

Origen, expresión y efectos fenotípicos de un parásito genómico



María Teruel Artacho
Tesis Doctoral
Marzo, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Teruel Artacho
D.L.: GR. 1932-2009
ISBN: 978-84-692-1850-1



Origen, expresión y efectos fenotípicos de un parásito genómico

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada María Teruel Artacho para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Dirigida por los Doctores:

Director

Director

Fdo. Dr. Josefa Cabrero Hurtado

Fdo. Dr. Francisco Prefectti Álvarez

Fdo. María Teruel Artacho
Marzo, 2009

El presente trabajo se ha realizado en el Grupo de Genética Evolutiva del Departamento de Genética de la Universidad de Granada. La investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través de los proyectos BOS2003-06635 y CGL2006-06307 y del Plan Andaluz de Investigación (CVI-165 y CVI-1664).

Durante la realización de este proyecto de Tesis Doctoral he disfrutado de una Beca Predoctorales de Formación de Personal Investigador (FPI), del Ministerio de Ciencia y Tecnología, asociada al Proyecto de Investigación BOS2003-06635.

A mis padres
y a mis hermanos

A Gustavo

Agradecimientos

Índice

Summary.....	15
Introducción y Objetivos.....	21
1.1. Introducción. Los cromosomas B.....	23
Naturaleza de los cromosomas B.....	24
Composición molecular.....	25
Comportamiento meiótico.....	27
Control de la transmisión de los cromosomas B.....	28
Efectos.....	29
Origen.....	31
Mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones.....	33
Dinámica y evolución de los cromosomas B.....	34
1.2. El sistema de cromosomas B de <i>Eyprepocnemis plorans</i>	39
La especie.....	39
Los cromosomas B de <i>Eyprepocnemis plorans</i>	40
1.3. Objetivos.....	47
Material y Métodos.....	49
2.1. Material.....	51
2.2. Protocolos.....	54
Técnicas de Citogenética.....	54
1. Fijación del material.....	54
2. Obtención de las preparaciones.....	55
3. Preparaciones con orceína al 2%.....	56
4. Bando C.....	56
5. Impregnación argéntica.....	57
6. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	57
7. Inmunofluorescencia.....	60
8. Microdisección.....	61
9. Chromosome painting.....	63

10. Captura de imágenes.....	65
TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	65
1. Preparación de tejidos biológicos para M.E.T.....	65
2. Realización de los cortes y tinción	66
3. Captura de imágenes.....	66
CITOMETRÍA DE FLUJO	67
1. Protocolo de disgregación de tejidos	67
2. Fijación de la suspensión celular	68
3. Análisis del ciclo celular con Ioduro de Propidio (IP).....	68
4. Protocolo de detección de la apoptosis.....	68
WESTERN BLOT	69
1. Extracción de proteínas	69
2. Cuantificación de proteínas.....	71
3. Electroforesis en geles de poliacrilamida	71
4. Transferencia de proteínas.....	72
5. Inmunodetección.....	74
TÉCNICAS MOLECULARES	75
1. Extracción de DNA.....	75
2. Amplificación del DNA cromosómico.....	76
2. 1. DOP-PCR	76
2. 2. Amplificación del DNA cromosómico con GenomePlex®	77
3. Electroforesis en geles de agarosa	79
4. Cuantificación del DNA	80
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	80
6. Clonación	82
7. Extracción de DNA plasmídico. Miniprep	83
8. Secuenciación.....	84
HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	87
2.3. Tampones y soluciones.....	89
1. Tampones biológicos.....	89
2. Tampones de electroforesis	92
3. Fijadores.....	92
4. Reactivos	93
5. Soluciones químicas	97
6. Medios de cultivo	98
<u>Origen de los cromosomas B de <i>Eyprepocnemis plorans</i></u>	<u>101</u>
3.1. Análisis citológico y molecular de los cromosomas X y B de <i>E. plorans</i> ...	103
3.2. DNA repetitivo de 180 pb.....	115
3.3. Regiones ITS de los genes ribosómicos 45S.....	133
3.4. Genes RNA 5S	149
3.5. Genes para las histonas H3 y H4	163
<u>Expresión y Efectos del cromosoma B₂₄.....</u>	<u>191</u>
4.1. Histone H3-K9 lysine acetylation pattern suggests that X and B chromosome are silenced during entire male meiosis in a grasshopper.....	193
4.2. Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome of the grasshopper <i>Eyprepocnemis plorans</i>	201
4.3. Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper <i>Eyprepocneisplorans</i>	213

4.4. Análisis de la ultraestructura del nucleolo en individuos adultos con y sin cromosoma B ₂₄ , mediante microscopía electrónica de transmisión.....	225
4.5. Efecto del cromosoma B ₂₄ en los niveles de expresión de la proteína Hsp70	235
4.6. Análisis de los efectos citológicos derivados de la presencia del cromosoma B ₂₄	249
4.7. Efectos de los cromosomas B ₂₄ durante la espermatogénesis.....	259
4.8. Efectos de los cromosomas B ₂₄ sobre el tamaño corporal de <i>e.plorans</i>	273
<u>Discusión</u>	<u>281</u>
<u>Conclusiones</u>	<u>295</u>
<u>Conclusions</u>	<u>301</u>
<u>Perpectivas.....</u>	<u>307</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>311</u>
<u>Trabajos adicionales.....</u>	<u>325</u>
<u>Anexo I. Alineamientos</u>	<u>329</u>
Alineamiento 1: SatDNA de 180 pb	
Alineamiento 2: Regiones ITS de los genes ribosómicos 45S	
Alineamiento 3: Genes RNA 5S	
Alineamiento 4: Genes para la histona H3	
Alineamiento 5: Genes para la histona H3	

Summary |

B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* pass through different evolutionary stages characterized by varying coevolutionary outcomes of their interaction with A chromosomes, from being parasitic to neutral elements. More than 50 B chromosome variants have been reported, although only several of them have reached elevated significant frequencies high: B₁ in almost the whole Iberian Peninsula, B₂ in the Granada and Málaga provinces, B₅ in Fuengirola (Málaga) and B₂₄ in Torrox (Málaga). Most Spanish B variants are mostly made up of two kind of repetitive DNA sequences, namely a 180 bp satellite DNA (satDNA) and 45S ribosomal DNA (rDNA), which suggests a common origin for all of them. Every B variant is characterized by the relative proportion of these two types of repetitive DNAs, which is also apparent by the C-banding pattern.

The general objective of this PhD Thesis is to continue elucidating the biological meaning and evolution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, especially for the B₂₄ chromosome in the Torrox population (Málaga). For this purpose, we have investigated about the origin of these chromosomes, their gene expression and their effects on several endo- and exophenotypic traits of the individuals carrying them.

We collected adult males and females of *E. plorans* at several localities (named Torrox0, Torrox2 and Torrox4) within the Torrox area (Málaga).

To test the hypothesis of B chromosome origin from the X chromosome (López-León et al. 1994), we microdissected both X and B₂₄ chromosomes and amplified the DNA obtained by two different procedures, DOP-PCR and the single-cell Genomeplex[®] method. We then generated DNA probes to perform chromosome painting. In addition, the DNA obtained from these chromosomes was used to perform PCR amplification of some repetitive DNA sequences to carry out a comparative study between B- and X-derived sequences, including those obtained by PCR amplification from genomic DNA.

Chromosome painting confirmed that X and B chromosomes share many DNA sequences between them and with most of the autosomes, especially satDNA and rDNA, as it was previously known. This supports the hypothesis of an intraspecific origin of B chromosomes in *E. plorans*. Nevertheless, it did not help to clarify whether Bs derived from the X chromosome or else from an autosome.

SatDNA and 5S rRNA genes did neither help in this task. The 180 bp satDNA of *E. plorans* is very homogeneous, as deduced from its low nucleotide diversity and divergence, probably due to a high efficiency of the homogenization mechanisms at both intra- and interchromosomal levels. Nevertheless, fluorescent *in situ* hybridization has showed that the S₁₀ autosome never carries this DNA sequence in Spanish populations, which rules out this autosome as possible candidate to explain B origin, since satDNA is a very important component of B chromosomes in Spanish populations. The 5S rDNA sequences analysed, however, provided ambiguous information that could be interpreted in

several contradictory ways, so that this is not a good marker to explain B origin.

Nevertheless, the 45S rDNA ITS regions and the H3 and H4 histone genes were very informative with regard to B chromosome origin in *E. plorans*. Both kinds of DNA sequences rejected B origin from the X chromosome and, especially the ITS regions, showed a possible autosomal origin. Thus we found ITS-1 DNA sequences showing variation being specific for the B₂₄ chromosome which showed more similarity with autosomal sequences than with those obtained from the X chromosome. This same phenomenon was observed for the DNA sequences for the H3 and H4 histone genes. The ITS-1 DNA sequence from the S₁₁ autosome suggests that this autosome probably is not the B-ancestor. Therefore, with the available information, we can reject X, S₁₀ and S₁₁ chromosomes as possible B ancestors, which points at the S₉ autosome as the best candidate for being the B chromosome ancestor in *E. plorans*.

With regard to our second objective, i.e. possible gene expression in B chromosomes, we analysed the acetylation pattern of lysine 9 in the H3 histone, (H3-K9) to ascertain the general potentiality for gene expression in the B₂₄ chromosome, and also the nucleolar activity of the B₂₄ chromosome, by means of silver impregnation.

We found low levels of H3-K9 acetylation in the X chromosome during male meiosis, a fact being consistent with meiotic silencing of facultative heterochromatin, but the fact that the X chromosome was already H3-K9 hypoacetylated at leptotene, i.e. prior to the appearance of phosphorylated H2AX, indicated that meiotic silencing of the X chromosome in this grasshopper occurs prior to recombination and synapsis. Constitutive heterochromatin, including B chromosomes and paracentromeric regions of autosomes, was always highly condensed and poorly acetylated for the H3-K9 histone. B chromosomes were also H3-K9 hypoacetylated during embryo and adult mitoses, suggesting a general silencing of B chromosomes that begins early in the ontogeny. The silencing of autosomal paracentromeric regions, despite they synapse during meiosis, might be another indication that silencing precedes synapsis.

The B₂₄ chromosome in the Torrox population was recurrently attached to a nucleolus in diplotene cells, indicating the activity of its distally located ribosomal DNA (rDNA). The frequency of males expressing the B chromosome nucleolus organizer region (B-NOR) has been almost doubled in only four years. The likelihood of expressing the B-NOR increased with B number and, in males expressing it, about 20% of their cells showed a nucleolus attached to the B. When active, the B-NOR contributed more than 25% of total cell nucleolar area (NA). Within males expressing the B-NOR, total cell NA did not differ between cells showing the active or inactive B-NOR, suggesting that total cell NA is tightly regulated in this species. However, this parameter tended to increase in this population from 1999 to 2004, in parallel to the neutralization process which is taking place in this population.

Regarding B chromosome effects, we analysed several endo- and exophenotypic traits, such as nucleolus ultrastructure, nucleolus size, levels of the Hsp70 heat shock protein, cell morphology, cell division rate, apoptosis rate, spermiogenesis and body size.

Our analysis of nucleolus ultrastructure, under electronic microscope, did not provide any evidence for B_{24} effects, since all tissues and cells analyzed from +B and -B males and females showed apparently similar nucleoli.

However, we observed a remarkable effect of the B_{24} chromosome on the rules governing the regulation of NOR-expression in the A chromosomes, which was manifested by the appearance of positive interdependences among autosomes and negative interdependences between autosomes and the X chromosome, in presence of a B_{24} chromosome carrying a competent NOR (i.e. one being inactive in some cells and active in other cells).

The level of the Hsp70 protein in gonads from both males and females decreased with increasing numbers of B_{24} chromosomes, but this effect was not apparent in a somatic tissue. This effect could be related with the decrease of nucleolar area associated to B_{24} presence in Torrox, since one of the main functions of Hsp70 is related to nucleolus assembly and maintenance in adverse conditions.

Although B-chromosome presence implies an increase in DNA amount, we have found no effects of B_{24} on the several cellular parameters measured.

However, the B_{24} chromosome has shown to exert a negative effect on spermiogenesis since we observed a significant increase of aberrant spermatids, i.e. macro- and microspermatids, in B-carrying males. The effect on macrospermatids showed an odd-even pattern, most likely provoked by the presence of B-univalents disturbing meiotic cell divisions. The frequency of microspermatids, in addition, was especially high in males with three B_{24} chromosomes.

Finally, our analysis of several metric exophenotypic traits related to body size did not show any relevant effect of B_{24} , in consistency of previous analysis for other B chromosome variants in this species.



Introducción y Objetivos

En este capítulo realizamos una revisión general acerca de los cromosomas B: naturaleza, composición molecular, mecanismos de transmisión, efecto, origen y las hipótesis propuestas para explicar su mantenimiento en las poblaciones.

Posteriormente, realizamos una introducción sobre el sistema de cromosomas B de *E. plorans* objeto de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Finalmente, exponemos los objetivos generales y específicos a los que pretendemos dar respuesta a lo largo de esta memoria.

1.1. INTRODUCCIÓN. LOS CROMOSOMAS B.

Definición y características generales

Todos los genomas son susceptibles de ser invadidos por elementos genéticos egoístas. Entre estos elementos destacan los elementos transponibles, los distorsionadores de la segregación, varios factores citoplasmáticos, algunos tipos de intrones y los cromosomas B. A estos últimos también se les conoce como cromosomas supernumerarios o cromosomas accesorios y fueron los primeros elementos egoístas descubiertos (Wilson 1907).

El estudio de los cromosomas B ha permitido establecer una serie de características generales, en base a las cuales Jones & Rees (1982) definieron los cromosomas supernumerarios como "cromosomas no homólogos a los cromosomas del complemento normal (cromosomas A), que no recombinan con ellos y además son totalmente dispensables". En 1993, J.P.M. Camacho & J.S. Parker los definieron, durante la *First B-Chromosome Conference*, como "cromosomas dispensables presentes en algunos individuos de algunas poblaciones de algunas especies de plantas y animales, que han surgido probablemente de los cromosomas A, pero que siguen su propio camino evolutivo, al no recombinar con ellos" (Beukeboom 1994). Además, los cromosomas B también se caracterizan por presentar mecanismos de acumulación, mitóticos y/o meióticos, que les permiten segregarse de manera no mendeliana y transmitirse con tasas superiores a las de los cromosomas A (Jones 1995).

Los cromosomas B se han descrito en multitud de especies de plantas y animales, habiéndose encontrado en un total de 1300 especies de plantas, 500 especies de animales y 10 especies de hongos. Se ha estimado que un 15% del total de especies presentan cromosomas B (véase Jones & Rees 1982, Jones 1995, Camacho 2005). Es frecuente la presencia de estos cromosomas B en especies de gramíneas, liliáceas y de ortópteros; posiblemente la facilidad para el estudio citogenético de estos grupos de especies ha facilitado su detección. Sin embargo, es posible que los cromosomas accesorios sean un fenómeno más frecuente en la naturaleza y aparezcan en la mayoría de las especies (véase Camacho 2005). Pero los problemas técnicos para estudiar el cariotipo de algunas especies, así como la imposibilidad de disponer de muestras relativamente numerosas para realizar estudios citogenéticos, probablemente han impedido su detección en otros grupos taxonómicos. Por ejemplo, la presencia de cromosomas B se ha puesto de manifiesto en los hongos tras el desarrollo de la técnica de electroforesis en campo pulsátil (PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis) (Covert 1998).

El máximo número de cromosomas B observado en un mismo individuo depende del grado de acumulación que muestre el cromosoma B, de su virulencia y de la tolerancia que la especie muestre a la presencia de estos

cromosomas (Camacho et al. 2000). Por ejemplo, el número más alto de cromosomas B encontrado ha sido en la planta *Pachyphytum fittksui* (Crassulaceae) donde se ha descrito la presencia de 50 cromosomas B en un individuo. En el maíz, el número máximo de cromosomas B encontrados en una planta, obtenida a partir de un cruce experimental, ha sido de 34 cromosomas B, que supone un 155% de incremento en el tamaño de su genoma (Jones & Rees 1982). Las especies animales por lo general toleran un menor número de cromosomas B por individuo. Sin embargo, también es posible encontrar ejemplos de especies que toleran hasta 24 cromosomas B, como, por ejemplo, el ratón *Apodemus peninsulae* (Volobujev & Timina 1980) o hasta 16 cromosomas B como la rana *Leiopelma hochstetteri* (Green 1988) o el saltamontes *Gonista bicolor* (Sannomiya 1974, para más detalle véase la Tabla 4.1 de Camacho 2005).

Pero en las poblaciones naturales no es frecuente encontrar individuos con más de tres o cuatro cromosomas B (Camacho et al. 2000). El número de cromosomas B en los distintos individuos de una población parece seguir una distribución binomial (Camacho 2005), sin embargo la frecuencia de individuos con tres o más cromosomas suele ser mucho menor, mostrando claramente que un número alto de cromosomas B suele ser perjudicial para los individuos portadores (Jones & Rees 1982).

Naturaleza de los cromosomas B

Los cromosomas B suelen ser del mismo tamaño que los cromosomas del complemento, aunque existen ejemplos de cromosomas B más grandes que los cromosomas A, como es el caso del cromosoma B de la planta *Plantago lagopus* (Dhar et al. 2002), o de cromosomas más pequeños e incluso mini cromosomas B descritos en varias especies, como en el caso de la planta *Brachycome dichromosomática* (Houben et al. 1997) o el pez *Poecilia formosa* (Schartl et al. 1995). Recientemente Schmid et al. (2006) han descrito en el pez *Alburnus alburnus* el cromosoma B más grande encontrado en un vertebrado y que representa casi el 10% del tamaño del genoma. Hewitt (1979) observó que, generalmente, los cromosomas B de tamaño grande o mediano suelen ser mitóticamente estables, es decir, aparecen en igual número en todas las células del individuo portador, mientras que los cromosomas B pequeños suelen ser mitóticamente inestables y los individuos portadores suelen ser mosaicos numéricos.

La mayoría de los cromosomas B descritos son heterocromáticos ya que contienen DNA repetitivo, principalmente DNA satélite y genes ribosómicos 45S (rDNA), aunque también se ha descrito la presencia de elementos transponibles (Camacho et al. 2000, véase Tabla 4.2 de Camacho 2005). Debido a su naturaleza heterocromática se pensaba que los cromosomas B son transcripcionalmente inactivos. Esta idea estaba apoyada por los estudios realizados con uridina tritiada, donde no se observaba actividad transcripcional asociada al cromosoma B (Fox et al. 1973, Ishak et al. 1991). Existen, sin

embargo, algunos casos donde sí se observa actividad en estos cromosomas, como por ejemplo, el cromosoma B presente en la rana *Leiopelma hochstetteri* en su estado plumoso, el cromosoma B en estado politénico del mosquito *Simulium juxtacrenobium* (Brockhouse et al. 1989) y un neoB en la avispa *Nasonia vitripennis* (Perfectti & Werren 2001). Recientemente se ha observado la transcripción de secuencias repetidas específicas de los cromosomas B de centeno y del maíz (Carchilan et al. 2007, Lamb et al. 2007, véase también la revisión de Jones et al. 2008).

Composición molecular

La naturaleza heterocromática de la mayoría de los cromosomas B se debe a que están constituidos principalmente por DNA satélite, que puede ser compartido por los cromosomas A, como en *Crepis capillaris* (Jamilena et al. 1994) o la unidad repetitiva pSsP216 en la mosca *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al. 1995); o bien ser específico del cromosoma B, como por ejemplo el DNA satélite encontrado en el cromosoma PSR (Paternal Sex Ratio) de *Nasonia vitripennis* (Nur et al. 1988). En algunas especies, como *Zea mays* o *Secale cereale*, los cromosomas B comparten secuencias de DNA repetitivo con los cromosomas A, pero además se ha observado la presencia de otras secuencias de DNA satélite específicas de los cromosomas B (véase la revisión de Puertas 2002).

Al ser heterocromáticos y al no recombinar con el resto de genoma, los cromosomas B pueden ser un lugar para la acumulación de elementos móviles (Beukeboom 1994, Camacho et al. 2000). La presencia de transposones se ha detectado en numerosos cromosomas B (véase Tabla 4.2 de Camacho 2005). El caso más llamativo es el del cromosoma PSR de *N. vitripennis*, que se encuentra prácticamente invadido por el retrotransposón NATE (Nasonia Transposable Element) (McAllister 1995, McAllister & Werren 1997). Así, los transposones pueden estar implicados en el origen y evolución de los cromosomas B.

La degeneración de un cromosoma B debe ocurrir de manera gradual hasta perder la posibilidad de recombinación con el cromosoma ancestral. Los genes que se encuentren en el cromosoma B pueden ser inactivados por la inserción de elementos móviles o al romperse el orden de la estructura del cromosoma (Camacho et al. 2000).

Los transposones también pueden estar implicados en la recombinación ectópica (Montgomery et al. 1991), favoreciendo el paso de secuencias entre cromosomas diferentes, e incluso, pueden estar implicados en el movimiento de DNA entre orgánulos citoplasmáticos y el cromosoma B. Por ejemplo, en *Brachycome dichromosomatica*, la presencia de DNA cloroplastidial en el cromosoma B se ha explicado por movimientos del retrotransposon Bd49 (Franks et al. 1996).

Recientemente, Lamb et al. (2007) han documentando uno de los primeros casos de formación de una secuencia específica del cromosoma B a partir de varios tipos de secuencias. Se trata del elemento StarkB, que se encuentra transcripcionalmente activo, y fue aislado a partir de un marcador RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) específico del cromosoma B del maíz y localizado en la región heterocromática de este cromosoma. El elemento StarkB está formado por secuencias derivadas de un elemento móvil de tipo LTR (Long Terminal Repeat) presente en los cromosomas A y de secuencias específicas del cromosoma B. En el centeno, Langdon et al. (2000) también encontraron una secuencia específica del cromosoma B, la secuencia altamente repetida E3900, que deriva de la familia de retrotransposones Ty3-gypsy, y que está implicada en la no-disyunción del cromosoma B.

