M. I. 261
Soengas, P. 106, 110
Sole, J. C. 101
Soler, C. 103, 356, 387, 390
Soria, F. 111
Sosa del Castillo, D. 361
Stitou, S. 355
Suárez Figueras, S. 142, 144, 145
Suárez, S. 15, 152
Sueiro Benavides, R.A. 144, 145

T

Tauler, J. 161
Telez Sedano, M. 150, 323, 324
Tella J. 154
Terol, J. 176
Toledo, M. J. 385
Tomàs, C 351
Tomás, E. 212
Torea Louzán, J. 292
Tormo, A. 401
Toro 156
Toro Ibañez, M.A. 58

Torrado, M. 181, 183
Torreblanca, J. 406
Torregrosa, V. 296
Torreiro, A. 63
Torres, A.M. 112
Torres, S. 416, 417

U

Utgés, M.T. 302

V

Vaglenov A. 143
Valadé del Río, E. 371
Valadeiro, C. 264
Valero, R. 281
Vallejo, M. 116, 391
Vaquero, F. 361
Varela, M. 97
Vázquez, E. 67, 68
Vázquez, R. M. 358
Vega, A. 383
Vega, J. L. 391
Vega, J.M. 209
Vega, L. 70, 72
Velasco, A. 307
Velasco, P. 106, 108
Velázquez Henar, A. 142
Velázquez, A. 146
Velencoso, R. 212
Veloso, M. 244
Vences, J. 361
Vicario, A. 267
Vidal, R. 374, 393
Vieites, J.M. 75
Vila, L. 258
Vila, M. 347
Vilanova Navarro, S. 435
Vilardi, J 64
Vilaseca, M.A. 319
Vilches, M.A. 263
Villasante, A. 198
Vinella, D. 414
Vogel, E. 138

W

Weissman, S.M. 291

X

Xamena López, N. 142

Z

Zapata, C. 369, 370
Zaragoza, P. 227, 303, 360, 431
Zaratiegui, M.A. 320
Zarazaga, I. 360
Zee, R.Y.L. 311
Zouros, E. 51, 62
Zurita, F. 175, 177, 206, 355
Zurita, S. 184