Otra peculiaridad de los cromosomas accesorios es la presencia, en muchos de ellos, de genes ribosómicos 45S (rDNA). Estos genes se localizan en las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs), y generalmente suelen formar una constricción secundaria, visible en los cromosomas metafásicos. Estas constricciones son sitios cromosómicos susceptibles de rotura, y los fragmentos generados el germen para nuevos cromosomas B, lo que podría explicar la existencia de NORs en muchos de los cromosomas B descritos (Camacho et al. 2000). La expresión de las NORs, y por tanto de los genes ribosómicos, da lugar al nucleolo, el sitio de síntesis de los ribosomas (Visintin & Amon 2000). La presencia de genes ribosómicos en los cromosomas B se ha observado en multitud de especies y, por lo general, se encuentran inactivos. Hay pocos casos en los que se ha podido observar actividad nucleolar asociada a estos cromosomas extras (sólo se ha encontrado actividad en 12 especies de plantas y 8 especies de animales, para más detalle véase Green 1990, Schmid et al. 2002).

Sin embargo, la presencia de los genes rDNA 5S sólo se ha detectado en algunos cromosomas B como, por ejemplo, en el cromosoma B de *Plantago lagopus* (Dhar et al. 2002) y el cromosoma B de *Eyprepocnemis plorans* presente en las poblaciones del Cáucaso (Cabrero et al. 2003b).

En la mayoría de los casos no se ha observado la presencia de genes de copia única en los cromosomas B, posiblemente debido a la dificultad de detectarlos de forma eficiente mediante técnicas citogenéticas. Su evidencia, en muchos casos, viene de una asociación entre la presencia de cromosomas B y un cambio fenotípico observable, como por ejemplo en la planta *Happlopappus gracilis*, donde la presencia de un cromosoma B está asociada a un cambio en el color del fruto (Jackson & Newmark 1960), o los genes que controlan la tasa de transmisión de los cromosomas B en el maíz y en el centeno (véase la revisión de Jones & Houben 2005). Pero el caso más claro lo encontramos en el cromosoma B del hongo *Nectria haematococca*. La actividad de los genes de este cromosoma B le confiere a los individuos portadores resistencia frente a la pisatina, una citoalexina producida por la planta hospedadora, favoreciendo de esta manera su patogenicidad (Miao et al. 1991a, b). En *Nasonia vitripennis*, PSR produce la masculinización de cigotos 2n al producir la condensación y

posterior disgregación del juego cromosómico paterno completo, pasando de hembras a machos haploides que portan PSR (Nur et al. 1988, Werren 1991). Una situación similar ha sido descrita más recientemente en la avispa *Trichogramma kaykai* (van Vugt et al. 2003).

Comportamiento meiótico

Una característica que define a los cromosomas B es que no se suelen transmitir mendelianamente, y presentan mecanismos que les permiten acumularse en la descendencia, ya que el número de cromosomas B no está restringido a dos, como en los cromosomas A. Dicha acumulación puede ocurrir antes, durante o después de la meiosis (Jones 1991, Camacho et al. 2000, Camacho 2005).

Acumulación pre-meiótica

Durante el desarrollo embrionario, mediante no disyunción mitótica, se produce un incremento del número de cromosomas B en células de la línea germinal, de manera que cuando las células entran en meiosis generan gametos cuyo número medio de cromosomas B es significativamente más alto que el número de cromosomas B presente en el cigoto original. Este tipo de comportamiento se ha descrito para los saltamontes *Calliptamus palaestinensis* (Nur 1964), *Camula pellucida* (Nur 1969) y *Locusta migratoria* (Viseras et al. 1990) y para los cromosomas B de la planta *C. capillaris* (Rutishauser & Röthlisberger 1966).

Acumulación meiótica

Este mecanismo de acumulación suele darse en la meiosis femenina. Se basa en la asimetría funcional de los productos de la meiosis, de modo que los cromosomas B segregan preferentemente a la célula meiótica que finalmente dará lugar al oocito. Las células que originan los oocitos suelen ser de mayor tamaño que los corpúsculos polares, por lo que el polo que dará lugar al oocito es de mayor tamaño que el de los corpúsculos polares. Por movimientos continuos de polo a polo, el cromosoma B pasa más tiempo en el polo de mayor tamaño que en el más pequeño, por lo que tiene más probabilidad de quedar incluido en el oocito que en los cuerpos polares. Rebollo et al. (1998) observaron que la mayoría de los cromosomas B son capaces de reorientarse continuamente de polo a polo durante la metafase I. Este mecanismo de acumulación fue observado citológicamente en algunas especies de ortópteros y de plantas, como por ejemplo, *Lillium callosum* (Kayano 1957). Asimismo Hewitt (1976) lo estudió en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus*.

Acumulación post-meiótica

Ocurre principalmente en plantas, donde se ha observado que, durante la maduración del gametofito masculino, los cromosomas B sufren no-disyunción y las dos cromátidas migran preferentemente al núcleo generativo. Este fenómeno puede ocurrir durante la primera mitosis del grano de polen, como en *Festuca pratensis* (Bosemark 1954) y *Secale cereale* (Jones & Puertas 1993, Jamilena et al. 1997), o en la segunda mitosis, como ocurre en el maíz (Roman 1974). Este mecanismo fue propuesto por primera vez para el centeno (Hasegawa 1934) y visualizado citológicamente por Jones (véase Jones & Rees 1982).

Acumulación ameiótica

El cromosoma B de *Nasonia vitripennis* es denominado PSR (Paternal Sex Ratio) porque afecta a la proporción de sexos aumentando la proporción de machos. La avispa *N. vitripennis* es una especie haplodiploide, donde los machos son haploides y las hembras diploides. El cromosoma PSR provoca la condensación e inactivación del juego cromosómico paterno transformando los huevos fecundados en machos haploides portadores de cromosoma B, de modo que la tasa de transmisión de este cromosoma es cercana al 100% (Werren 1991).

Control de la transmisión de los cromosomas B

La acumulación de los cromosomas B también puede verse favorecida por la existencia de genes o secuencias localizadas en estos cromosomas que afectan a su propia transmisión, como es el caso de los cromosomas B de centeno (Puertas et al. 1998) y de maíz (Carlson 1986).

Control de la transmisión de los cromosomas B en el centeno, Secale cereale

En el centeno, Puertas et al. (1998) encontraron, tras una serie de experimentos con líneas de alta y baja frecuencia de cromosomas B, que en la descendencia híbrida de cruces controlados entre parentales de baja y alta frecuencia de cromosomas B, el comportamiento meiótico de estos cromosomas dependía, en gran medida, de que las madres perteneciesen a la línea de alta o de baja frecuencia (Puertas et al. 1990). Además, concluyeron que los genes que controlan la transmisión de los cromosomas B se encuentran en el propio cromosoma B, que tales genes se encuentran en sitios de formación de quiasmas y que el comportamiento meiótico de los cromosomas B es esencial para su mantenimiento a lo largo del tiempo (Puertas et al. 1998, Puertas 2002). Recientemente se han encontrado dos secuencias altamente repetidas y específicas del cromosoma B del centeno y transcripcionalmente activas, E3900 y D1100, que parecen estar implicadas en la transmisión de estos cromosomas B en esta especie (Langdon et al. 2000, Carchilan et al. 2007, Puertas 2002, para más detalle véase también la revisión de Jones et al. 2008).

Control de la transmisión de los cromosomas B en el maíz, Zea mays

Para el cromosoma B de maíz se han descrito varios mecanismos de acumulación: no-disyunción en la segunda división meiótica, fecundación preferencial de los óvulos por polen portador de cromosoma B (González-Sánchez et al. 2003) y segregación eficiente en la meiosis como univalente (Lamb et al. 2007, Puertas 2000, Jones et al. 2008). El maíz es el único caso donde las translocaciones entre el cromosoma B y los cromosomas A son frecuentes, de manera que se han utilizado para multitud de estudios citogenéticos y de expresión (Roman 1947). Estos estudios han permitido establecer cuatro regiones diferentes en el cromosoma B relacionadas con algunos de estos mecanismos de acumulación, como por ejemplo, la región eucromática distal que parece estar implicada en la no-disyunción en la segunda división meiótica (Han et al. 2007) o el bloque de heterocromatina H3, implicado en la correcta segregación de los cromosomas B univalentes (véase Lamb et al. 2007). Recientemente, los estudios moleculares han permitido detectar una serie de secuencias de DNA repetitivo específicas del cromosoma B del maíz, el elemento ZmBs y el elemento StarkB, ambos implicados en la transmisión de estos cromosomas (para más detalle véase la revisión de Jones et al. 2008). La secuencia ZmBs puede estar implicada en la función centromérica (Jin et al. 2005), en la no-disyunción (Han et al. 2007), y en la eficiente segregación de los cromosomas B en la meiosis (González-Sánchez et al. 2007). Mientras que los transcritos de StarkB pueden estar implicados como factores, que actúen en trans-, en los mecanismos de acumulación de los cromosomas B (Lamb et al. 2007).

Sin embargo, frente a la acumulación de los cromosomas B el genoma hospedador puede oponer resistencia, normalmente suprimiendo los mecanismos que les permiten a estos cromosomas acumularse durante la transmisión (Shaw 1984, Camacho *et al.* 2000, Camacho et al. 2003). En varias especies se ha demostrado la existencia de genes supresores de la acumulación de los cromosomas B, en los cromosomas del genoma hospedador, como por ejemplo, en los saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw & Hewitt 1985) y *Eyprepocnemis plorans* (Herrera et al. 1996) y en las plantas, *Secale cereale* (Müntzing 1954, Romera et al. 1991, Jiménez et al. 1995) y *Zea mays* (Carlson 1969, Rosato et al. 1996; González-Sánchez et al. 2003). Una de las primeras evidencias de estos genes la obtuvieron Nur & Brett (1985) para el insecto *Pseudococcus affinis*. Estos autores observaron que la reducción de la tasa de transmisión de los cromosomas B se debía a que algunos genotipos afectaban a la posición de estos cromosomas en la placa metafásica, y por tanto a su posterior segregación, al cambiar el grado de condensación de estos cromosomas extras.

Efectos

Uno de los temas mas controvertidos con respecto a los cromosomas B es el referente al efecto que pueden tener sobre los individuos portadores. La

presencia de cromosomas B en el núcleo de las células implica que éstos deben utilizar la maquinaria nuclear para su replicación y transmisión (Puertas 2002, Jones et al. 2008). Además, los cromosomas B suponen un incremento en la cantidad de DNA de las células de los individuos que los portan. Por ejemplo, el cromosoma B del pez *A. alburnus* representa casi el 10% del tamaño del genoma (Schmid et al. 2006), el cromosoma B de centeno incrementa el genoma en 800 Mpb, y en el maíz, el cromosoma B produce un incremento en la cantidad de DNA del 4% (Jones et al. 2008), de modo que en una planta de maíz con 34 cromosomas B el contenido de DNA incrementa un 155% (Jones & Rees 1982). Por tanto, los cromosomas B producen un incremento intraespecífico en la cantidad de DNA nuclear y es lógico pensar que produzcan algún efecto que pueda manifestarse a nivel celular y/o individual. En la mayoría de los casos descritos, el efecto de los cromosomas B puede explicarse por su mera presencia dentro del genoma (Camacho et al. 2000).

En la literatura se citan numerosas evidencias del efecto de los cromosomas B sobre procesos celulares y fisiológicos tanto en plantas como en animales. Sin embargo, su principal efecto es sobre caracteres asociados con el vigor, fertilidad y fecundidad, habiéndose observado en la mayoría de los casos un efecto perjudicial sobre la eficacia biológica de los individuos portadores, por lo que los cromosomas B podrían ser considerados parásitos genómicos (Camacho et al. 2000).

Raramente el efecto de los cromosomas B se pone de manifiesto sobre caracteres fenotípicos externos, aunque existen algunas excepciones como, por ejemplo, la planta *Haplopappus gracilis* donde la presencia del cromosoma B cambia el color de los aquenios (Jackson & Newmark 1960), o el maíz donde los individuos portadores de cromosomas B presentan las hojas rayadas (Staub 1987).

Los cromosomas B también pueden tener efecto sobre caracteres endofenotípicos, tales como la cantidad de proteínas, de RNA, la expresión de las NORs o la frecuencia de quiasmas. A nivel molecular se ha demostrado que la presencia de cromosomas B altera los niveles de expresión de genes para determinadas proteínas (Bergerard et al. 1972, Ruiz-Rejón et al. 1980; Oliver et al. 1982; Plowman & Bougourd 1994). Kirk & Jones (1982) observaron que la cantidad de RNA y de proteína nucleolar disminuía al aumentar el número de cromosomas B. Asimismo, en el saltamontes *E. plorans*, la presencia del cromosoma B puede influir en la expresión de las NORs de los cromosomas A, de manera que el número de NORs activas es mayor en individuos 1B que en individuos 0B (Cabrero et al. 1987).

El efecto de los cromosomas B sobre la frecuencia de quiasmas ha sido ampliamente analizado, puesto que este carácter está directamente relacionado con la recombinación potencial, ya que los quiasmas representan la visualización citológica del sobrecruzamiento y éste la recombinación potencial (Camacho et al. 2002, King et al. 2002). La frecuencia de quiasmas se ha estudiado en multitud de especies de plantas y animales (véase Camacho 2005). Sin embargo, los datos que se tienen al respecto son, en muchos casos,

contradictorios. Así, en la mayoría de los casos se ha observado que los cromosomas B producen un aumento en la frecuencia de quiasmas, pero también se han documentado casos en los que los cromosomas B tienen un efecto contrario o incluso ningún efecto.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el efecto que los cromosomas B tienen sobre la frecuencia de quiasmas (véase Camacho et al. 2002). En primer lugar, la influencia de los cromosomas B en la recombinación de los cromosomas del genoma se interpretó como una adaptación, ya que el incremento de recombinación conllevaría un aumento en la variabilidad genética que permitiría a las poblaciones evolucionar más rápidamente (Jones y Hewitt, 1965; Hewitt & Jones 1967). Sin embargo, esta hipótesis no explica el hecho de que se haya detectado el efecto contrario o la ausencia de éste en algunas poblaciones o especies. Por ello, recientemente se han propuesto otras hipótesis entre las que cabe destacar la hipótesis de la recombinación inducible propuesta por Bell & Burt (1990). Estos autores consideran que los cromosomas B, al igual que cualquier otro parásito, incrementan en sus hospedadores la frecuencia de recombinación, tal como predice la hipótesis de la Reina Roja (Van Valen 1973, Jaenike 1978, Hamilton 1980), obteniéndose progenie recombinante, alguna de la cual podría ser resistente a los efectos de estos cromosomas. Un estudio reciente realizado por Camacho et al. (2002) en varias poblaciones de la especie *E. plorans* demuestra que los cromosomas B aumentan la frecuencia de quiasmas en el genoma hospedador en mayor medida cuando el cromosoma B es más parasítico, mostrando así una relación entre el efecto sobre los quiasmas y el estado evolutivo en que se encuentra el cromosoma supernumerario. Estos resultados apoyaron la hipótesis de la recombinación inducible propuesta por Bell & Burt (1990). Sin embargo, no hay que olvidar que las condiciones ambientales también pueden influir en la frecuencia de quiasmas (Hoffmann & Hercus 2000).

El efecto que los cromosomas B pueden tener sobre sus portadores puede deberse también a la actividad de los genes que presenten, como son los casos del hongo *N. haematococca*, con su gen antipisatina (Miao et al. 1991a, b) y *Nasonia vitripennis* con su neo-B en el que el gen or123+ producía cambio en el color de los ojos (Perfectti & Werren 2001).

Origen

Los cromosomas B se originan presumiblemente a partir de los cromosomas A de la misma especie donde se encuentran (origen intraespecífico) o de una especie emparentada tras hibridación con ella (para una revisión reciente, véase Camacho 2005). Los cromosomas accesorios podrían ser, en última instancia, un subproducto de la evolución cariotípica, surgiendo a partir de procesos tales como, por ejemplo, la polisomía de un cromosoma A (Hewitt 1973), de fragmentos céntricos resultantes de fusiones céntricas (Hewitt 1973), o de la amplificación de la región paracentromérica de un cromosoma A (Key & Hägele, 1971). La hipótesis intraespecífica está apoyada por la existencia, en los

cromosomas accesorios, de secuencias de DNA que también aparecen en los cromosomas A. Por ejemplo, el origen de los cromosomas B de *Crepis capillaris* se puede explicar por esta hipótesis, ya que al microdisecionar el cromosoma B se ha demostrado que las secuencias que aparecen en él se encuentran también en los demás cromosomas del genoma (Jamilena et al. 1994, 1995).

Los cromosomas sexuales han podido ser el origen de algunos cromosomas B y, en algunas especies, existen evidencias que apoyan esta idea. Por ejemplo, el cromosoma B de la rana *Leiopelma hochstetteri* parece que procede del cromosoma sexual heteromórfico W, por sus similitudes morfológicas (Green et al. 1993) y en secuencia de DNA (Shabel et al. 1998). Otro ejemplo es el cromosoma B₂ de *E. plorans*, que contiene una secuencia de DNA repetitivo de 180 pb seguida de genes ribosómicos. La ordenación de estas dos secuencias respecto al centrómero sólo coincide con la del cromosoma X, por lo que cabe esperar, que en esta especie, los cromosomas B deriven de la región paracentromérica del cromosoma sexual, y que posteriormente se haya producido la amplificación de estos dos tipos de secuencias (López-León et al. 1994). Por otra parte, aunque Cabrero et al. (2003a) encuentran que, en algunas poblaciones, el cromosoma S₁₁ es polimórfico y puede llevar la misma ordenación del DNA repetitivo y el ribosómico que los cromosomas X y B, sin embargo, a diferencia de ellos, posee también, en la región paracentromérica, un cluster de rDNA 5S en todas las poblaciones analizadas (Cabrero et al. 2003b). Aunque este cluster de DNA 5S pudo perderse posteriormente del cromosoma B, parece más probable la hipótesis inicial de López-León et al. (1994) de que el cromosoma B pudo derivar del cromosoma X.

Los cromosomas B también pueden originarse como resultado de procesos de hibridación entre especies relacionadas (Battaglia 1964). La evidencia más clara a favor de esta teoría es la existencia de secuencias específicas de los cromosomas B de una especie, que guardan cierta homología con secuencias del genoma de especies emparentadas. Esta hipótesis permite explicar el origen de los cromosomas B en algunas especies. El caso más documentado es el del cromosoma PSR de la avispa *Nasonia*, donde un análisis filogenético de un retroelemento muestra que las secuencias de este transposon, presentes en el cromosoma PSR, son más parecidas a las copias presentes en especies relacionadas del género *Trichomalopsis* que a las copias existentes en el propio genoma de *Nasonia* (McAllister & Werren 1997). Además, esta teoría se ha demostrado empíricamente al observarse la formación *de novo* de un cromosoma B a través de cruzamientos controlados entre especies emparentadas (Sapre & Deshpande 1987, Shartl et al. 1995, Perfectti & Werren 2001).

En la planta *Plantago lagopus*, el origen de un cromosoma B pareció estar asociado con la amplificación masiva de rDNA 5S tras la fragmentación de un cromosoma A aneuploide (Dhar et al. 2002). El origen de los microcromosomas B de la planta *Brachycome dichromosomatica* también se ha asociado a la evolución rápida de secuencias repetidas en tándem (Houben et al. 2001). En esta especie se ha propuesto una relación evolutiva entre los

cromosomas B y los segmentos cromosómicos supernumerarios de los cromosomas A, de tal forma que las secuencias de DNA que sirvieron de base para crear los cromosomas B fueron liberadas de uno de estos segmentos supernumerarios, siendo luego estabilizadas por la adición de secuencias teloméricas y otras secuencias repetidas (Jones and Houben 2003). Una situación similar podría haberse producido en el maíz, donde los cromosomas B contienen secuencias de DNA procedentes de varios cromosomas A (Page et al. 2001) y también de segmentos supernumerarios de los A, los llamados *knobs* (Alfenito and Birchler 1993).

Mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones

Se han propuesto varios modelos para explicar la permanencia de los cromosomas supernumerarios en las poblaciones. Los dos modelos más aceptados proponen que la frecuencia de los cromosomas B se encuentra actualmente en equilibrio en las poblaciones. El modelo parasítico-egoísta (Östergren 1945, Jones 1985, Shaw & Hewitt 1990) considera que la frecuencia actual de cromosomas B es el producto de un equilibrio entre los mecanismos de acumulación, que aumentan la frecuencia, y el efecto negativo que tienen estos cromosomas extras sobre la eficacia biológica en los individuos portadores, que disminuyen su frecuencia. En cambio, el modelo heterótico, propuesto en 1973 por White, considera que los cromosomas B se mantienen en equilibrio en las poblaciones debido al efecto beneficioso que tienen sobre sus portadores, cuando los cromosomas B se encuentran en bajo número, y a su efecto negativo cuando están en número elevado. La mayoría de los cromosomas B estudiados puede decirse que siguen el modelo parasítico, siendo, en la mayoría de los casos, perjudiciales para los individuos portadores (véase Camacho et al. 2000). Uno de los pocos casos conocidos de cromosoma B heterótico es el que presenta la planta *Allium schoenoprasum* (Plowman & Bougourd 1994). Este cromosoma B no presenta acumulación y se ha comprobado que las plantas portadoras de cromosomas B sobreviven mejor en el desarrollo de semilla a plántula en hábitat naturales. Otro caso, es el del cromosoma B del hongo *Nectria haematococca* que confiere resistencia frente a la pisatina, un antibiótico producido por el guisante, la planta parasitada por este hongo (Miao et al. 1991a, b).

El estudio del polimorfismo de los cromosomas B del saltamontes *E. plorans* - especie en la que se han descrito más de 50 tipos diferentes de cromosomas B (Henriques-Gil et al. 1984, López-León et al. 1993, Bakkali 2001) ha permitido proponer un modelo no estacionario (o de no equilibrio) que permite explicar el polimorfismo y el mantenimiento de estos cromosomas en las poblaciones naturales (Camacho et al. 1997). Estos autores proponen que un cromosoma B parásito puede llegar a ser neutralizado por el genoma hospedador, es decir, pierde su capacidad de acumularse en la descendencia, pudiendo, incluso, ser reemplazado por una nueva variante parasítica (Zurita et al. 1998). Bajo este modelo, la frecuencia de cromosomas B no tiene por qué ser estable, aunque las variaciones en frecuencia son pequeñas cuando el

cromosoma B es casi neutro. En este caso, la frecuencia de estos cromosomas depende en gran medida de procesos estocásticos y las fluctuaciones pueden estar inversamente relacionadas con el tamaño de población (Camacho et al. 1997). Este modelo también puede servir para explicar la evolución a lo largo del tiempo de otros elementos genéticos egoístas (Johnson 1997).

Dinámica y evolución de los cromosomas B

Camacho (2005) ha propuesto un modelo general explicativo de la dinámica evolutiva de los cromosomas B al integrar todos los modelos propuestos hasta el momento para explicar el mantenimiento de estos cromosomas en las poblaciones.

El modelo parte de un cromosoma B parasítico, que presentaría mecanismos de acumulación que le permitirían aumentar en frecuencia en la población y así invadirla rápidamente (véase Fig. 1.1). Aunque hay que tener en cuenta que un cromosoma B heterótico también debería invadir rápidamente una población, el modelo se centra principalmente en el carácter parasítico que presentan la mayoría de los cromosomas B descritos.

El incremento en frecuencia del cromosoma B llega a ser una carga para el genoma hospedador debido tanto a la virulencia (al efecto perjudicial) como al incremento de individuos que portan números altos de estos cromosomas. Se produce un conflicto intragenómico entre el genoma hospedador y los cromosomas B (Camacho et al. 2003), de manera que el genoma hospedador puede desarrollar mecanismos de resistencia a los cromosomas B, como por ejemplo, un aumento en la frecuencia de alelos en los cromosomas A que supriman la acumulación de los cromosomas B.

Si los genes que suprimen la acumulación (genes de resistencia) del cromosoma B tienen un coste insignificante o menor a la virulencia de los cromosomas B, estos pueden llegar a ser neutralizados, dando lugar a la supresión de la acumulación. El B neutralizado puede llegar a desaparecer de la población por acción de la deriva y de la selección natural, lo que depende del tamaño de la población. Incluso puede ocurrir, dada la alta tasa de mutabilidad de estos cromosomas, que se produzca una mutación y se origine una nueva variante de cromosoma B que presente mecanismos de acumulación, de manera que pueda invadir de nuevo la población y regenerar el polimorfismo (Camacho et al. 1997, Zurita et al. 1998).

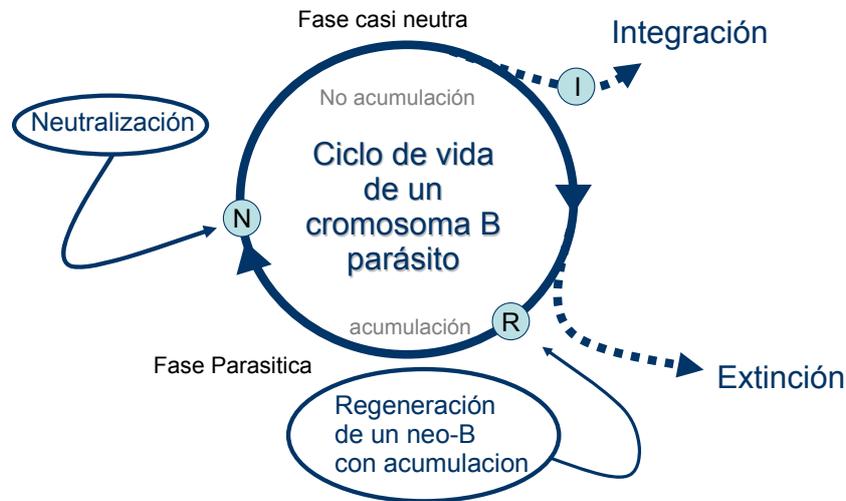


Figura 1.1. Dinámica evolutiva de un cromosoma B parásito.

En cambio, si la resistencia tiene un coste en la eficacia biológica de los individuos portadores, se obtiene un equilibrio en la frecuencia de cromosomas B a lo largo del tiempo, donde el genoma hospedador puede mostrar cierta tolerancia a los cromosomas B y el cromosoma B cierta atenuación (Camacho et al. 2003). Este equilibrio en la frecuencia de cromosomas B también puede producirse si existe un equilibrio entre selección y deriva genética en poblaciones de gran tamaño (Camacho et al. 1997).

Si un parásito está bien adaptado no debería dañar a su hospedador, ya que la debilidad o la muerte del hospedador pueden causar la muerte de los parásitos (Hoeprich 1977, Alexander 1981). Sin embargo, análisis teóricos y comparativos sugieren que esto no es necesariamente así (Anderson & May 1982, Ewald 1987), y que el modo de transmisión de los parásitos influye en la evolución de la virulencia del parásito (Anderson & May 1982), de manera que los parásitos de transmisión horizontal, tales como virus y bacterias, tienden a ser más virulentos que los de transmisión vertical, como es el caso de los cromosomas B, ya que, en último caso, su eficacia biológica está ligada a la eficacia biológica de sus hospedadores (para más detalle véase Camacho et al. 2000, 2003).

El nivel de tolerancia puede ser visto como la norma de reacción de un genotipo expuesto a distinto grado de parasitismo, es decir, a distinto número de cromosomas B. Un genotipo tolerante debería ser capaz de portar cromosomas B con una reducción de la eficacia biológica menor que los

individuos no tolerantes. Camacho et al. (2003) sugieren que el genoma del hospedador puede mostrar distintos grados de tolerancia: *intolerancia completa*, cuando la eficacia biológica de los portadores disminuye con el incremento del número de cromosomas B; *tolerancia incompleta*, cuando la eficacia biológica no se ve afectada a bajo número de cromosomas B, pero disminuye con número alto de cromosomas B; *tolerancia completa*, cuando la eficacia biológica es independiente de número de cromosomas B; y *sobretolerancia*, cuando la eficacia biológica aumenta con el número de cromosomas B, lo que correspondería con el modelo heterótico. El efecto perjudicial de la mayoría de los cromosomas B en alto número (Jones & Rees 1982), indica que la respuesta más común del genoma hospedador es la tolerancia incompleta, y correspondería con el modelo parasítico-egoísta (Östergren 1945, Jones 1985, Shaw & Hewitt 1990).

Una vez que el cromosoma B llega a ser más o menos estable, puede evolucionar a través de varias alternativas: i) extinguirse de la población por deriva y selección, ii) continuar siendo un parásito genómico iii) o integrarse dentro del genoma hospedador adquiriendo, o no, alguna función (Camacho 2005).

Los cromosomas B podrían llegar a ser esenciales dentro de los genomas de las especies que lo portan, llegando a integrarse en el genoma y originando un nuevo cromosoma A. Últimamente esta posibilidad está siendo considerada, y recientemente se han publicado algunos trabajos que apoyan esta hipótesis. Un cromosoma B puede integrarse en el genoma de varias maneras: regulando su comportamiento mitótico y/o meiótico, adquiriendo alguna función que beneficie a los individuos portadores o mediante fusiones espontáneas con alguno de los cromosomas del complemento (Camacho 2005). Araújo et al. (2001) sugirieron un proceso de integración para los cromosomas B de alguna de las poblaciones de la avispa solitaria *Trypoxylon albitarse* ya que observaron que estos cromosomas presentaban valores uniformes de un cromosoma por genoma haploide en ciertas poblaciones, mientras que en las poblaciones recientemente invadidas la frecuencia era más variable. Los cromosomas B pueden llegar a formar parte del complemento estándar simplemente adquiriendo mecanismos que regulen su meiosis, de manera que puedan aparear durante la profase I y segregarse a cada polo de la anafase I. En los organismos diploides estos dos requisitos, apareamiento y migración a cada polo, deben cumplirse en los dos sexos, por lo que en las especies diploides la integración por este mecanismo sería más complicada. En los organismos haplodiploides, como la avispa *T. albitarse* (véase Araújo et al. 2001), la meiosis sólo ocurre en el sexo femenino, por lo que en estos organismos puede que sea más fácil la integración de un cromosoma B en el genoma, adquiriendo un comportamiento mitótico normal en los machos y regulando su comportamiento en la meiosis femenina.

Otra vía propuesta para que ocurra la integración implica que el cromosoma B neutralizado adquiera algún tipo de beneficio para los individuos que lo portan. Este mecanismo de integración se ha propuesto para explicar el origen del cromosoma Y de *Drosophila* (Carvalho 2002). Este cromosoma ha sido el

primer cromosoma heterocromático en ser caracterizado tanto genética como citológicamente. Hackstein et al. (1996) propusieron que el cromosoma Y de *Drosophila* pudiera proceder de un cromosoma B, que pudo haber adquirido apareamiento y segregación con el cromosoma X. En el cromosoma Y se ha producido la acumulación de genes relacionados con la función masculina, presumiblemente adquiridos del genoma A, que se han fijado por ausencia de recombinación y por aportar alguna ventaja a los individuos portadores. Sin embargo, aunque este cromosoma Y se considera homólogo del cromosoma X, porque aparea con él, no está implicado en la determinación del sexo en *Drosophila*, que depende, únicamente, de la proporción existente entre los cromosomas X y los autosomas.

Las fusiones espontáneas, que suelen producirse entre los cromosomas A y B, es otra vía que puede permitir la integración de estos cromosomas supernumerarios en el genoma. Esta hipótesis podría estar apoyada por la enorme cantidad de translocaciones espontáneas que se han encontrado entre los cromosomas A y B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil et al. 1984, Cabrero et al. 1987), siendo la mayoría fusiones céntricas. Sin embargo, las translocaciones recíprocas entre cromosomas A y B disminuyen mucho la eficacia biológica de los individuos portadores, por lo que se les considera una vía improbable para la integración de los Bs en el genoma A (Bakkali et al. 2003).

1.2. EL SISTEMA DE CROMOSOMAS B DE *EYPREPOCNEMIS PLORANS*

La especie

La especie de saltamontes *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera, Acrididae) fue descrita por primera vez por Charpentier en 1825. Esta especie incluye cuatro subespecies: *E. plorans plorans* (Charpentier 1825), *E. plorans ornatipes* (Walter 1870), *E. plorans ibandana* (Giglio-Tos 1907) y *E. plorans meridionalis* (Uvarov 1921) (para más detalle véase la revisión de Dirsh 1958). El saltamontes *E. plorans plorans* se distribuye a lo largo de todo el litoral Mediterráneo, el Cáucaso, Turquía, Turkmenistán, Irán y el sur-oeste de Arabia (Dirsh 1958, Bakkali 2001). Dentro de la Península Ibérica se encuentra en toda la región mediterránea, desde Tarragona hasta Huelva. El material utilizado en este trabajo pertenece a la subespecie *E. plorans plorans* (Fig. 1.2), y para simplificar en adelante mencionaremos solo el nombre específico.

Este saltamontes presenta una única generación anual, desde julio a marzo, presentando un máximo de densidad poblacional en el mes de octubre, especialmente para los machos (Hernández & Presa 1984). Se trata de una especie polífaga, con capacidad gregaria y un elevado poder de dispersión, lo que aumenta su posibilidad de descubrir nuevos ambientes (Hernández & Presa 1984).

El tamaño del genoma de *E. plorans* es de aproximadamente 7900×10^6 pb (Cabrero et al. datos no publicados). Su complemento cromosómico es el típico de la familia Acrididae, es decir, está formado, en los machos, por 22 autosomas y un cromosoma X telocéntricos, que se clasifican en tres grupos según su tamaño: cromosomas largos (L_1 - L_2), medianos (M_3 - M_8) y pequeños (S_9 - S_{11}), siendo el X de tamaño intermedio entre los cromosomas L_2 y M_3 . El sistema cromosómico de determinación del sexo en esta especie es X0/XX, siendo los machos X0 y las hembras XX. En la mayoría de las poblaciones estudiadas se ha descrito la presencia de cromosomas B.



Figura 1.2. Macho y hembra de *Eyprepocnemis plorans plorans*.

Los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*

El sistema de cromosomas B de *E. plorans* es uno de los más estudiados (véase Camacho et al. 2000, 2003). Se caracteriza por presentar un comportamiento mitótico estable, es decir, todas las células de un individuo tienen el mismo número de cromosomas B y por ser muy polimórfico, con más de 50 variantes diferentes descritas (Henrique-Gil et al. 1984, López-León et al. 1993, Bakkali 2001, López-León et al. 2008).

La presencia de cromosomas B en el saltamontes *E. plorans* se ha observado también en varias poblaciones del Cáucaso, tales como Dagestan (Rusia) (Cabrero et al. 2003b) y Armenia (López-León et al. 2008), así como en varias poblaciones de Turquía (López-León et al. 2008), Grecia (Abdelaziz et al. 2007), Italia (López-Fernández et al. 1992) y Marruecos (Bakkali 2001). También se ha observado la presencia de cromosomas B en la mayoría de las poblaciones españolas de este saltamontes (Camacho et al. 1980, Henriques-Gil et al. 1984, Cabrero et al. 1997, Riera et al. 2004). En las poblaciones situadas en la cabecera del río Segura, en la provincia de Albacete, sin embargo, no se ha observado la presencia de cromosomas B (Cabrero et al. 1997).

Los cromosomas B presentes en las poblaciones del este de Europa, correspondientes a las poblaciones del Cáucaso, Turquía y Grecia, se caracterizan por presentar gran cantidad de rDNA 45S y muy poca cantidad de satDNA de 180 pb, específico de *E. plorans* (López-León et al. 2008, Cabrero et al. 2003b). La única excepción es el cromosoma B_{4a} de Armenia que es eucromático y no lleva ninguna de estas dos secuencias (López-León et al. 2008). En cambio, en las poblaciones españolas y marroquíes, los cromosomas B presentan aproximadamente la misma proporción de satDNA que de rDNA 45S, excepto los cromosomas B₅ y B₂₄ donde la proporción de satDNA es incluso mayor que la de rDNA 45S (Cabrero et al. 1999, Bakkali 2001, López-León et al. 2008). Posiblemente el origen de los cromosomas B de las poblaciones del este y del oeste de Europa sea independiente. La presencia de genes rDNA 5S en el cromosoma B del Cáucaso sugiere que este cromosoma posiblemente se ha originado del cromosoma S₁₁, el cual, en esa misma población, también contiene los tres tipos de DNA repetitivo: satDNA y rDNA 45S y 5S (Cabrero et al. 2003b). En cambio, en las poblaciones españolas la ordenación de las secuencias de satDNA y rDNA 45S con respecto al centrómero coincide con la del cromosoma X, por lo que cabe esperar, que los cromosomas B en estas poblaciones puedan derivar de la región paracentromérica del cromosoma sexual, y que posteriormente se haya producido la amplificación de los dos tipos de secuencias (López-León et al. 1994).

En las poblaciones españolas se han descrito varios polimorfismos para los cromosomas B: los cromosomas B₁, B₂, B₅ y B₂₄. El cromosoma B₁ es el más ampliamente distribuido en la Península Ibérica, por lo que se le considera el B ancestral (Henriques-Gil et al. 1990). La existencia de otras variantes predominantes en otras regiones indica que se han producido, al menos, tres procesos de sustitución de una variante por otra: i) la del cromosoma B₁ por el

cromosoma B₂ en las poblaciones de la costa granadina y del este de Málaga, ii) la del cromosoma B₁ por el cromosoma B₅ en las poblaciones cercanas a Fuengirola (Málaga) y iii) la sustitución del cromosoma B₂ por el cromosoma B₂₄ en la población malagueña de Torrox (Zurita et al. 1998).

Para explicar el polimorfismo de cromosomas B en las poblaciones españolas del saltamontes *E. plorans* (eg, Henriques-Gil et al. 1990, López-León et al. 1993) y su mantenimiento en las poblaciones, Camacho et al. (1997) propusieron un modelo dinámico de evolución de los cromosomas B (véase la introducción de cromosomas B de esta memoria).

El cromosoma B₂ de *Eyprepocnemis plorans*, presente en las poblaciones de la costa granadina y del oeste de Málaga, ha sido hasta el momento uno de los cromosomas B más estudiados. Estos estudios han permitido definir a este cromosoma como un cromosoma B neutralizado por el genoma hospedador, al no presentar mecanismos de acumulación, ni efecto en rasgos relacionados con la eficacia biológica de los individuos portadores de un número bajo de cromosomas B (López-León et al. 1992; Camacho et al. 1997, Martín-Alganza et al. 1997). Sin embargo, se ha demostrado que la presencia del cromosoma B₂ disminuye la fertilidad de las hembras portadoras de un número alto de cromosomas B (Muñoz et al. 1998) e influye en la frecuencia de quiasmas (Camacho et al. 1980) y en la expresión de las NORs de los cromosomas A, aunque en este último caso el efecto depende de la población analizada. Así por ejemplo, se ha observado que el cromosoma B₂, de la población de Salobreña, puede influir en la expresión de las NORs de los cromosomas A (Cabrero et al. 1987), de manera que la actividad de las NORs es más alta en los individuos 1B que en los individuos 0B. Sin embargo, en la población de Jete no se observa ningún efecto del cromosoma B₂ en la actividad de dichas NORs (López-León et al. 1995).

En cuanto a la expresión de genes presentes en los cromosomas B₂ de *E. plorans*, la única actividad descrita hasta ahora es la del rDNA 45S que este cromosoma posee en su región distal, pero fue un evento excepcional en un único macho que presentaba el B fusionado con el autosoma L₁ (Cabrero et al. 1987).

Mediante cruzamientos controlados, Herrera et al. (1996) demostraron la existencia de genes supresores de la acumulación de los cromosomas B en *E. plorans*. Estos autores observaron que las hembras con 1B, al copular con machos 0B de su misma población transmitían el B a una tasa mendeliana pero, al copular con machos de una población albaceteña donde no hay Bs, acumulaban significativamente su cromosoma B. Los autores concluyeron que en el genoma de las poblaciones de *E. plorans* con cromosomas B existen genes que suprimen la acumulación de estos cromosomas, mientras que en las poblaciones sin cromosoma B estos genes están ausentes.

Los cromosomas B₁ y B₅ tampoco presentan acumulación (López-León et al. 1992). El único cromosoma B de *E. plorans* en el que se ha observado acumulación ha sido el cromosoma B₂₄ (Zurita et al. 1998), característico de las

poblaciones de *E. plorans* cercanas a Torrox (Málaga). En estas poblaciones se observó que el 61% de las hembras presentaba acumulación para este cromosoma, transmitiéndolos con una tasa de 0,696, superior a la tasa de transmisión mendeliana (0,5). Además, se observó que este cromosoma disminuía la fertilidad de las hembras portadoras (Zurita et al. 1998). El cromosoma B_{24} se considera un cromosoma en estado parasítico, por sus efectos negativos en la fertilidad de las hembras portadoras y por su capacidad para transmitirse a tasas superiores a las mendelianas. La acumulación presentada por el cromosoma B_{24} parece haber sido decisiva para desplazar al cromosoma B_2 neutralizado en esta población por el genoma hospedador (Zurita et al. 1998).

Recientemente se ha observado que el cromosoma B_{24} ha sido neutralizado rápidamente por el genoma hospedador (Perfectti et al. 2004) y es menos virulento, pues se ha constatado incluso la ausencia de efecto del cromosoma B_{24} en la fecundidad de las hembras de la población de Algarrobo (Málaga), población cercana a Torrox (Manrique-Poyatos et al. 2006). La rápida supresión de la acumulación del cromosoma B_{24} observada en la población de Torrox en tan sólo 6 años podría explicarse por la existencia, en los cromosomas A, de un único *locus* o unos pocos *loci* con gran efecto neutralizador (Perfectti et al. 2004).

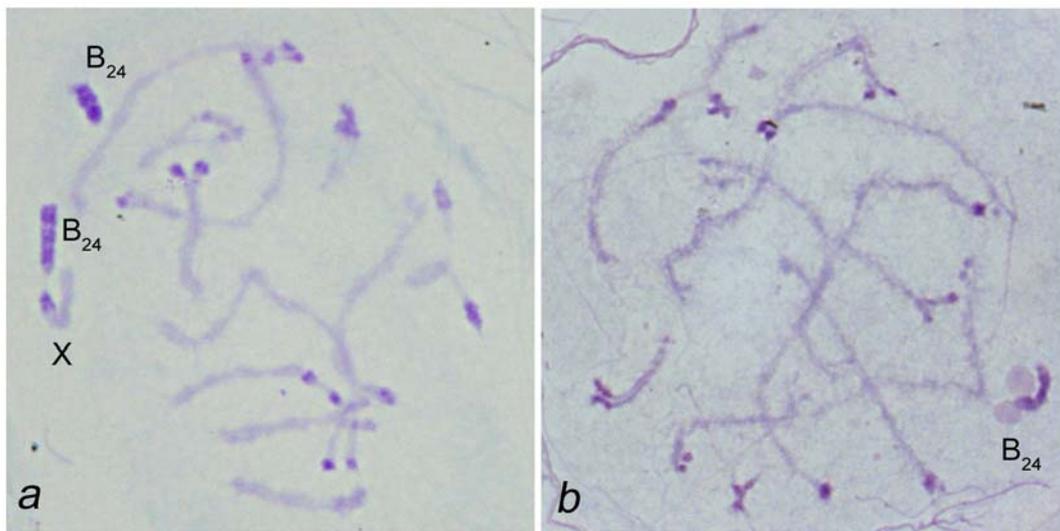


Figura 1.3. Espermatocitos primarios sometidos a bandeo C, mostrando los cromosomas B_{24} de machos capturados en Torrox (Málaga). *a)* muestra una célula en paquitene tardía donde se observan dos cromosomas B_{24} . *b)* corresponde a una paquitene donde el cromosoma B_{24} presenta dos nucleolos asociados.

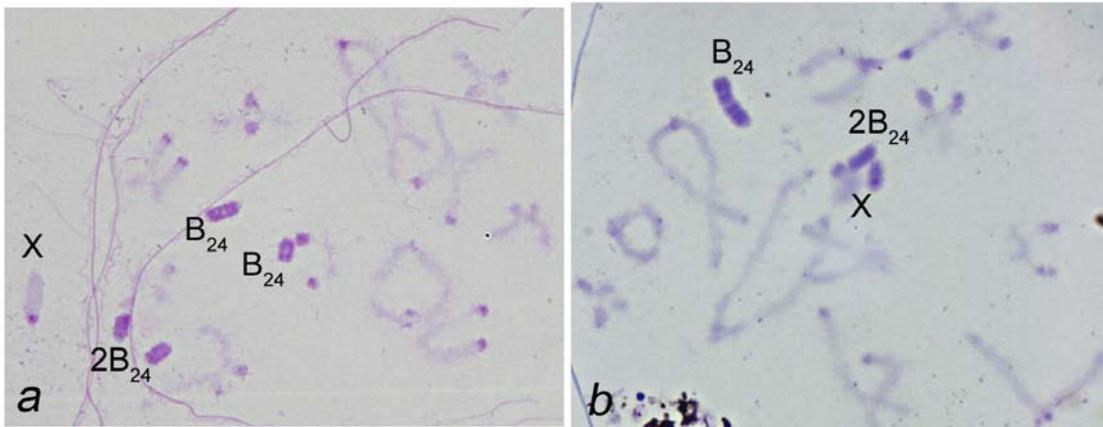


Figura 1.4. Espermatocitos primarios sometidos a bandeo C, mostrando los cromosomas B_{24} de machos capturados en Torrox (Málaga). *a)* aparece una diplotene de un macho portador de 4 cromosomas B_{24} . *b)* muestra una diplotene con dos cromosomas B_{24} y una variante de cromosoma B_{24} de mayor tamaño, con 4 bloques de heterocromatina.

El cromosoma B_{24} tiene la mitad del tamaño del cromosoma X y se caracteriza por presentar tres bloques de heterocromatina, con unas cinco veces más satDNA que rDNA 45S (Cabrero et al. 1999). En las Fig. 1.3 y 1.4 se pueden observar varios ejemplos de cromosoma B_{24} y algunas variantes de este cromosoma observadas en muestras tomadas a lo largo de los últimos 4 años. Este cromosoma es la variante más frecuente en la población de Torrox. Sin embargo, en esta población también es posible encontrar, en algunas ocasiones, un cromosoma B pequeño (Cabrero et al. 1999), y muy raramente las variantes B_2 y B_1 , que prácticamente han desaparecido de esta población.

La frecuencia de cromosomas B_{24} en la población de Torrox es muy elevada (véase Tabla 2.2 de Material y Métodos), y se ha mantenido constante a lo largo de los últimos cuatro años (Fig. 1.5). Esta frecuencia es mayor en los machos (1,35) que en las hembras (1,17), aunque estas diferencias no son significativas ($F(1, 431) = 2,33$, $p = 0,128$). El máximo número de cromosomas B presentes en un individuo lo hemos encontrado en un macho capturado en el año 1999, portador de seis cromosomas extra. En las hembras, sin embargo, el mayor número fue cuatro en una hembra capturada en 2007 (véase Tabla 2.2 de Material y Métodos). En Torrox, la mayoría de los individuos presentan uno o dos cromosomas B (Fig. 1.6). La baja frecuencia de individuos, especialmente hembras, con más de dos cromosomas B sugiere que los cromosomas B tienen efecto deletéreo en los individuos portadores de números elevados (Jones & Rees, 1982).

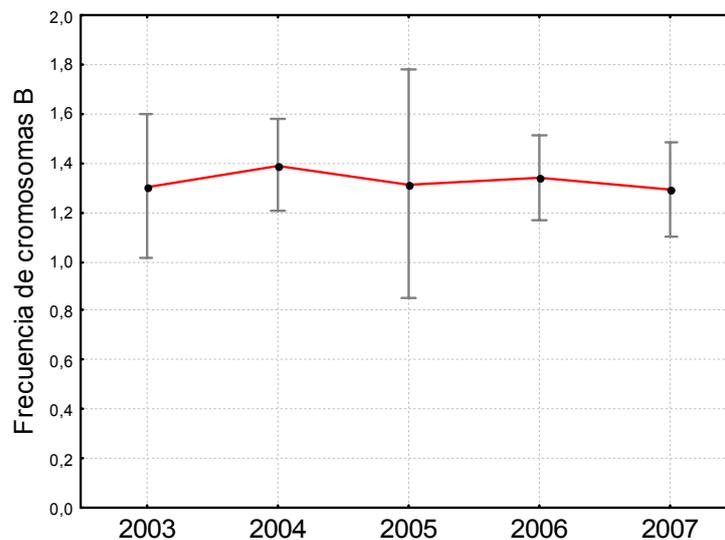


Figura 1.5. Frecuencia de cromosomas B a lo largo de los cinco años muestreados en Torrox. Mediante un ANOVA de 1 vía, utilizando la frecuencias de B como variable dependiente y el año muestreado como factor, observamos que la frecuencia de cromosomas B en la población de Torrox se ha mantenido constante a lo largo de estos últimos años ($F(4, 422) = 0,14$, $p = 0,965$).

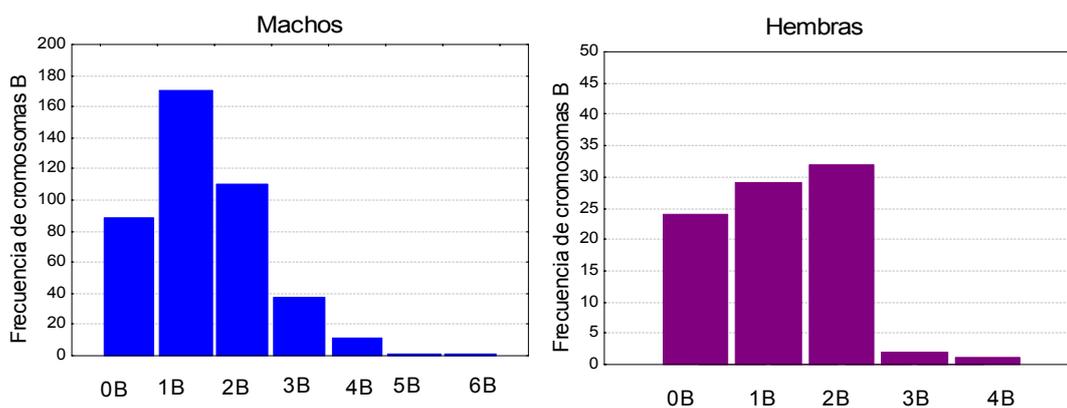


Figura 1.6. La distribución de cromosomas B_{24} en la población de Torrox, categorizada por sexo, pone de manifiesto que aparecen pocas hembras con número elevado de cromosomas B.

A lo largo de tres décadas se han estudiado multitud de aspectos de los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*, tales como su transmisión, sus posibles efectos en multitud de rasgos individuales, su posible origen y su dinámica y evolución dentro del conflicto intragenómico existente entre el genoma hospedador y los cromosomas B. Sin embargo, aunque sabemos que estos cromosomas B están compuestos mayoritariamente por satDNA y rDNA 45S, existe un déficit de información a nivel de qué otras secuencias de DNA contienen, y acerca de la evolución y posible expresión de las secuencias de DNA presentes en el cromosoma B.

1.3. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente memoria de Tesis Doctoral es continuar esclareciendo el significado biológico y la evolución de los cromosomas B de *Eyrepocnemis plorans*, especialmente del cromosoma B₂₄ presente en Torrox (Málaga). En concreto, nos planteamos dar respuesta a los siguientes interrogantes:

Objetivos generales

1. ¿Realmente los cromosomas B de *Eyrepocnemis plorans*, presentes en las poblaciones españolas, se han originado del cromosoma X como sugieren los estudios realizados por López-León et al. en 1994? Si no fuese así, ¿existen otros posibles cromosomas A que pudieran ser los antecesores de los Bs?

2. ¿Existen genes codificadores con capacidad de expresión en los cromosomas B de *E. plorans*? Y si existen, ¿se expresan?

3. ¿Tienen los cromosomas B de *E. plorans* efecto sobre los individuos portadores? Si es así, ¿se produce ese efecto a los niveles génico, celular o individual?

Objetivos específicos

A su vez, para resolver los interrogantes principales, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Averiguar si en los cromosomas B de *E. plorans* existen otras secuencias, además del DNA satélite de 180 pb y de los genes ribosómicos 45S. Si es así, ¿qué tipo de secuencias?

2. Determinar la similitud entre secuencias presentes en los cromosomas B y en los cromosomas A. Investigar si las secuencias del B evolucionan de forma independiente de las de los cromosomas A, tal como se espera de elementos que no recombinan entre sí.

3. Detectar, mediante los patrones de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3-K9), si los cromosomas B tienen predisposición para la actividad génica.

4. Profundizar en la dinámica de la expresión de los genes ribosómicos del cromosoma B₂₄.

5. Conocer si los cromosoma B afectan a la expresión de los genes presentes en los cromosomas A de *E. plorans*, y más concretamente, si tienen efecto sobre la expresión de los genes ribosómicos y si afectan a la expresión de los genes de la proteína Hsp70.

6. Comprobar si los cromosomas B tienen algún efecto en la morfología nucleolar.

7. Averiguar si los cromosomas B afectan a la morfología celular, a la tasa de división celular o a la de apoptosis.

8. Demostrar si los cromosomas B tienen efectos a nivel de la producción de espermatidas.

9. Investigar si los cromosomas B influyen en algún rasgo fenotípico externo.



Material y Métodos

En el siguiente capítulo, describimos el material utilizado en los diferentes experimentos llevados a cabo a lo largo de este proyecto de Tesis. Asimismo, describimos en detalle tanto las técnicas y protocolos seguidos, como la preparación de los reactivos utilizados.

2.1. MATERIAL

El material utilizado para la realización de esta Tesis Doctoral han sido machos y hembras adultos del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* de varias poblaciones cercanas a la localidad de Torrox, en la provincia de Málaga. Concretamente, hemos muestreado las poblaciones Torrox 0, Torrox 2 y Torrox 4, esta última situada en la desembocadura del río Torrox (véase Fig. 2.1).

Para algunos estudios hemos muestreado también una población de *E. plorans* situada en Salobreña (Granada). Para el estudio poblacional del área nucleolar, hemos utilizado especímenes de la población de Smir (Marruecos), de la población de Salobreña y de la población de Torrox 4, cedidos por el Dr. Mohammed Bakkali, el Dr. José María Corral y el Dr. Juan Luis Santos, respectivamente.

En la Tabla 2.1 aparece un resumen del material utilizado para la realización de los diferentes experimentos a lo largo de este proyecto de Tesis Doctoral. En la Tabla 2.2 se observa la frecuencia de cromosomas B en las diferentes muestras utilizadas a lo largo de este trabajo.



Figura 2.1. Imagen aérea del municipio de Torrox (Málaga) donde aparecen señaladas las diferentes poblaciones del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* muestreadas a lo largo de este proyecto de Tesis Doctoral: Torrox 0, Torrox 2 y Torrox 4.

Tabla 2.1. Descripción del material utilizado en los diferentes experimentos a lo largo de este proyecto.

Población	Año	Sexo	Experimentos	
Smir	1997	Machos	Área nucleolar	
Salobreña	1997	Machos	Área nucleolar	
	2006	Machos	Rasgos morfológicos Expresión de los niveles de hsp70	
Torrox 0	2006	Machos	Rasgos morfológicos Expresión de los niveles de hsp70	
	^(a) 2006	Machos	Microdissección Microscopía electrónica	
	2007	Machos	Rasgos morfológicos Expresión de los niveles de hsp70	
		Hembras	Rasgos morfológicos, Expresión de los niveles de hsp70	
Torrox 2	2006	Machos	Rasgos morfológicos Expresión de los niveles de hsp70	
	2007	Machos	Rasgos morfológicos	
		Hembras	Rasgos morfológicos, Expresión de los niveles de hsp70	
	Torrox 4	1999	Machos	Área nucleolar Frecuencia de quiasmas
2003		Machos	Área nucleolar Frecuencia de quiasmas Citometría de flujo Extracción de ADN genómico	
		Hembras	Citometría de flujo Fijación de puestas de embriones	
		2004	Machos	Área nucleolar Frecuencia de quiasmas Extracción de ADN genómico
			Machos	Inmunofluorescencia Microscopía electrónica
2005		Hembras	Microscopía electrónica Fijación de puestas de embriones	
		^(b) 2005	Machos	Citometría de flujo
		Hembras	Citometría de flujo	

a) Corresponde a un muestreo realizado en el mes de noviembre de 2006

b) Machos de Torrox 4, criados en el laboratorio a partir de las puestas de saltamontes obtenidas de los individuos capturados en 2005

Tabla 2.2. Frecuencia de cromosomas B en las diferentes poblaciones analizadas.

Población	B	Año	Sexo	N	Número de cromosomas B							Media de B
					0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	
Smir	B ₁	1997*	Machos	15	4	8	3	-	-	-	-	0,933
Salobreña	B ₂	1997*	Machos	15	3	8	4	-	-	-	-	1,067
		2006	Machos	33	8	13	9	2	1	-	-	1,242
Torrox 0	B ₂₄	2006	Machos	51	12	20	12	4	2	1	-	1,353
		^(a) 2006	Machos	22	4	11	7	-	-	-	-	1,136
		2007	Machos	22	4	9	7	2	-	-	-	1,318
			Hembras	27	8	5	14	-	-	-	-	1,222
Torrox 2	B ₂₄	2006	Machos	54	7	25	17	4	1	-	-	1,389
		2007	Machos	20	2	9	6	2	1	-	-	1,550
			Hembras	40	10	18	11	1				1,100
Torrox 4	B ₂₄	1999*	Machos	14	2	5	4	1	1	-	1	1,857
		2003	Machos	28	6	9	8	3	2	-	-	1,500
			Hembras	21	6	8	7	-	-	-	-	1,048
		2004	Machos	112	27	39	24	19	3	-	-	1,393
		2005	Machos	19	4	8	5	1	1	-	-	1,316
			Hembras	13	5	^(c) 8	-	-	-	-	-	-
		^(b) 2005	Machos	17	6	7	4	-	-	-	-	0,882
	Hembras	17	6	^(c) 11	-	-	-	-	-	0,882		

* No corresponden a muestras tomadas al azar

a) Corresponde a un muestreo realizado en el mes de noviembre

b) Machos de Torrox, criados en el laboratorio a partir de las puestas de saltamontes obtenidas de los individuos capturados en 2005

c) Corresponde a hembras +B

2.2. PROTOCOLOS

TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA

Los saltamontes, una vez capturados en el campo, se llevaron al laboratorio donde, en algunos casos, se mantuvieron vivos en cajas de madera a aproximadamente 25 °C y 30% de humedad con ciclos de luz de 12 horas. Estos individuos fueron alimentados con lechuga iceberg y agua. En otros casos, los individuos se fijaron directamente.

1. FIJACIÓN DEL MATERIAL

Antes de la fijación se tomaron varias medidas corporales de los individuos adultos, la longitud de la cabeza, la longitud del pronoto, la longitud del ala y la longitud del fémur, con un calibre milimétrico digital (COMECTA). Las medidas fueron tomadas en mm.

Fijación de machos

Los folículos testiculares de los machos fueron fijados en etanol:acético (3:1) y guardados a 4 °C hasta su utilización. El resto del cuerpo fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80 °C para la posterior extracción de DNA.

Fijación de hembras

Las ovariolas de las hembras fueron diseccionadas e incubadas en colchicina al 2% en solución salina, durante aproximadamente 6 horas. A continuación fueron fijadas en etanol:acético (3:1) y guardadas a 4 °C hasta su estudio. El resto del cuerpo fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80 °C.

Fijación de embriones

Las puestas recogidas de las hembras grávidas capturadas en el campo fueron colocadas en placas de Petri con vermiculita e incubadas a 27 °C hasta que alcanzaron el tamaño deseado para su fijación. Aproximadamente a los 10 días después de la recogida de las puestas, se fijaron los embriones. Para ello, la puesta se deposita en una placa de Petri con suficiente solución salina para insectos donde los huevos se separan uno de los otros con ayuda de lancetas y se traspasan a otra placa de Petri también con solución salina donde se procederá a la extracción de los embriones. Una vez obtenidos todos los embriones de la puesta, éstos se pasan a un pocillo de reloj con 1 ml de colchicina al 0.1% donde permanecerán durante 2 horas. Pasado este tiempo se añade 1 ml de agua destilada, para realizar un choque osmótico a los embriones y así facilitar la eliminación del citoplasma y separación de los cromosomas. El tiempo del choque osmótico debe ser ajustado para evitar que las cromátidas hermanas se separen. Normalmente estuvo comprendido entre 20 y 30 minutos. Finalmente, los embriones son fijados en etanol:acético (3:1) y guardados a 4°C.

Durante la fijación, hicimos un recuento, tanto del número de huevos de la puesta como del número de embriones obtenidos, para los estudios posteriores de fertilidad.

2. OBTENCIÓN DE LAS PREPARACIONES

Preparaciones de folículos testiculares u ovariolas

En un portaobjetos se pone una pequeña gota de ácido acético al 50%, en el que se deposita entre dos o tres folículos testiculares u ovariolas. A continuación se golpean con un macerador de extremo plano, para disgregar el tejido y obtener células sueltas. Después se coloca un cubreobjetos sobre el material machacado y, con ayuda de una lanceta y de papel de filtro, se le quita el exceso de fijador y de aire. Se colocan varios trozos de papel de filtro sobre el cubreobjetos y se aplasta la preparación fuertemente para que se separen los cromosomas y no aparezcan superpuestos. Se deja secar aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se introduce la preparación en nitrógeno líquido durante uno o dos minutos, de esta manera se consigue que la mayor cantidad de material se quede en el portaobjetos. Con ayuda de una cuchilla se quita el cubreobjetos, y se deja secar horizontalmente.

Preparaciones de embriones

Un embrión se recoge con una lanceta y se deposita en un tubo de ensayo con 20 µl de ácido acético al 75%. Se deja un par de segundos reposar para que se ablande el material y se pipetea varias veces hasta que el embrión esté completamente disgregado. A continuación, se recogen con la pipeta los 20 µl donde está disgregado el embrión y, en un portaobjetos previamente calentado a 60 °C en un termoblock, se va depositando el material lentamente y se vuelve a recoger. Esta operación se repite varias veces de manera que el material queda en 8 gotas dispersas por el portaobjetos. Finalmente se deja secar la preparación en el termoblock a 60 °C para que de esta manera se fije el material al portaobjetos. Una vez seca la preparación, se retira del termoblock.

Las preparaciones tanto de adultos como de embriones pueden guardarse a -20 °C durante un par de días.

Preparaciones de frotis de hemolinfa

Para la realización de los frotis de hemolinfa se ha seguido el protocolo seguido por Cabrero et al. (2006).

Con la aguja de una jeringuilla limpia se pincha al saltamontes en la región ventral a nivel del tercer par de patas, de donde saldrá una gota de hemolinfa que se deposita en la mitad superior de un portaobjetos. Con ayuda de otro portaobjetos se extiende la gota por todo el portaobjetos. Se deja secar el frotis. Para fijar el material, en posición horizontal y utilizando una pipeta

Pasteur, se cubre la preparación con etanol:ácetico (3:1) durante 10 minutos. Finalmente se lava la preparación con abundante agua destilada y se deja secar.

3. PREPARACIONES CON ORCEÍNA AL 2%

En un portaobjetos se pone una pequeña gota de orceína al 2%, en la cual se deposita entre dos o tres folículos testiculares u ovariolas. El material se machaca con un macerador de extremo plano para disgregar el tejido y obtener células sueltas. A continuación se coloca un cubreobjetos y, con ayuda de una lanceta y de papel de filtro, se le quita el exceso de orceína y de aire. Se colocan varios trozos de papel de filtro sobre el cubreobjetos y se aplasta la preparación fuertemente.

4. BANDEO C

La técnica del bandeo C se ha utilizado para caracterizar los tipos de cromosomas B de cada individuo.

- Las preparaciones se colocan en una cubeta coplin con ácido clorhídrico diluido al 2%, a 28 °C durante 30 minutos. Posteriormente se lavan las con abundante agua.

- Una vez lavadas, las preparaciones se pasan a otro coplin que contiene una solución saturada de hidróxido bórico (5% hidróxido bórico: 5 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en 100 ml de agua destilada) durante un tiempo que debe ser calculado para cada material y a 28 °C. Pasado el tiempo de incubación se realizan tres lavados: agua, ácido clorhídrico al 2% y agua.

- Las preparaciones se traspasan a otro coplin con solución salina 2x SSC a 60 °C durante una hora. Pasado ese tiempo las preparaciones se lavan con abundante agua.

- La tinción se realiza con Giemsa al 5% diluido en tampón fosfato. El tiempo de tinción debe ser calculado previamente con una o dos preparaciones. Lavar las preparaciones con abundante agua y dejar que se sequen a temperatura ambiente.

- Montar las preparaciones con DPX (BDH Laboratory Supplies).

5. IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA

Los nucleolos se han puesto de manifiesto con la técnica de impregnación argéntica desarrollada por Rufas et al. (1982).

- Se prepara la solución donde se diluye el nitrato de plata (MERCCK), que está formada por 200 ml de agua destilada a la que se le añade una gota de ácido fórmico para bajar el pH a 3,0–3,5.

- Para preparar la solución de nitrato de plata se añade, para una preparación, 0,1 g de nitrato de plata en 0,1 ml de la solución anterior. Esta solución se prepara en un tubo de 1,5 ml, recubierto con papel de aluminio para proteger la solución de la luz. La solución de plata debe ser agitada vigorosamente hasta asegurarse que los cristales de nitrato de plata están perfectamente disueltos.

- En el lugar donde se encuentra el material en el portaobjetos, se añade una o dos gotas de la solución de plata y se coloca un cubreobjetos de 240x160mm. Las preparaciones deben ser incubadas en cámara húmeda con agua destilada, a 60 °C y en oscuridad, el tiempo que sean necesario. No hay un tiempo estipulado para que se lleve a cabo la tinción, y éste depende sustancialmente del material. Las preparaciones estarán teñidas cuando adquieran un color amarillo–dorado.

- Cuando tomen el color deseado se lavan con abundante agua de grifo, y después con agua destilada. Pueden visualizarse al microscopio para ver si están bien teñidas y comprobar que se ven bien los nucleolos. En caso de que los nucleolos no se distinguen, la preparación puede volver a teñirse de nuevo.

Finalmente, para obtener un mejor contraste entre el nucleolo y la cromatina, las preparaciones fueron teñidas con Giemsa 5% (diluido en agua) durante menos de un minuto.

Una vez teñidas las preparaciones se montaron con DPX (BDH Laboratory Supplies).

6. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Se ha seguido el protocolo descrito por Cabrero et al. (2003c).

Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se ha llevado a cabo por el método de *nick translation*.

En un tubo de 0,2 ml se prepara la siguiente reacción de polimerización:

Reacción para el marcaje de sondas por <i>nick translation</i>	Cantidades
ACG no marcado	5 µl
10x NTB	5 µl
DTT	1 µl
dTTP	1 µl
rhodamine-11-dUTP / fluorogreen-11-dUTP (ROCHE)	1 µl
DNA polimerasa I/ DNAsa I (Invitrogen)	5 µl
DNA muestra: Producto PCR	32 µl
Volumen final	50 µl

La reacción se incuba a 15 °C durante 3 horas en un termociclador.

Precipitación de la sonda

Después de la incubación, la sonda así marcada se trasvasa a un tubo de 1,5 ml para precipitarla y limpiarla.

- Para detener la reacción y precipitar la sonda se añade EDTA 0,5 M pH 8,0 con acetato sódico y etanol absoluto frío, agitando fuertemente. Dejar precipitar a -20 °C hasta el día siguiente.

- Centrifugar a velocidad máxima (14-16000 rpm) durante 30 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.

- Añadir 150 µl de etanol frío al 70%.

- Centrifugar a velocidad máxima durante 30 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.

- Dejar secar la sonda precipitada manteniendo el tubo en posición invertida en la oscuridad.

- Resuspender en 20 µl de TE pH 8,0.

- La sonda marcada es estable durante periodos de tiempo prolongados (meses) si se mantiene a -20 °C.

Permeabilización del material

(Sólo en el caso de preparaciones de folículos testiculares)

Las preparaciones son previamente permeabilizadas para facilitar la entrada de la sonda en la célula y obtener un mayor rendimiento de la hibridación. La permeabilización consiste en la retirada de la mayor parte del citoplasma de las células, mediante un tratamiento con pepsina 50 µg/ml en HCl 0,01 N. Se procede de la siguiente forma:

- Poner 100 µl de la solución de pepsina en la preparación.
- Colocar un cubreobjeto de parafina.

- Incubar en cámara húmeda en 2x SSC a 37 °C. El tiempo de incubación hay que controlarlo para evitar que la pepsina digiera todo el material.
- Lavar abundantemente con agua ultrapura.
- Dejar secar

Envejecimiento de las preparaciones

A continuación se deshidratan las preparaciones en una serie de alcoholes:

Alcohol al 70% durante 3 minutos,
Alcohol al 90% durante 5 minutos y
Alcohol al 100% durante 8 minutos.

Se dejan envejecer a 60 °C durante toda la noche.

Reacción de hibridación

- Las preparaciones son tratadas con 200 µl de RNasa A (100 µl/ml en 2x SSC) y se deja incubar a 37 °C durante 2 horas. Este tratamiento previo elimina el RNA haciendo que la reacción de hibridación sea más específica y limpia.
- Finalizada la incubación se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno en 2x SSC con agitación.
- A continuación se lleva a cabo una fijación de prehibridación en paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 minutos.
- Pasado ese tiempo se realizan tres lavados con agitación en 2x SSC de 5 minutos cada uno.
- Se lleva a cabo una deshidratación con una serie de diluciones de alcohol etílico: 70%, 90% y 100% de 5 minutos cada uno.
- Se prepara la reacción de hibridación:

Reacción de Hibridación	Cantidades
Formamida	10,5 µl
Dextrán sulfato 50%	7 µl
20x SSC	3 µl
10% SDS	0,5 µl
DNA de esperma de salmón (SS)	1 µl
Sonda	5 µl
Volumen final	30 µl

- Se desnaturaliza la sonda calentándola al baño María durante 10 minutos a 70 °C. Se deja en hielo durante 5 minutos.

- Posteriormente se desnaturalizan los cromosomas, se añade a cada preparación la mezcla de hibridación, se coloca un cubreobjetivo de parafina y se dispone la preparación en un termoblock con humedad a 80 °C durante 6 minutos.
- Se deja incubar a 37 °C en una cámara húmeda en 2x SSC durante toda la noche.
- Se hacen dos lavados de 5 minutos en 2x SSC a 37 °C, y un lavado de 5 minutos en 2x SSC a temperatura ambiente. Estos tres lavados, y los posteriores, son con agitación y en oscuridad.
- Se realiza un lavado de 5 minutos en 4xSSC/Tween 20 con agitación suave.
- Teñir cada preparación durante 15 minutos con 100 µl de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) a 20 µg/ml, en tampón McIlvaine pH 7,0 a temperatura ambiente y en la oscuridad. Colocar un cubreobjetivo de parafina
- Lavar brevemente con 4x SSC/Tween 20.
- Montar con *antifading*, Vectashield.
- Mantener a 4 °C hasta su estudio, mínimo 2 ó 3 días después.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

El protocolo seguido para la técnica de inmunofluorescencia ha sido descrito por Cabrero et al. (2007).

Los anticuerpos utilizados han sido los siguientes:

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Histona H2AX (Upstate, USA)	FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody (Upstate)
Histona H3 acetilada (Ac- Lys ₉) (Sigma, USA)	Rhodamine-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Upstate)

Preparaciones para inmunofluorescencia

Tanto los folículos testiculares como los embriones de saltamontes, se fijan durante 15 minutos en paraformaldehído al 2% en PBS con 0,05% de Tween 20 preparado en el momento. A continuación, en un portaobjetos se coloca una gota de este mismo fijador y en ella se deposita el material previamente fijado. Se coloca un cubreobjetos, Con un macerador de extremo plano se hace presión encima del material hasta que se disgregue. Posteriormente, después de la inmersión de la preparación en nitrógeno líquido, el cubreobjetos es eliminado. Las preparaciones son inmediatamente transferidas a un coplín con PBS.

Inmunofluorescencia

- Lavar las preparaciones tres veces con 1x PBT durante 10 minutos con agitación. También es posible darle un único lavado de 20 ó 30 minutos.
- Bloquear las preparaciones en BSA al 10% en 1x PBT. Para ello, añadir 300µl de BSA al 10% por preparación, poner un cubre de parafina e incubar aproximadamente 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda con 1x PBT.
- Se añade el anticuerpo primario diluido 1/600 en BSA 1% en PBT 1x. Se ponen unos 300 µl por preparación, se tapa con un cubre de parafina y se deja incubando en una cámara húmeda con PBT a 4 °C toda la noche.
- Lavar las preparaciones tres veces con 1x PBT durante 20 minutos con agitación.
- Sacar las preparaciones del 1x PBT y ponerlas en papel de filtro verticalmente un par de segundos, para eliminar el exceso de 1x PBT.
- Añadir el anticuerpo secundario, diluido 1/300 en BSA 1%, en PBT 1x. Se añaden unos 300 µl por preparación, se coloca un cubre de parafina y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora en la cámara húmeda con PBT en la oscuridad.
- Lavar las preparaciones tres veces con 1x PBT durante 20 minutos con agitación.
- Teñir cada preparación durante 15 minutos con 100 µl de DAPI a 20 µg/ml en tampón McIlvaine.
- Lavar brevemente con 1x PBT.
- Montar con *antifading* Vectashield.
- Mirar a microscopio de epifluorescencia.

8. MICRODISECCIÓN

Para la microdissección del cromosoma X y del cromosoma B₂₄ de *Eyprepocnemis plorans*, hemos utilizado dos machos de la población de Torrox capturados en Noviembre del 2006, portadores de un cromosoma B₂₄ (el macho 14) y de dos cromosomas B₂₄ (macho 17).

Fijación del material para la microdissección

Los folículos testiculares de estos individuos fueron fijados en etanol: acético (3:1) durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se traspasaron a un tubo de 1,5 ml con 500 ml de etanol al 70% y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación.

Realización de las preparaciones

Las preparaciones se realizaron justo en el momento de la microdissección, en ácido acético al 50% y en cubreobjetos 24x60mm, tratados con sales y calentados previamente a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el termoblock, para favorecer la fijación del material en el cubreobjetos.

El tratamiento previo con sales realizado a los cubreobjetos consiste en incubarlos toda la noche en 10x SSC. A continuación, se lavan los cubreobjetos uno a uno, primero con agua corriente caliente para eliminar el exceso de sales y, a continuación, con agua destilada. Se dejan secar y se guardan hasta su utilización. De esta manera, las sales forman una película en el cristal del cubreobjeto que facilita posteriormente la microdissección de los cromosomas.

Las preparaciones no fueron teñidas con ningún colorante ya que tanto el cromosoma X como el cromosoma B₂₄ son fácilmente reconocibles en células de la meiosis masculina al ser heterocromáticos y encontrarse en forma univalente. Además, se diferencian entre ellos porque el cromosoma B₂₄ tiene aproximadamente la mitad de tamaño que el cromosoma X.

Microdissección

La microdissección de los cromosomas se realizó en un microscopio invertido, Zeiss Axiovert 200, acoplado a un micromanipulador electrónico, Eppendorf TransferMan NK 2 y agujas de vidrio. Estas agujas fueron fabricadas a partir de capilares de vidrio de 2 mm de diámetro con un *pipette puller* (Bachofer) horizontal de dos pasos y esterilizadas previamente mediante radiación ultravioleta.

Los cromosomas fueron recortados de células en diplotene o paquitene en las que estaban suficientemente separados, para así evitar posibles contaminaciones.

Los cromosomas se recogieron en tubos de 0,2 ml con 20 μl de 1x buffer de PCR (Roche) (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM Cl₂Mg, 50 mM KCl pH 8,3) cuando éstos fueron amplificados por DOP-PCR, o en 9 μl de agua ultrapura libre de DNAsas, cuando se usó el método de amplificación de todo el genoma GenomePlex[®] de Sigma.

Cromosoma	Número de cromosomas/tubo	Método de amplificación
B ₂₄	15	DOP-PCR
B ₂₄	15	GenomePlex® Sigma
X	13	GenomePlex® Sigma
X	12	GenomePlex® Sigma

La microdissección la hemos realizado en el Departamento de Biología Experimental (Área de Genética) de la Universidad de Jaén en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Antonio Sánchez Baca.

9. CHROMOSOME PAINTING

El *Chromosome Painting* consiste en la utilización de una sonda generada a partir de cromosomas o trozos de cromosomas para realizar hibridación *in situ* dentro de la misma especie o de especies relacionadas. Estas sondas permiten analizar la evolución de los cromosomas, ya que ponen de manifiesto posibles aberraciones cromosómicas y permiten detectar secuencias dispersas por el genoma.

En este caso, hemos seguido el protocolo descrito por Marchal et al. (2004) para la preparación de las sondas cromosómicas y la hibridación *in situ* posterior.

Preparación de la sonda cromosómica

Cuando el DNA cromosómico fue amplificado por el método de Sigma, el marcaje de la sonda se realizó por el método de *nick traslation* (véase más arriba); mientras que, cuando se amplificó el DNA por DOP-PCR, la segunda PCR sirvió para marcar la sonda con SpectrumOrange-dUTP (Vysis).

En ambos casos, se precipitaron 8 µl de sonda por preparación en 50 ng de esperma de salmón, 0,3 M de acetato sódico, 0,5 µl glucógeno y 2,5 volumen de etanol durante toda la noche a -20 °C.

Para la precipitación de 8 µl de sonda	Cantidades
Agua ultrapura	6,5 µl
Acetato sódico 3M pH 5,2	4 µl
Esperma de salmón	1 µl
Glucógeno	0,5 µl
Etanol absoluto	20 µl
Volumen final	40 µl

Al día siguiente se procede al lavado y resuspensión de la sonda:

- Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.

- Lavar el sedimento con 100 μ l de etanol 70% frío y centrifugar a 4 °C a 14000 rpm durante 30 minutos.
- Eliminar el etanol y dejar secar.

La sonda, una vez precipitada y seca, se resuspende en:

Resuspender la sonda	Cantidades
Agua ultrapura	9 μ l
20x SSC	3 μ l
Formamida	15 μ l
Dextrán sulfato 50%	3 μ l
Volumen final	30 μ l

Para que se resuspenda bien la sonda se voltea vigorosamente y se incuba a 37 °C durante 3 horas. Se guarda a -20 °C hasta su utilización.

Hibridación *in situ* fluorescente (painting)

- Envejecimiento de los portaobjetos mediante incubación a 37 °C, al menos durante un día.
- Deshidratación de los portaobjetos en una serie de alcoholes: 70%, 90% y 100% durante 5 minutos cada incubación.
- Desnaturalización del DNA cromosómico mediante incubación en formamida desionizada al 70% diluida en 2x SSC, a 70 °C durante 2,5 minutos.
- Incubar los portaobjetos en 2x SSC durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Deshidratar de nuevo (repetir el paso 2).
- Desnaturalizar la sonda, previamente resuspendida a 73 °C, durante 6 minutos. Poner en hielo.
- Añadir la sonda al portaobjetos, poner un cubre de parafina e incubar a 37 °C durante 16h, en el interior de una cámara de humedad en formamida desionizada/2x SSC.
- Realizar un lavado de post-hibridación con 0,4x SSC/0.3% igeal durante 2 minutos a 70 °C.
- Lavar con 2x SSC/0.1% igeal durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Teñir en solución DAPI durante 10 minutos (véase el apartado 6 de esta misma sección)

- Lavar las preparaciones con PBT y montarlas con el *antifading* Vectashield (Vector).
- Guardar las preparaciones a 4 °C varios días antes de su estudio a microscopio de epifluorescencia.

10. CAPTURA DE IMÁGENES

Las fotografías de las células han sido capturadas con una cámara digital refrigerada Olympus DP50 conectada a un microscopio de epifluorescencia Olympus BX41.

Las imágenes tomadas han sido optimizadas, para un mejor contraste y brillo, utilizando el programa Adobe Photoshop CS2.

Las medidas de área nucleolar y de intensidad de fluorescencia se han tomado con una tableta digital y el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (M.E.T.)

Mediante microscopía electrónica de transmisión hemos estudiado la estructura del nucleolo de varios tipos celulares: ganglios cerebrales, ovariolas y espermatozoides.

La preparación de las muestras y los cortes semifinos y ultrafinos los hemos realizado en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas (LPMB) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, siguiendo el protocolo descrito por Megías y Renal (1998).

1. PREPARACIÓN DE TEJIDOS BIOLÓGICOS PARA M.E.T.

- Prefijar el tejido en glutaraldeído 2,5% + formaldehído 1% en tampón cacodilato 0,05 M a pH 7,4 durante 24 horas a 4 °C.
- Lavar en tampón cacodilato 0,1 M tres veces durante 15 minutos a 4 °C.
- Postfijar en tetróxido de osmio al 1% conteniendo ferro- o ferricianuro potásico al 1%, durante 1 hora a 4 °C y en la oscuridad.

- Lavar en agua destilada tres veces durante 5 minutos a 4 °C.
- Tinción en bloque con acetato de uracilo al 2% en agua destilada durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Lavado en agua destilada tres veces durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Deshidratar en una serie de alcoholes: 50%, 70%, 90% y 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Infiltrar en EMBED 812/etanol puro (1:2) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Infiltrar en EMBED 812/etanol puro (1:1) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Infiltrar en EMBED 812/etanol puro (2:1) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Incluir en EMBED 812 puro toda la noche a 4 °C.
- Polimerizar en EMBED 812 puro durante 48 horas a 60 °C en los moldes de polimerización.

2. REALIZACIÓN DE LOS CORTES Y TINCIÓN

Una vez obtenidos los bloques de inclusión, se procede a la realización de los cortes con un ultramicrotomo Ultracut de Reichert Jung.

Los cortes ultrafinos, de 50-70 nm de espesor, se han realizado utilizando una cuchilla de diamante DIATOME y se montan sobre rejillas de cobre, níquel o de 200-300 mesh. Los cortes ultrafinos se contrastan con acetato de uracilo al 1% en solución alcohólica al 50% durante 1 minuto y posteriormente se tiñen con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmósfera exenta de CO₂ durante 5 minutos.

3. CAPTURA DE IMÁGENES

La observación de las preparaciones las hemos realizado en un microscopio electrónico JEOL modelo JEM1011 acoplado a un sistema de capturas de imágenes Megaview III (Soft Imaging Systems) del Grupo de Biología Reproductiva de Plantas del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Por citometría de flujo hemos obtenido datos de la morfología celular, de las tasas de división celular y de apoptosis en varios tejidos del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*.

Los experimentos se han llevado a cabo en un citómetro BECTON DICKINSON FACS Vantage con láser COHERENT Enterprise 621 (488nm y 351-364nm (UV)) del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

1. PROTOCOLO DE DISGREGACIÓN DE TEJIDOS

Uno de los requisitos para el análisis celular por citometría de flujo, es que se necesita que las células se encuentren en suspensión y ésta debe contener el mínimo posible de restos y agregados celulares para minimizar los errores en los datos (Ormerod 1994).

Inmediatamente después de la disección de los diferentes tejidos se procede a la disgregación de éstos, según el siguiente protocolo:

- Poner el material en un pocillo de reloj con 0,5 ml de solución salina.
- Limpiar el material de restos no deseados.
- Disgregación mecánica
 - Triturar el material con unas tijeras o machacarlo.
 - Pipetear la suspensión y ponerla en un tubo 1,5 ml.
 - Centrifugar a 400 x g 5 minutos.
 - Tirar el sobrenadante.
 - Resuspender en 0,5 ml de 1x PBS.
- Disgregación enzimática (opcional, no es necesario)
 - Resuspender el sedimento en 1 ml de tripsina 0,25%.
 - Incubar a 37 °C con agitación durante 20 minutos.
 - Meter en hielo durante 2 minutos, para parar la actividad de la enzima.
 - Centrifugar a 400 x g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante.
 - Resuspender el sedimento en 1 ml de BSA al 1%.
 - Centrifugar a 400 x g durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante.
 - Resuspender el sedimento en 500 µl de 1x PBS.
- Filtrar en filtros de nylon de 50 µm.

2. FIJACIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR

Para el análisis del ciclo celular, la suspensión de células se fija previamente.

- A 200 ml de la muestra en 1x PBS, añadir 1 ml de etanol al 70% e incubar a 4 °C durante 30 minutos, como mínimo.
- Centrifugar a 400x g durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento en 800 ml de 1x PBS.
- Guardar las muestras a 4 °C y en la oscuridad.

3. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR CON IODURO DE PROPIDIO (IP)

El IP es una molécula fluorescente que se une estequiométricamente al DNA, lo que permite cuantificar la cantidad de DNA y clasificar las células en diferentes poblaciones según su contenido de DNA. Procedimiento:

- Obtener 800 ml de una suspensión de células fijadas con etanol 70% frío.
- Añadir 500 ml de RNasa A (1 mg/ml).
- Añadir 100 ml IP (400 mg/ml).
- Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- Medir en el citómetro inmediatamente.

4. PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

Para la detección de la apoptosis hemos utilizado el kit Conventional Annexin V Binding (de ACC), que se basa en la detección de cambios en la superficie de las células durante la apoptosis.

La proteína Anexina V conjugada con FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) reconoce a la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido de membrana que, tras la cascada de señales que intervienen en la regulación de la apoptosis, su localización pasa de la monocapa interna a la superficie de la membrana plasmática, para el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por los fagocitos.

Hemos seguido el protocolo descrito en el manual,

- Centrifugar la suspensión celular en 1x PBS a 1000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 0,5 ml de 1x PBS.
- Centrifugar a 1000x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 0,5 ml de 1x *Binding Buffer* a 4 °C.
- Añadir 1,25 µl de *Annexin V-FITC*.
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (18-24 °C) en oscuridad.

- Centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 0,5 ml de 1x *Binding Buffer* a 4 °C.
- Añadir 10 µl de Ioduro de Propidio.
- Meter las muestras en hielo y en oscuridad.
- Analizar por citometría de flujo inmediatamente.

WESTERN BLOT

La expresión de la proteína Hsp70 se ha puesto de manifiesto mediante *Western blotting* (Towbin et al.1979). Esta técnica es ampliamente utilizada en el laboratorio para la detección cualitativa y semicuantitativa de proteínas específicas en una mezcla de proteínas totales mediante inmunodetección.

El *Western Blot* consiste en la transferencia de las proteínas de un gel de poliacrilamida, donde se han separado por electroforesis según su peso molecular, a una membrana de nitrocelulosa o Polyvinidene fluoride (PVDF), de manera que finalmente se obtiene una réplica exacta del gel en la membrana donde es más fácil acceder a las proteínas para su detección.

El anticuerpo utilizado para detectar los niveles de la proteína Hsp70 ha sido el anticuerpo Hsp70 ma3-006 3A3 (Affinity BioReagents). Este anticuerpo reconoce una región de la proteína implicada en la localización nucleolar después del estrés, y permite reconocer varias proteínas de la familia Hp70, como por ejemplo, la proteína constitutiva, Hsc70 y la proteína inducible Hsp70. Para diferenciar entre ambos tipos de proteínas sería necesario realizar una electroforesis bidimensional.

Como anticuerpo secundario se ha usado el anticuerpo Ig-anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Stabilized Goat anti-mouse HRP-conjugate, Pierce).

1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas totales se han extraído del ganglio cerebral y gónadas tanto de machos como de hembras. Los tejidos diseccionados fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80 °C hasta la extracción de las proteínas.

La extracción del conjunto de proteínas se ha realizado siguiendo dos protocolos diferentes, que básicamente difieren en el tampón de homogenización utilizado en cada caso.

Extracción de proteínas en los machos

Para la extracción de las proteínas de los tejidos de machos se usó un tampón de homogenización consistente en 1x PBS donde se diluyeron antiproteasa y PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride), que es un inhibidor de determinadas proteínas. Procedimiento:

Tampón de homogenización I	Cantidades
1x PBS	19,7 ml
Cóctel de antiproteasas	200 μ l
PMSF	100 μ l
Volumen final	20 ml

- Depositar el tejido diseccionado en un tubo de 1,5 ml y añadir 100 μ l de tampón de homogenización.
- Homogenizar el tejido mecánicamente con un machacador.
- Añadir otros 400 μ l, en el caso del testículo, o 200 μ l, para el ganglio, de tampón de homogenización. Seguir disgregando los tejidos con el machacador y pipeteando varias veces.
- Centrifugar a 4 °C a 13000 rpm durante 30 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un vial limpio.
- Guardar el extracto a -80 °C hasta su utilización.

Extracción de proteínas en las hembras

En las extracciones de las proteínas de los tejidos de las hembras, se utilizó una mezcla de RIPA BUFFER (R 0278, Sigma), inhibidores de proteasas (Sigma) y 10% de SDS, para la desnaturalización de las mismas. Procedimiento:

- Preparar 20 ml de tampón de homogenización de la siguiente forma,

Tampón de homogenización II	Cantidades
RIPA Buffer (R 0278, Sigma)	8 ml
Inhibidores de Proteasas	200 μ l
10% de SDS	4 μ l
Volumen final	8,24 ml

- Añadir 100 μ l de tampón de homogenización al tubo con el tejido diseccionado.
- Homogenizar el tejido mecánicamente pipeteando vigorosamente.
- Añadir 400 μ l o 200 μ l de tampón de homogenización al homogenado de ovariolas o de ganglio respectivamente.

- Seguir homogenizando pipeteando fuertemente durante 5 minutos.
- Incubar en hielo 5 minutos.
- Centrifugar a 4 °C a 13000 rpm durante 30 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un vial limpio.
- Guardar el extracto a -80 °C hasta su utilización.

2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se ha realizado usando el método BSA (BCA™ Protein Assay, Priece, para los machos; y QuantyPro™ BCA Assay, Sigma, en las hembras).

3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Preparación de las muestras

En cada calle del gel de poliacrilamida se ha cargado la misma cantidad de proteína total, de manera que para testículo se han cargado 20 µg de proteína por individuo, para ovariolas 60 µg, mientras que para ganglio han sido 8 µg de proteína tanto en machos como en hembras.

- A cada una de las muestras se le añadió 10 µl de tampón de carga 2x con 10% de 2-Mercaptoetanol (Sigma).

Tampón de carga 2x*	Cantidades
0,5% Azul de Bromofenol	800 µl
Glicerol	2 ml
10% SDS	4 ml
500 mM Tris-CIH pH 6,8	1,75 ml
Agua ultrapura	1,45 ml
Volumen final	10 ml

*Añadir al tampón de carga justo en el momento de su uso 10% de 2-Mercaptoetanol (1 ml a 10 ml de tampón de carga 2x).

- Desnaturalizar las proteínas incubando las muestras a 95 °C durante 5 minutos.
- Poner en hielo otros 5 minutos.
- Cargar los geles.

Electroforesis

En los machos, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% (PAGEr Duramide Precast Gel, Cambrex), mientras que en las hembras, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (NUPGE® 10% Bis-Tri Gel, Invitrogen) en 1x tampón NUPGE® MES SDS URNG Buffer 20x (Invitrogen).

La electroforesis se realizó a voltaje constante (150 V) durante 1 hora.

4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Para la transferencia de las proteínas se han seguido dos protocolos diferentes, dependiendo de si la transferencia fue realizada mediante un sistema húmedo, como fue el caso de los machos, o mediante un sistema semi-húmedo (TRANS-BLOT® SR Semi-dry transfer cell, BioRad), como en el caso de las hembras.

Protocolo de transferencia en sistema húmedo

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilom™ P Transfer Membranes, Millopore).

- Preparar 1 litro de tampón de transferencia (BioRad).
- Equilibrar el papel de filtro en tampón de transferencia.
- Activar y equilibrar la membrana como sigue:
 - Incubar la membrana 1 minuto en etanol al 70%.
 - Lavar en agua destilada 2 minutos.
 - Equilibrar en tampón de transferencia 5 minutos.
- Montar el sándwich:
 - Poner una esponja en la tapadera del casete.
 - Poner dos capas de papel de filtro humedecido en el tampón.
 - Sacar el gel del casete y poner encima el gel de poliacrilamida.
 - Poner la membrana de PVDF equilibrada encima del gel.
 - Poner otras dos capas de papel de filtro húmedo. Eliminar las burbujas.
 - Poner una segunda esponja y cerrar la tapadera del casete.
- Meter el casete montado en la cabina de transferencia con un litro de tampón de transferencia. Las proteínas migran del ánodo al cátodo de manera que la membrana debe disponerse cerca del cátodo y el gel cerca del ánodo.

La transferencia se realizó a 70 V durante 1 hora y a 4 °C para evitar el sobrecalentamiento del sistema.

Protocolo de transferencia en sistema semi-húmedo

Las proteínas de transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Hybond™-P).

- Preparar 100 ml de tampón de transferencia,

Tampón de Transferencia	Cantidades
20x NuPAGE® Transfer Buffer (Invitrogen)	10 ml
Metanol	10 ml
NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen)	100 µl
Agua Ultrapura	80 ml
Volumen final	100 ml

- Sacar el gel de poliacrilamida del casete de plástico y equilibrar en tampón de transferencia durante 10 minutos.

- Equilibrar dos trozos del papel de filtro para la transferencia, del mismo tamaño que la membrana, en tampón de transferencia, durante 30 segundos.

- Activar y equilibrar la membrana de PVDF como sigue:

- Humedecer la membrana en metanol durante 15 segundos, es decir, hasta que la membrana de PVDF pase de opaca a semitransparente.

- Lavar en agua ultrapura durante 1 minuto.

- Equilibrar en tampón de transferencia durante al menos 5 minutos.

- Proceder al montaje del sándwich de transferencia en el ánodo del sistema de transferencia semi-húmedo. Para ello,

- Poner en la base del sistema de transferencia, un trozo de papel de filtro de transferencia del mismo tamaño que la membrana de PVDF. Usar una pipeta de cristal o plástico para eliminar las posibles burbujas.

- Poner encima del papel la membrana de PVDF equilibrada.

- Poner encima de la membrana el gel de poliacrilamida equilibrado.

- A continuación, poner el segundo trozo de papel de filtro equilibrado. Eliminar las burbujas.

- Poner la tapadera del sistema de transferencia y cerrar el aparato.

La transferencia se realizó a 10 V durante 20 minutos.

Una vez terminada la transferencia, las membranas pueden guardarse durante varios días o semanas.

5. INMUNODETECCIÓN

Si la membrana ha permanecido seca y guardada durante algunos días, hay que activarla incubándola durante 1 minuto en agua ultrapura. A continuación, se procede con el protocolo de inmunodetección.

- Preparar previamente la solución de bloqueo y el tampón de lavado y mantener a 4 °C.

Solución de Bloqueo	Cantidades	Tampón de lavado	Cantidades
Leche en polvo	15 g	Solución de bloqueo	200 ml
10x PBS	30 ml	10x PBS	100 ml
Agua destilada	270 ml	Tween-20	500 µl
Volumen final	300 ml	Agua destilada	700 ml
		Volumen final	1000 ml

- Bloquear la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación.
- Incubar la membrana con el anticuerpo primario, diluido 1:5000 en tampón de lavado a 4 °C durante toda la noche con agitación.
- Realizar tres lavados de 10 minutos con tampón de lavado a temperatura ambiente y agitación.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario marcado, diluido 1:1000 en tampón de lavado, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar la membrana tres veces durante 10 minutos con tampón de lavado a temperatura ambiente con agitación.
- Proceder a la detección de la proteína mediante quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Pico, Chimioluminescent Substrate de Pierce.

La detección de la quimioluminiscencia se llevó a cabo con una cámara CCD en el lector de geles Versa DOC™ Imagen System 1000 Model (BioRad). Los niveles de Hsp70 se midieron con el software asociado a dicho lector de imagen, Quantity One 4.3.1.

La cuantificación de los niveles de expresión de la Hsp70 en machos se realizó en 2006 en el Departamento de Ecología y Genética del Instituto de Biología de la Universidad de Aarhus (Dinamarca) bajo la supervisión del profesor Dr. Volker Loeschcke. El análisis correspondiente en las muestras de las hembras lo realizamos en nuestro laboratorio en 2007. En este caso, la detección de quimioluminiscencia se llevó a cabo en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC).

TÉCNICAS MOLECULARES

1. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA genómico del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* se ha realizado siguiendo el protocolo del Kit GenElute® Mammalian Genomic DNA minipreps (Sigma).

- Machacar el cuerpo del saltamontes en un mortero con nitrógeno líquido.
- Añadir 180 µl de la solución *Lysis Solution T* y 20 µl de Proteinasa K 10 mg. Agitar con vortex.
- Incubar la muestra a 60 °C durante 2-4 horas. Agitar con vortex de vez en cuando.
- Añadir 20 µl de RNAasa e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200 µl de la solución *Lysis Solution C* y agitar con vortex.
- Incubar a 70 °C durante 10 minutos.
- Preparar la columna: Poner en un tubo limpio la columna y añadir 500 µl de *Column Preparation Solution*. Centrifugar 2 minutos a 12000 x g. Descartar el sobrenadante.
- Añadir a la muestra 200 µl de etanol absoluto y agitar con vortex durante varios segundos.
- Transferir el contenido de la muestra al tubo con la columna ya preparada. Centrifugar a 6500 x g durante 2 minutos.
- Añadir 500 µl de *Wash Solution*. Centrifugar a 6500 x g durante 2 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Hacer un segundo lavado, añadir otros 500 µl de *Wash Solution*. Centrifugar a 16000 x g durante 3 minutos.
- Traspasar la columna a un tubo limpio.
- Añadir 200 µl de *Elute Solution*. Incubar 5 minutos y centrifugar a 6500 x g durante 1 minuto.
- Guardar el DNA a -20 °C.

2. AMPLIFICACIÓN DEL DNA CROMOSÓMICO

Se han utilizado dos métodos basados en la PCR para la amplificación del DNA de los cromosomas X y B₂₄ microdisecionados.

2. 1. DOP-PCR

La DOP-PCR (*Degenerated-oligonucleotide primed* PCR, Telenius et al. 1992) es la técnica comúnmente utilizada para la amplificación del DNA cromosómico obtenido por microdisección o por separación mediante citometría de flujo. Se caracteriza por utilizar, como cebadores, oligonucleótidos parcialmente degenerados en dos rondas de amplificación. Las condiciones de la primera amplificación son a baja temperatura de hibridación, para facilitar la unión de estos cebadores a muchas regiones del genoma. A continuación, se realiza una segunda ronda de amplificación un poco más específica porque se utiliza una temperatura más alta de hibridación. Esta segunda amplificación puede servir a su vez para el marcaje de la sonda.

Desnaturalización de los cromosomas

Los cromosomas recortados se recogen en tubos de 0,2 ml con 20 µl de 1x buffer Roche (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8,3).

A continuación, se realiza un primer paso de desnaturalización del DNA cromosómico por medio de ciclos a diferentes temperaturas. Esta desnaturalización previa del DNA, facilita la posterior unión de los cebadores durante la amplificación por DOP-PCR.

El programa de desnaturalización del DNA cromosómico es el siguiente:

Realizar 15 ciclos de:	
	30 °C 1 minuto
	50 °C 1 minuto
Mantener	4 °C

Amplificación por DOP-PCR

Primera DOP-PCR:

A los 20 µl de 1x tampón de PCR, donde se encuentran los cromosomas microdisecionados, se le añade 1 µM oligo-DOP, 200 µM dNTPs, 100 pg/µl BSA, 15 mM de MgCl₂, 2 U DNA polimerasa (BioRad).

El programa de amplificación ha sido el siguiente:

Desnaturalización inicial	94 °C, 5 minutos
Realizar 8 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 1 minuto
Hibridación	45 °C, 1 minuto

	Extensión	72 °C, 3 minutos
Realizar 28 ciclos de:		
	Desnaturalización	94 °C, 1 minuto
	Hibridación	56 °C, 1 minuto
	Extensión	72 °C, 3 minutos
Extensión final		72 °C, 5 minutos
Mantener		4 °C

Para verificar la amplificación de DNA cromosómico, se cargaron 5 µl del producto de esta PCR en un gel de agarosa al 2% (1,2 gr. de agarosa en 40 ml de 1x TBE con 5 µl de SYBR safe®).

Segunda DOP-PCR:

Esta segunda ronda de amplificación sirve para marcar el DNA microdisecionado para utilizarlo como sonda, posteriormente, en el *chromosome painting*.

A 5 µl de la primera amplificación de DOP-PCR se le añaden, 1x tampón de PCR (100 mM Tri-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM HCl pH 8,3), 4 µM oligo-DOP, 200 µM de dNTPs, 20 µM SpectrumOrange-dUTP® (Vysis), 2 U DNA polimerasa (Roche).

El programa de marcaje es:

Desnaturalización inicial	94 °C, 5 minutos
Realizar 5 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 30 segundos
Hibridación	45 °C, 30 segundos
Extensión	72 °C, 90 segundos
Realizar 28 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 30 segundos
Hibridación	56 °C, 30 segundos
Extensión	72 °C, 90 segundos
Extensión final	72 °C, 7 minutos
Mantener	4 °C

Para comprobar y cuantificar la cantidad de sonda marcada, 5µl de esta reacción fueron cargados en un gel de agarosa 2% con 5µl de SYBR safe®.

2. 2. Amplificación del DNA cromosómico con GenomePlex®

Es una adaptación para la amplificación de todo el genoma del método de amplificación LA-PCR (Linker adapter PCR). Se basa en la fragmentación al azar del genoma y en la subsiguiente unión de adaptadores OmniPlex® Library a esos fragmentos, para la posterior amplificación por PCR con cebadores específicos de estos adaptadores.

La amplificación de los cromosomas con el kit GenomePlex® Single Cell se realizó siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial sin ninguna modificación.

- Los cromosomas microdisecionados, depositados en 9 µl de agua libre de DNasa, son sometidos a un proceso de lisis y fragmentación del DNA. Para ello, se le añade 1 µl de una solución de *Lysis&Fragmentation-proteasa K* (32 µl 10x *Lysis&Fragmentation* y 1 µl de proteasa K) y se deja incubar durante 1 hora a 55 °C. Finalmente, se da un choque térmico a 99 °C durante 4 minutos, para inactivar la enzima, y se mantiene en hielo.

- A continuación, se procede a la adaptación de los cebadores de la librería OmniPlex®. A la reacción anterior se le añade 2 µl 1x *Library Preparation* y 1 µl de *Stabilization Solution*. Se incuba durante 2 minutos a 95 °C y se mantiene en hielo.

- Posteriormente, se añade 1 µl de *Enzyme Library* y se procede a la generación de los fragmentos con el siguiente programa:

16 °C, 20 minutos
 24 °C, 20 minutos
 37 °C, 20 minutos
 75 °C, 20 minutos
 4 °C mantener

- Por último, se realiza la amplificación de los fragmentos generados. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 70 µl, por lo que a los 14 µl de la muestra se le añaden:

Reacción de amplificación	Cantidades
Agua ultrapura libre de DNasa	48,5 µl
10x Amplification Master Mix	7,5 µl
WGA DNA polimerasa	5 µl
Muestra	14 µl
Volumen final	70 µl

Las condiciones de amplificación fueron:

Desnaturalización inicial	95 °C, 3 minutos
Realizar 25 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 30 segundos
Hibridación/Extensión	65 °C, 5 minutos
Mantener	4 °C

Para chequear la amplificación del DNA microdisecionado se cargaron 5 µl de esta reacción en un gel de agarosa al 2% con 5 µl de SYBR safe®.

El DNA amplificado se limpió con el kit GenElute® PCR Clean-Up de Sigma.

Para cuantificar la cantidad de DNA microdisecionado se cargaron 5 µl de este DNA en un gel de agarosa al 2%.

El DNA microdisecionado se guardó a -20 °C.

Reamplificación del DNA cromosómico

A partir del DNA cromosómico amplificado con GenomePlex® se realizó una segunda amplificación para obtener varias alícuotas de trabajo. La reamplificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Kit GenomePlex® WGA Reamplification (Product Code WGA3, Sigma) con algunas modificaciones.

Reacción de amplificación:

Reacción de amplificación	Cantidades
Agua ultrapura libre de DNasa	52,5 µl
10x Amplification Master Mix	7,5 µl
WGA DNA polimerasa	5 µl
DNA amplificado GenomePlex®	5 µl
Volumen final	70 µl

Las condiciones de amplificación fueron,

Desnaturalización inicial	95 °C, 3 minutos
Realizar 15 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 25 segundos
Hibridación/Extensión	65 °C, 5 minutos
Mantener	4 °C

El DNA amplificado se limpió con el kit GenElute® PCR Clean-Up, de Sigma.

Para cuantificar la cantidad de DNA microdisecionado, se cargaron 5 µl de este DNA en un gel de agarosa al 2%.

El DNA microdisecionado se guardó a -20 °C.

3. ELECTROFORESIS EN GELES DEL AGAROSA

Los productos de la amplificación se han visualizado en geles de agarosa al 1,5%.

Preparación de los geles de agarosa 1,5%

- En 40 ml de 1x TBE añadir 0,6 g de agarosa (Seakem LE Agarose, BioWhittaker Molecular Applications).
- Calentar en el microondas 1,5 minutos para que la agarosa se disuelva en el tampón.

- Agitar varias veces y dejar enfriar un par de minutos.
- Añadir 5 μ l de SYBR safe[®] DNA gel stain (Invitrogen) y agitar para homogenizar la mezcla.
- Verter la agarosa líquida en un molde con peine para gelificar el gel.
- Dejar enfriar el gel para que gelifique al menos 30 minutos.

Preparación de las muestras

En un tubo 1,5 ml poner 5 μ l del producto de la PCR y 2 μ l de 6x tampón de carga (Ladepuffer DNA I, AppliChem).

Electroforesis

Una vez enfriado, poner el gel en la cubeta de electroforesis con 0,5x TBE, retirar el peine y cargar las muestras. Como patrón de tamaños hemos utilizado el HyperLadder II (BIOLINE).

La electroforesis se ha realizado a 95 V durante 45 minutos.

4. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

La cuantificación del DNA se ha realizado en geles de agarosa al 1% (0,4 g de agarosa en 40 ml de 1x TBE).

Como patrón de tamaños hemos utilizado el HyperLadder II (BIOLINE).

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Mediante PCR se ha realizado la amplificación del DNA satélite de 180 pb, los ITS del DNA ribosómico 18/28S, los genes RNA 5S, los genes para las histonas H3 y H4, y el espaciador que separa estas histonas.

Los cebadores utilizados en cada caso han sido los siguientes:

Secuencias	Cebadores	Secuencia Oligonucleótidos	T
satDNA de 180 pb	180repdiv1R 180repdiv1L	5' GCA CTG CTT TCC AGA TAT CAC ACT AAA ATG 3' 5' CGC ATT TCT GCC GCC TGT GGC GCT ACA TT 3'	62
ITS del rDNA (White et al. 1990)	18S its4	5' GCT TTT GTA CAC ACC GCC CGT CGC 3' 5' ATA TGC TTA AAT TCA GCG GG 3'	56
rDNA 5S (Cabrero et al. 2003)	5S-nRNA.F1 5S-nRNA.R1	5' AAC GAC CAT ACC ACG CTG AA 3' 5' AAG CGG TCC CCC ATC TAA GT 3'	52
Histona H3 (Colegan et al. 1998)	H3aF H3aR	5' ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC 5' ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC 3'	48
Histona H4 (Pineau et al. 2005)	H4F2s H4F2er H4F2ir	5' TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C 3' 5' CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT 3' 5' GTI ACI GTC TTS CKY TTG GCG TGC TC 3'	- 58 58
Espaciador entre H4 y H3	H4F2ir H3aR	5' GTI ACI GTC TTS CKY TTG GCG TGC TC 3' 5' ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC 3'	53
*Espaciador entre H4 y H3 (cromosoma X)	EpH4X-F EpH3X-R	5' ACC CGA AAT ACG CTT GAC AC 3' 5' CTT TTG TCG CCA ACT GCT TC 3'	55
*Espaciador entre H4 y H3 (cromosoma B)	EpH4B-F EpH3a-R	5' TGA TCC CCT GAA TGT TAT CC 3' 5' CTT GGT GGC GAG CTG TTT 3'	50

*Para la amplificación de esta región en los cromosomas X y B₂₄ se han diseñado cebadores específicos utilizando el programa online Primer3 v. 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000)
T, Temperatura de hibridación en grados centígrados (°C)

La reacción de PCR se ha llevado a cabo en 100 ng de DNA, 1x PCR buffer sin Mg²⁺, 2 mM MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 0,4 pmol/μl de cada uno de los cebadores y 1 U de MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002).

*Reacción de amplificación	Cantidad
Agua miliQ	15,3 μl
10x PCR buffer sin Mg ²⁺	2,5 μl
25 mM MgCl ₂	2 μl
2 mM dNTPs	2 μl
10 μM cebador 1	1 μl
10 μM cebador 2	1 μl
MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002)	0,2 μl
DNA molde (100 ng)	1 μl
Volumen final	25 μl

* En el caso de la amplificación de los ITS, a la reacción de amplificación se le añadió, además, 1 μl de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma).

Las condiciones de amplificación fueron:

Desnaturalización inicial	94 °C, 5 minutos
Realizar 30 ciclos de:	
Desnaturalización	94 °C, 20 segundos
Hibridación	T*, 20 segundos
Extensión	72 °C, 45 segundos
Extensión final	72 °C, 7 minutos
Mantener	4 °C,

*Temperatura de hibridación de cada par de cebadores

La visualización del producto de PCR se ha realizado en geles de agarosa al 1,5%.

En algunos casos, las bandas obtenidas se han recortado y limpiado con el kit GenElute[®] Gel Extraction (Sigma) y en otros, el producto de PCR se ha limpiado con el kit GenElute[®] PCR Clean-Up (Sigma).

6. CLONACIÓN

Reacción de ligación

Las diferentes secuencias se han ligado al vector TOPO TA *cloning* (Invitrogen) en la siguiente reacción:

Reacción de ligación	Cantidades
TOPO vector	1 μ l
Solución salina	1 μ l
Producto de PCR	4 μ l
Volumen final	6 μ l

- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, para favorecer la formación del mayor número de moléculas recombinantes.
- Parar la reacción de ligación colocando el vial en hielo.

Transformación

Las moléculas recombinantes se han introducido dentro de las células competentes One Shot[®] TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

Siempre que se trabaje con bacterias se mantendrán las condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones y, por tanto, hay que trabajar en campana de flujo laminar.

- Añadir 2 μ l de la reacción TOPO *cloning* dentro de un vial con las células competentes, mezclar suavemente e incubar en hielo 30 minutos.
- Choque térmico a las bacterias introduciendo el vial en el baño a 42 °C sin agitación durante 30 segundos.
- Pasar inmediatamente el tubo a hielo.
- Añadir 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente.
- Cerrar el tubo bien (parafina) y agitarlo a 225 rpm horizontalmente a 37 °C durante 1hora.

- Extender 10–50 µl de cada transformación en una placa de medio LB con 50 µg/µl ampicilina e incubar a 37 °C toda la noche.

Selección de colonias

Seleccionar las colonias blancas o ligeramente azules que son aquellas que han integrado la molécula recombinante. Para ello, picar con un palillo de dientes autoclavado cada colonia seleccionada y depositarla en 2 ml de LB líquido con 50 µg/µl de ampicilina. Incubar toda la noche con agitación a 37 °C para el crecimiento de las bacterias.

PCR de control de la transformación

Se realiza una PCR para comprobar el correcto proceso de transformación en los clones seleccionados. Para ello, se realiza una PCR con los cebadores utilizados para amplificar el inserto y con las mismas condiciones de amplificación en las que se obtuvo la banda clonada. En el momento de la selección de clones, antes de depositar el palillo en medio LB de crecimiento, se toca ligeramente el tubo de reacción.

Almacenaje de las colonias

Cada uno de los clones obtenidos se dividió en dos partes, de la siguiente forma:

- En un tubo 1,5 ml, añadir 500 µl de cultivo de bacterias con 200 µl de glicerol. Se agita en un vortex y se conserva a –80 °C.
- El resto de cultivo de bacterias, se añade a otro tubo 1,5 ml para extraer el DNA plasmídico.

7. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO. MINIPREP

La extracción del DNA plasmídico se ha realizado utilizando el kit Perfectprep® Plasmad Mini (Eppendorf). Cuando se abre un kit nuevo hay que preparar la solución de purificación añadiendo a los 15 ml de *DILUTED Purification Solution*, 15 ml de etanol absoluto.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

- Transferir 1,5 ml de cultivo de bacterias a un tubo de 1,5 ml.
- Centrifugar a 16000 x g durante 1 minuto para obtener el sedimento de células.
- Decantar el sobrenadante, evitando perder el sedimento de células.

- Añadir al sedimento de células, 100 µl de la Solución 1. Resuspender completamente por agitación vigorosa en un vortex.
- Añadir 100 µl de la Solución 2 y mezclar bastantes veces invirtiendo suavemente los tubos para así lisar las células. No usar el vortex.
- Añadir 100 µl de la Solución 3 e inmediatamente mezclar invirtiendo vigorosamente los tubos varias veces para así neutralizar la lisis celular. No usar el vortex.
- Centrifugar los tubos a 16000 x g durante 1 minuto para precipitar los restos celulares, proteínas y DNA cromosómico. Transferir el sobrenadante (donde se encuentra el DNA plasmídico) a una columna en un tubo limpio.
- Mezclar vigorosamente la solución *DNA Binding Matriz* antes de pipetearla.
- Añadir 450 µl de la solución *DNA Binding Matriz* a la columna. Mezclar varias veces invirtiendo vigorosamente los tubos.
- Centrifugar las muestras a 16000 x g durante 1 minuto. Decantar el filtrado.
- Añadir 400 µl *DILUTED Purification Solution* a las columnas. Cerrar las muestras y mezclar bien. Centrifugar a 16000 x g durante 1,5 minutos.
- Decantar el filtrado. Centrifugar a 16000 x g para eliminar los restos de etanol que hayan quedado.
- Transferir la columna dentro de un tubo de 1,5 ml limpio y añadir 60 µl de *Elution Buffer*. Mezclar la matriz y la solución de elución vigorosamente mediante vortex.
- Centrifugar a 16000 x g durante 2 minutos.
- Eliminar la columna y guardar el DNA plasmídico a -20 °C.

8. SECUENCIACIÓN

Las secuenciaciones las hemos realizado en el Servicio de Análisis Genético del Departamento de Genética de la Universidad de Granada. Algunas secuenciaciones han sido realizadas por las empresas MWG Biotech AG (Alemania) y Macrogen Inc (Corea).

8.1. Protocolo de secuenciación del Servicio de Análisis Genético del Departamento de Genética de la Universidad de Granada

Cuantificación de la cantidad de DNA

Cuantificar exactamente la cantidad de DNA que se pone en la reacción de secuenciación.

Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se ha realizado con el kit Big Dye Terminator v. 3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems) en un volumen total de 10 μ l ó 20 μ l. Los cebadores deben de estar a una concentración de 3,2 pmol/ μ l (3,2 μ M).

Reactivos	Producto de PCR	Vector de clonación
Agua miliQ	hasta 10 μ l ó 20 μ l	hasta 10 μ l ó 20 μ l
5x Buffer	-	2 μ l ó 4 μ l
BDT o Premix	3 μ l	3 μ l
Cebadores 3,2 μ M	1 μ l	1 μ l
DNA muestra	40-50 ng	500-700 ng
Volumen Total	10 μ l ó 20 μ l	10 μ l ó 20 μ l

En algunos casos se ha añadido 1 μ l de DMSO a la reacción de secuenciación

Programa de secuenciación

La temperatura de hibridación del programa de secuenciación debe ser un par de grados más baja que la temperatura de hibridación usada en la PCR. Para los cebadores universales M13F y M13R, la temperatura de hibridación es 50 °C.

Desnaturalización inicial	95 °C, 3 minutos
Realizar 25 ciclos de:	
Desnaturalización	96 °C, 10 segundos
Hibridación	50 °C, 5 segundos
Extensión	60 °C, 4 minutos
Mantener	4 °C

Precipitación de las secuencias

Hay que evitar la luz durante todo el proceso, así que es necesario acondicionar la gradilla donde se colocan los tubos.

- La mezcla de Etanol/Acetato sódico se prepara en el momento de su utilización, con los siguientes volúmenes por muestra:

Mezcla de	
Etanol/Acetato sódico	Cantidades
*Etanol al 95%	62,5 µl
Acetato sódico 3M pH 4,6	3 µl
Agua ultrapura	14,5 µl
Volumen final	80 µl

*preparar en el momento

- Añadir 80 µl de la mezcla anterior a los 10 ó 20 µl de la reacción de secuenciación. Agitar en el vortex.
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (no dejar más de 1 hora).
- Centrifugar a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.
- Eliminar la solución de etanol volcando el tubo sobre papel de filtro. Si no se elimina todo el etanol no pasa nada porque hay que volver a añadir etanol.
- Añadir 250 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Eliminar la solución de etanol al máximo, volcando sobre papel de filtro. El resto de etanol que quede, retirarlo con la pipeta de 2µl. Si es necesario, volver a centrifugar para recuperar mejor los µl de etanol que se hayan quedado por la pared del tubo.
- Secar el sedimento a 37 °C el tiempo necesario. Se puede almacenar el sedimento seco a -20 °C como máximo un año.
- Resuspender en 20 µl de formamida (específica para secuenciación) usando el vortex.

Durante la fase de precipitación: los ddNTPs se encuentran en el etanol por lo que hay que eliminar todo el etanol sin evaporarlo, para que los ddNTPs no interfieran en la secuenciación. El etanol absoluto ha de ser de máxima calidad.

Las secuenciaciones se han realizado en un equipo 3100-Avant genetic Analyzer de electroforesis capilar (4 capilares), de Applied Biosystems.

8. 2. Secuenciación en la empresa MWG Biotech AG

Se han enviado 250 ng de cada una de las muestras en forma liofilizada. Para ello, el DNA se ha precipitado previamente con 3 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato sódico. Procedimiento:

- Precipitar 250 ng con 3 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5,2.

- Incubar a -20 °C entre 16-24 horas.
- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Lavar con 100 µl de etanol al 70% frío.
- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Secar durante 15 minutos con un speed-vac durante 15 minutos.
- Enviar para secuenciar.

Dirección Web: <http://www.eurofinsdna.com/home.html>

8.3. Secuenciación en la empresa MacroGen Inc

Para la secuenciación se han enviado entre 125 ng y 250 ng, en 15 µl de cada una de las muestras.

Dirección Web: http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

PROGRAMAS

BIOINFORMÁTICAS

Dirección web

BioEdit v7.9.0

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>

(Hall 1999)

BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

MAFFT v5

<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>

(Kato et al. 2002)

MEGA 4

<http://www.megasoftware.net/>

(Tamura et al. 2007)

DnaSP v4.20.2

<http://www.ub.edu/dnasp/>

(Rozas et al. 2003)

satDNA Analyzer

<http://satdna.sourceforge.net/>

(Navaja-Pérez et al. 2006)

RDP3

<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>

(Martín et al. 2005)

mfold v3.2 (Zuker et al. 1999)	http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=mfold
Modeltest v3.8 (Posada 2006)	http://darwin.uvigo.es/software/modeltest_server.html
PAUP* v4.0b10 (Swofford 2002)	http://paup.csit.fsu.edu/about.html
Primer3 v0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000)	http://frodo.wi.mit.edu/
BASES DE DATOS	Dirección web
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html
UNIPROT	http://www.uniprot.org/

Secuencias externas (outgroups)

Listados de secuencias extraídas de la bases de datos Genbank,

SECUENCIAS OUTGROUPS
Secuencias ITS de DNAr 18/28 <i>Chorthippus parallelus</i> AY585651
Secuencia DNA ribosómico 5S <i>Mytilus edulis</i> AJ312087

2.3. TAMPONES Y SOLUCIONES

1. TAMPONES BIOLÓGICOS

Para mantener la integridad de las estructuras biológicas hay que tener en cuenta tanto los cambios de pH como la concentración de iones monovalentes, principalmente el Na^+ , que es el principal catión que forma parte de los fluidos extracelulares y afecta a la estabilidad de determinadas moléculas como son los ácidos nucleicos. Por ello se utilizan, de manera rutinaria en el laboratorio, tampones basados en el sistema monofosfato-difosfato y soluciones salinas.

Para la realización de los tampones biológicos se ha utilizado agua destilada y posteriormente se han esterilizado por autoclave para de esta manera evitar la contaminación por hongos y bacterias.

Tampón fosfato pH 6.8

Es una solución basada en el sistema tampón fosfato (monofosfato-difosfato), formada por fosfato disódico y fosfato monopotásico.

En 1 litro de agua destilada se disuelve,

KH_2PO_4 4,61 g
 Na_2HPO_4 ... 4,66 g

Se ajusta el pH a 6,8. Autoclavar.

1x PBS (Phosphate Buffer Saline)

Es una solución salina en tampón fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4). En ella, las células pueden mantenerse vivas durante varias horas por lo que se suele utilizar en cultivos celulares. Además, se utiliza en diversas técnicas citogenéticas y moleculares para realizar los diferentes lavados y tratamientos.

Para su preparación, en 800 ml de agua destilada añadir,

NaCl 8 g
 KCl 0,2 g
 Na_2HPO_4 1,44 g
 KH_2PO_4 0,24 g

Ajustar el pH con HCl a 7,4 y completar hasta 1 litro con agua destilada. Esterilizar por autoclave.

Se puede preparar una solución de 10x de PBS para evitar contaminación de microorganismos e ir haciendo diluciones 1x PBS.

El fosfato disódico y el fosfato monopotásico pueden sustituirse por fosfato sódico dihidratado (1,40 g $\text{PO}_4\text{HNa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Solución salina para insectos

Añadir a 800 ml de agua destilada, las siguientes cantidades,

NaCl.....7,50 g
KCl 0,25 g
CaCl₂ 0,30 g
NaHCO₃ 0,20 g

Ajustar el pH a 7,3. Completar hasta un litro con agua destilada. Autoclavar.

2x SSC

Solución salina citratada (300mM NaCl, 30mM Citrato Sódico), un tampón débil de iones sodio que se usa como medio isotónico, para regular la concentración de iones sodio y controlar el pH. En general, se usa en técnicas citogenéticas para realizar lavados. En hibridación *in situ* se utiliza para controlar la astringencia de la reacción de hibridación ya que a bajas concentraciones de iones Na⁺ se desestabiliza la molécula de DNA, facilitándose la hibridación de la sonda con la secuencia diana (Roskams & Rodgers 2002).

El 2x SSC usado para Bando C se utiliza a pH 6,8; mientras que para FISH se utiliza a pH 7,4.

Para su preparación, en 800 ml de agua destilada se disuelve,

NaCl₄ 17,52 g
Na₃C₆H₅O₇... 8,82 g

El pH se ajusta con ácido clorhídrico y se completa hasta 1 litro con agua destilada. Autoclavar.

Se puede hacer una solución stock de 20x SSC.

Tris-HCl

El Tris (tris-[hidroxymethyl]amino-methane) es un tampón con gran capacidad reguladora a valores de pH similares a los biológicos y que tiene la ventaja de que no presenta ningún ión libre en suspensión. Por ello se utiliza para la resuspensión de los ácidos nucleicos y como tampón de determinadas enzimas.

Para 1M Tris-HCl,

- Disolver 121,1 g de Tris-base en 800 ml de agua destilada.

- Ajustar el pH deseado añadiendo HCl concentrado:

pH	HCl
7,4	70 ml
7,6	60 ml
8,0	42 ml

- Completar hasta 1 litro con agua destilada
- Autoclavar

Para preparar 100 ml de 500 mM Tris-HCl pH 6,8, disolver en 60 ml de agua ultrapura 6 g de Tris-base. Ajustar el pH hasta 6,8 con HCl y enrasar hasta 100 ml con agua ultrapura.

Tampón TE pH 8.0

Es un tampón basado en Tris-HCl al pH deseado y EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0), y se suele utilizar para la resuspensión del DNA y oligonucleótidos.

Para preparar 250 ml de este tampón, se mezcla en 240 ml de agua destilada,

1 M Tris-HCl pH deseado.....	2,5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0.....	0,5 ml

Se enrasa en un matraz aforado hasta 250 ml con agua destilada.

Autoclavar.

Tampón McIlvaine pH 7.0

Formado por 100 mM ácido cítrico y 2 mM Na₂HPO₄

Para obtener 200 ml de tampón McIlvaine, se prepara 200 ml de cada una de las dos disoluciones.

- Por un lado, se añade, en 200 ml de agua destilada, 5,67 g de Na₂HPO₄ para obtener la molaridad de 200 mM.
- Por otro lado, se prepara ácido cítrico a 100 mM, añadiendo 3,84 g de este ácido a 200 ml de agua.
- Finalmente se va añadiendo al fosfato disódico el ácido cítrico hasta alcanzar el pH 7,0.

Soluciones de lavado

Estas soluciones se utilizan en técnicas citogenéticas-moleculares para una mejor eficiencia de los lavados. Están formadas por un tampón salino, normalmente 2x SSC o 1x PBS, que controlan el pH y aportan sales evitando que se desestabilice la hibridación, ya sea de DNA o de proteínas, en las que se

disuelve un detergente, normalmente Tween 20, que ayuda al lavado uniforme de las preparaciones.

Para preparar **4x SSC/Tween 20**, en 80 ml de agua destilada se añaden 20 ml de 20x SSC y 200 µl de Tween 20.

Para preparar **0.4x SSC/0.3% igepal**, en 98 ml de agua destilada se añaden 2 ml de 20x SSC y 300 µl de igepal.

Para preparar **2x SSC/0.1% igepal**, mezclar 90 ml de agua destilada con 20x SSC y añadir 100 µl de igepal.

Para preparar **PBT**, en 90 ml de agua destilada se añaden 10 ml de 10x PBS y 200 µl de Tween 20.

2. TAMPONES DE ELECTROFORESIS

5x TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA)

Para preparar la solución stock 5x TBE se disuelve en 800 ml de agua destilada,

Tris-base	54 g
Ácido bórico.....	27,5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0.....	20 ml

Ajustar el pH a 8,0 con ácido bórico, enrasar hasta 1 litro con agua destilada y autoclavar.

Para la preparación de los geles de agarosa se diluye el tampón a 1x TBE, mientras que como tampón de electroforesis se usa la dilución 0,5x TBE.

3. FIJADORES

Etanol: acético (3:1)

Fijador universal para la preservación de la cromatina y visualización de los cromosomas. El etanol potencia la acción fijadora del ácido acético.

Para preparar 100 ml de fijador, mezclar en una probeta:

Etanol absoluto...	75 ml
Ácido acético.....	25 ml

Es conveniente prepararlo extemporáneamente.

Ácido acético

Fija la cromatina, pero destruye el RNA y proteínas por lo que no mantiene la integridad de las estructuras, retrayendo los tejidos. Principalmente se utiliza en citogenética para facilitar la adherencia de los cromosomas al cristal del portaobjetos. Además, al destruir las proteínas, hace accesible el DNA de los cromosomas.

Se utiliza a determinados porcentajes.

Ácido acético 50% (10 ml): 5 ml de ácido acético y 5 ml de agua destilada,

Ácido acético 70% (10 ml): 7 ml de ácido acético y 3 ml de agua destilada

Se recomienda prepararlo justo antes de su uso.

Paraformaldehído 4% (w/v)

Es un fijador que mantiene la morfología tridimensional de las estructuras biológicas, por lo que se utiliza para fijar tejidos celulares. En la técnica de hibridación *in situ*, en un paso previo a la hibridación, se realiza un paso de fijación de las preparaciones en paraformaldehído al 4% para preservar la morfología de los cromosomas y favorecer la penetración de la sonda.

Hay que prepararlo inmediatamente antes de su uso, y para ello,

- Añadir a 70 ml de agua destilada 4 g de paraformaldehído.
- Calentar a 60 °C en una cámara de extracción de gases y agitar.
- Una vez que esté disuelto se le añade 0,5 ml de 4 M NaOH, para clarificar la solución.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade el resto del agua destilada hasta completar 100 ml.

Formaldehído

Semejante al paraformaldehído. Permite la penetración de anticuerpos y sondas de ácidos nucleicos.

4. REACTIVOS

Colchicina

La colchicina es un compuesto antimitótico que actúa sobre proteínas del huso miótico deteniendo la división celular en metafase o anafase.

Para obtener un mayor número de células en metafase mitótica, los embriones y ovarios de hembras adultas son tratados previamente con colchicina antes de su fijación en etanol: acético (3:1).

Para preparar colchicina al 2%, diluir 2 g de colchicina (Sigma) en 100 ml de solución salina para insectos.

Para preparar colchicina al 0.1%, diluir 0,1 g de colchicina (Sigma) en 100 ml de solución salina para insectos.

EDTA

El EDTA (Ethylen diamine tetraacetic acid) es un agente quelante que retiene iones, tales como Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Una de sus funciones en tampones biológicos, tales como el tampón TE, es que atrapa iones Ca^{2+} para inactivar nucleasas que pudiesen degradar moléculas de ácidos nucleicos u oligonucleótidos.

Para preparar 0,5 M EDTA pH 8,0, añadir a 800 ml de agua destilada,

EDTA..... 181,6 g
NaOH..... ~20 g, para ajustar el pH a 8,0

Completar con agua destilada hasta 1 litro y autoclavar.

BSA

La albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) es una proteína de alta pureza, que se utiliza en los laboratorios biológicos para multitud de técnicas: como patrón para cuantificar proteínas, como agente bloqueador en inmunoensayos, como estabilizador de proteínas y conjugados o como sustrato para inhibir la acción de determinadas enzimas.

Para preparar 10 ml de BSA 10%, hay que diluir 10 g de BSA (Sigma) en 100 ml de 1x PBS.

Se conserva en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pepsina

Es una enzima digestiva. Su temperatura óptima de acción es de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utiliza en hibridación *in situ* fluorescente para eliminar parte del citoplasma de las células, permeabilizarlas y facilitar la entrada de la sonda.

Para preparar la solución stock de 5 mg/ml, se disuelve 0,005 g de pepsina (Sigma) en 0,01 N de HCl,

Para preparar 1 ml de la solución de trabajo a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se diluye 10 μl de la solución de pepsina a 5 mg/ml en 990 μl de 2x SSC.

Tripsina

Es una enzima digestiva, que se utiliza habitualmente para la disgregación de tejidos. Su temperatura óptima de acción es de 37 °C.

Para preparar tripsina al 0,25%, se disuelve 0,25 g de tripsina (Sigma) en 100 ml de 1x PBS.

RNasa A (DNA free)

Preparar 10 ml de la disolución stock de RNasa A, a 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 5 mM NaCl,

- Disolver en 10 ml de agua ultrapura,

RNAasa (Sigma).....	100 mg
1 M Tris-HCl pH 7,5..	100 µl
5 M NaCl	30 µl

- Calentar a 100 °C durante 15 segundos al baño maría para eliminar la contaminación de DNasa.
- Dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente.
- Enrasar hasta 10 ml, en caso de que se haya evaporado el agua durante el calentamiento.
- Distribuir en alícuotas de 1 ml y almacenar a -20 °C.

Para hibridación *in situ* se utiliza 200 µl de RNasa a 100 µg/ml, por lo que para una preparación se mezcla,

10 mg/ml RNasa A.....	2 µl
2x SSC pH 7,4.....	198 µl

Formamida

La N,N-dimetilformamida es un compuesto orgánico con un alto punto de ebullición utilizado como disolvente para reacciones químicas.

Para preparar 100 ml de Formamida 70% en 2x SSC, mezclar

Agua destilada.....	20 ml
20x SSC.....	10 ml
Formamida.....	70 ml

DTT (Dithiothreitol)

Para preparar 200 ml de 1 M DTT, disolver 3,02 g de DTT en 200 ml de una solución 10 mM de acetato sódico pH 5,2. Esterilizar por filtración. Hacer alícuotas de 1 ml y guardar a -20 °C.

Mezcla de nucleótidos no marcados, ACG

Para el marcaje de la sonda por *nick translation* se necesita una mezcla de nucleótidos no marcados, correspondientes a adenina, citosina y guanina (ACG). El uracilo es el nucleótido que está marcado con el fluorocromo.

La solución de trabajo de los nucleótidos no marcados, ACG, es 200 μM . Cada stock de nucleótido está a una concentración de 100 mM, por lo que hay que diluirlo.

Para preparar 500 μl de ACG no marcados, en 497 μl de agua ultrapura se añade 1 μl de cada una de los nucleótidos no marcados. Se mezcla bien la solución y se hacen alícuotas de 100 μl que se guardan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Esperma de salmón

El ADN de esperma de salmón es utilizado en la mezcla de hibridación para evitar uniones inespecíficas de la sonda.

El esperma de salmón está a una concentración de 100 ng/ml y hay que diluirlo a 50 ng/ml para su uso. Para preparar 100 μl de esperma de salmón, añadir a 50 μl de agua ultrapura a 50 μl de esperma de salmón a 100 ng/ml. Hacer alícuotas de 20 μl y guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10% SDS

El SDS (sodium dodecyl sulfate) es un detergente que ayuda a solubilizar las membranas facilitando de esta manera la hibridación de la sonda a las secuencias diana.

Para preparar 10 ml de SDS al 10% se disuelve 10 g de SDS en 10 ml de agua ultrapura. Una vez disuelto se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Puede guardarse a temperatura ambiente o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole)

Es un fluorocromo que se une monocovalentemente a regiones ricas en AT de los ácidos nucleicos. Es excitado dentro del espectro de la luz ultravioleta, a 365 nm, y emite fluorescencia azul a $> 420\text{ nm}$. Se suele utilizar como contratinción en técnicas inmunofluorescentes.

Para preparar la solución stock: 1 mg de DAPI se disuelve en 1 ml de agua destilada.

Para la tinción de una preparación, se disuelve 2 μl de la solución stock de DAPI en 98 μl de tampón McIlvaine pH 7,0.

Ioduro de Propidio

El ioduro de propidio (IP) es una molécula fluorescente que se une estequiométricamente al DNA. Esta molécula se excita a 493 nm y emite fluorescencia roja a 630 nm. Se utiliza en citometría de flujo para cuantificar la cantidad de DNA o en hibridación *in situ* fluorescente, como contratincción.

Para preparar la solución stock de ioduro de propidio a 2 mg/ml, disolver 1 mg de IP (Sigma) en 500 μ l de agua milQ.

A partir de la solución stock se prepara la solución de trabajo a 400 mg/ml, diluyendo 100 μ l de IP 2mg/ml en 400 μ l de 2x SSC.

Ampicilina

La ampicilina es un antibiótico derivado de la penicilina, que inhibe el crecimiento bacteriano porque bloquea la síntesis de la pared celular.

Para preparar la solución stock de ampicilina a 50 mg/ml, disolver en agua ultrapura 0,5 g de ampicilina (Sigma), enrasar hasta 10 ml con agua ultrapura. Esterilizar por filtración en filtros de 0,22 μ m. Hacer alícuotas de 1 ml y guardar a -20 °C.

La ampicilina se diluye a una concentración de 0,5 μ g/ml en medio LB.

5. SOLUCIONES QUÍMICAS

5 M NaCl

Disolver en 800 ml de agua destilada,

NaCl... 292,2 g

Ajustar el volumen a 1 litro. Hacer alícuotas. Autoclavar.

1 N HCl

Para preparar un litro de 1 N HCl, hay que añadir a 1 litro de agua destilada,

HCl... 86,2 ml

A partir de 1 N HCl se prepara 0,1 N HCl necesario para diluir la pepsina. A 500 ml de agua destilada añadir 4,31 ml de 1N HCl.

10 N NaOH

Para preparar 100 ml de 10 N NaOH, disolver en 100 ml de agua destilada,

NaOH··· 40 g

La dilución de NaOH a 4 N, necesaria para clarificar el paraformaldehído durante su preparación, se realiza a partir de 10 N NaOH. Para preparar 1 ml de esta dilución, se mezclan 400 µl de 10 N NaOH y 600 µl de agua destilada.

3 M de acetato sódico pH 5,2

Se utiliza para la precipitación de ácidos nucleicos.

Para preparar 20 ml, disolver en 18 ml de agua destilada,

Acetato sódico··· 12,30 g

Ajustar el pH a 5,2 con ácido acético. Enrasar a 20 ml. Autoclavar. Mantener a temperatura ambiente.

6. MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB (Luria-Bertani)

Medio de cultivo enriquecido en nutrientes utilizado para el crecimiento de bacterias.

Para hacer 1 litro de medio LB líquido disolver en 900 ml de agua destilada,

Tristona·········· 10 g
 Extracto de levadura····· 5 g
 NaCl··········10 g

Ajustar el pH a 7.0 con hidróxido sódico y enrasar hasta 1 litro con agua destilada. Autoclavar. Dejar enfriar hasta los 55 °C y añadir 100 µl de ampicilina a 50 mg/ml. Guardar a 4 °C.

Placas con medio LB-agar

Disolver 15 g de agar en un litro de medio líquido LB. Autoclavar y posteriormente dejar enfriar a 55 °C antes de la adición del antibiótico (100 µl de ampicilina a 50 mg/ml). Añadir 20 ml de este medio a cada una de las placas y dejar que solidifique el agar. Guardar las placas invertidas a 4 °C en oscuridad.

Antes del uso de las placas LB-agar añadir el inductor X-Gal. Calentar previamente las placas a 37 °C durante 30 minutos antes de añadir 40 µl de X-

Gal 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en cada una de las placas, distribuir homogéneamente. Guardar las placas invertidas a 37 °C hasta su utilización.



Origen de los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*

El objetivo de este capítulo es profundizar en la naturaleza molecular y el origen de estos cromosomas B. Para ello, y teniendo como hipótesis de trabajo el posible origen de los cromosomas B de *E. plorans* en la Península Ibérica a partir del cromosoma X (López-León et al. 1994), hemos procedido a la microdissección del cromosoma X y del cromosoma B₂₄ de *E. plorans* y a la posterior hibridación de las sondas generadas a partir de los cromosomas microdisseccionados con el resto de cromosomas del complemento.

Además, hemos amplificado varias secuencias de DNA procedentes del DNA genómico de *E. plorans* y del DNA de los cromosomas X y B₂₄ microdisseccionados para una posterior comparación. Las secuencias amplificadas fueron: un DNA repetitivo de 180 pb, las secuencias ITS del DNA ribosómico 18/28S, los genes para el ARN ribosómico 5S y los genes para las histonas H3 y H4.

3.1. ANÁLISIS CITOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS X Y B DE *E. PLORANS*

Introducción

El sistema de cromosomas B de *E. plorans* se caracteriza por ser altamente polimórfico, habiéndose descrito múltiples tipos (Henrique-Gil et al. 1984, López-León et al. 1993), aunque sólo algunas variantes consiguen ser estables. En las poblaciones españolas analizadas de este saltamontes se han descrito varios polimorfismos para cromosomas B: los cromosoma B₁, B₂, B₅ y más recientemente el cromosoma B₂₄. Estos cromosomas B están compuestos mayoritariamente por dos tipos de secuencias de DNA repetitivo: un DNA satélite de 180 pb (satDNA) y DNA ribosómico 45S (rDNA). El primero está situado en las bandas C más oscuras y proximales, mientras que el segundo se encuentra en la región distal más clara. La proporción de estos dos tipos de secuencias, y el correspondiente patrón característico de bandas C, es lo que define los diferentes tipos de cromosomas B. La presencia de ambos tipos de secuencias en todas las variantes analizadas en poblaciones del Mediterráneo occidental, sugiere el origen común de todas ellas (Cabrero et al. 1999).

La variante con la distribución geográfica más amplia en las poblaciones ibéricas es el cromosoma B₁, que está presente en la mayoría de las poblaciones analizadas, por lo que se le considera el cromosoma B ancestral en la Península Ibérica (Henrique-Gil et al. 1984) y Baleares (Riera et al. 2004). Sin embargo, esta variante está casi ausente en las poblaciones de Andalucía oriental. El cromosoma B₁ se caracteriza por presentar dos bandas C de similar tamaño cerca del centrómero, que contienen satDNA, y una región distal de mayor tamaño donde se encuentra el rDNA (Cabrero et al. 1999). En poblaciones de la cabecera del río Segura (Albacete), no se ha encontrado ningún tipo de cromosoma accesorio (Cabrero et al. 1997).

El cromosoma B₂ presenta el doble de rDNA que de satDNA, y posiblemente se originó a partir del cromosoma B₁ por incremento en la cantidad de satDNA y pérdida en el contenido de rDNA. Éste es el tipo de B más frecuente en las poblaciones de la provincia de Granada y en el oeste de la de Málaga.

La variante B₅ es frecuente en Fuengirola (Málaga), y se caracteriza citogenéticamente por presentar una gran banda de heterocromatina cerca del centrómero y una región distal clara más pequeña. Está compuesto por mayor cantidad de satDNA que de rDNA.

El cromosoma B₂₄ es una variante observada por primera vez en 1984 en la población malagueña de Torrox (Henriques-Gil & Arana 1990), que aumentó rápidamente en frecuencia desplazando a la variante B₂ (Zurita et al. 1998). B₂₄ es ligeramente más grande que B₂ y se caracteriza por presentar tres bloques de satDNA y un pequeño bloque distal de rDNA, siendo unas cinco veces mayor la cantidad de satDNA que de rDNA. Dado que B₂₄ apareció en una zona geográfica donde el B más frecuente era B₂, es razonable pensar que B₂₄ se

originó a partir de B₂ mediante sobrecruzamiento desigual y delección de parte del rDNA (véase Henriques-Gil & Arana 1990, Cabrero et al. 1999).

La presencia y distribución del satDNA y el rDNA en los cromosomas A de *E. plorans* sugiere el posible origen intraespecífico de los cromosomas B a partir del cromosoma X, ya que ambos cromosomas son los únicos que presentan estas dos secuencias en el mismo orden con respecto al centrómero (centrómero-satDNA-rDNA) (López-León et al. 1994). En concreto, los resultados de FISH permitieron a estos autores sugerir que el cromosoma B se originó a partir de la región proximal del cromosoma X, con amplificación posterior de esta región.

Para investigar el origen de los cromosomas B, nos propusimos analizar algunos aspectos sobre su naturaleza molecular que, pudieran proporcionarnos pruebas adicionales de su origen intraespecífico. Para ello, y teniendo como hipótesis de trabajo el posible origen a partir del cromosoma X, realizamos la microdissección del cromosoma X y del cromosoma B₂₄ de *E. plorans* y analizamos mediante la técnica de *chromosome painting* la posible similitud intragenómica.

La microdissección es una técnica que se ha revelado como una herramienta citológica fundamental para profundizar en el contenido molecular de los cromosomas B. Fue utilizada por primera vez por McQuade et al. (1994) para la microdissección del cromosoma B del marsupial *Petauroides volans* y desde entonces ha aumentado el número de publicaciones donde se utiliza esta técnica para conocer la composición molecular de los cromosomas B de multitud de organismos (para más detalle véase Camacho 2005 Pág. 234). El *chromosome painting* consiste en la generación de sondas a partir del DNA de cromosomas aislados por microdissección o por *sorted* para su hibridación con el resto de cromosomas del complemento o de especies relacionadas. Esta técnica permite analizar la evolución de los cromosomas al poner de manifiesto la existencia de homología, reorganizaciones intrer- e intra- cromosómicas y sintenia (Guan et al. 1994).

Material y métodos

La microdissección de los cromosomas X y B₂₄ fue realizada a partir de espermatocitos primarios en diplotene de dos machos capturados en noviembre de 2006 en Torrox (Málaga). Los testículos de estos machos fueron fijados en etanol: acético (3:1) durante 10 minutos y se trasvasaron a tubos de 1,5 ml con 500 µl de etanol al 70% que fueron conservados a -20 °C hasta su utilización. Uno de estos individuos presentaba un B₂₄ y el otro dos B₂₄.

Las preparaciones citológicas se realizaron, justo en el momento de la microdissección, en ácido acético al 50% y sobre cubreobjetos de 24x60mm previamente tratados con 10x SSC y precalentados a 27 °C en un *termoblock*

para favorecer la fijación del material al cubreobjetos. Las preparaciones no fueron teñidas con ningún colorante ya que tanto el cromosoma B₂₄ como el cromosoma X son fácilmente reconocibles por su heteropicnosis positiva y por ser el X de mayor tamaño (Fig. 3.1).



Figura 3.1. Microscopía óptica en contraste de fase de un espermatocito primario en diplotene, mostrando el diferente tamaño y apariencia de los cromosomas X y B que les hace fácilmente reconocibles para la microdissección.

La microdissección de los cromosomas se realizó en un microscopio invertido, Zeiss Axiovert 200, acoplado a un micromanipulador electrónico, Eppendorf TransferMan NK 2 en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Sánchez Baca de la Universidad de Jaén. Para la microdissección utilizamos agujas de vidrio, que fueron fabricadas a partir de capilares de vidrio de 2 mm de diámetro con un *pipette puller* (Bachofer) horizontal de dos pasos y esterilizadas previamente mediante radiación ultravioleta. Los cromosomas fueron recortados a partir de células en diplotene o paquitene donde se encontraban suficientemente separados, para así evitar posibles contaminaciones.

Realizamos dos microdissecciones de cada uno de los cromosomas objeto de estudio. En el caso del cromosoma B₂₄ empleamos dos métodos diferentes para amplificar el DNA cromosómico, el método clásico por DOP-PCR (Telenius et al. 1992) y un método adicional que usa el Kit GenomePlex[®] Single Cell de Sigma (Langmore 2002).

DOP-PCR (Degenerated-oligonucleotide primed PCR) es la técnica comúnmente utilizada para la amplificación del DNA cromosómico obtenido por microdissección o por *chromosome sorting*. El inconveniente de esta técnica es que amplifica preferencialmente las secuencias altamente repetidas del genoma (Houben et al. 2001). Para evitar este sesgo, decidimos probar a amplificar el DNA de los cromosomas microdisseccionados con el Kit GenomePlex® Single Cell de Sigma, que ya había sido utilizado para la amplificación de DNA cromosómico aislado por citometría de flujo (Gribble et al. 2004). El método GenomePlex® es un procedimiento de amplificación de todo el genoma (Whole Genome Amplification, WGA) basado en la PCR. Consta de tres pasos: fragmentación del DNA, posterior ligación a los fragmentos de una serie de adaptadores Omniplex® y amplificación de estos fragmentos utilizando cebadores específicos para estos adaptadores. La ventaja que presenta este método es que se necesita poca cantidad de DNA para la amplificación inicial y que al unírseles adaptadores se favorece una mayor representación del genoma que mediante DOP-PCR. Este método también presenta inconvenientes, principalmente debidos a la fragmentación del DNA y a su posterior ligación a adaptadores, ya que ambas características hacen que se obtengan fragmentos de tamaño medio de 400 pb limitando la posterior amplificación por PCR de fragmentos de mayor longitud.

Entre 12 y 15 cromosomas fueron recogidos en tubos de 0,2 ml con 20 µl de 1x buffer Roche (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM Cl₂Mg, 50 mM KCl pH 8,3) cuando éstos fueron amplificados por DOP-PCR, o con 9 µl de agua ultrapura libre de DNAsas cuando se usó el método GenomePlex®.

Para el cromosoma X se ha utilizado en los dos casos el método GenomePlex® para amplificar el DNA cromosómico.

Cuando el DNA cromosómico fue amplificado por el método de Sigma, se procedió a continuación a una reamplificación del DNA y posterior marcaje por el método de *nick traslation* con rhodamine-11-dUTP y fluorogreen-11-dUTP. En caso de amplificar el DNA por DOP-PCR, la segunda PCR sirvió para marcar la sonda con SpectrumOrange-dUTP (Vysis) (para más información véase Material y Métodos).

Las sondas generadas a partir de los cromosomas microdisseccionados se utilizaron para realizar experimentos de *chromosome painting* siguiendo el protocolo descrito por Marchal et al. (2004, véase Material y Métodos).

Resultados

La amplificación del DNA de los cromosomas microdisseccionados, tanto por DOP-PCR como por el método GenomePlex® de Sigma, generan fragmentos de entre 100-1000 pb, aunque se aprecia una mayor cantidad de fragmentos en torno a los 300-500 pb. (Fig. 3.2). La diferencia entre ambos métodos de

amplificación queda puesta de manifiesto por la amplificación sin sesgo de fragmentos generados por el método de Genomeplex[®] en comparación con la DOP-PCR donde pueden observarse nítidas bandas de tamaños diferentes, supuestamente debidas a la amplificación preferente de secuencias repetidas.

La sonda de B₂₄, obtenida a partir de la segunda DOP-PCR, hibridó con casi todo el cromosoma B, a excepción del brazo corto, y también con las regiones heterocromáticas situadas en las regiones pericentroméricas y/o paracentroméricas de los cromosomas A, con excepción de los cromosomas M₆ y M₈ (Fig. 3.3a, b), tal vez porque estos cromosomas no contienen satDNA y contienen sólo pequeñas cantidades de rDNA, que son las secuencias repetitivas más abundantes en los cromosomas B (Cabrero et al. 2003a).

Por otra parte, la sonda generada tras la amplificación del DNA de B₂₄ con el método de GenomePlex[®], hibridó con todo el cromosoma B y con las regiones heterocromáticas peri- y paracentroméricas de los cromosomas A (Fig. 3.3c, d). La principal diferencia observada entre ambos tipos de sonda es que la sonda obtenida mediante el método GenomePlex[®] hibridó además con el brazo corto del cromosoma B₂₄ así como con las regiones pericentroméricas de la mayoría de los cromosomas A (véase también Fig. 3.3a-c), sugiriendo que este método amplificó una gama mayor de secuencias del B, incluyendo secuencias centroméricas y del brazo corto.

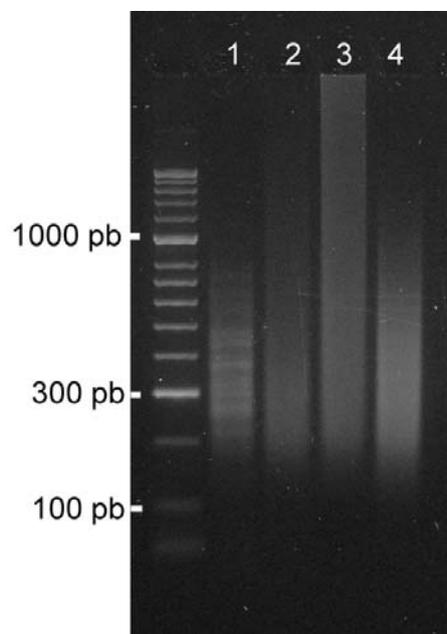


Figura 3.2. Gel de agarosa al 1,5% donde pueden observarse los fragmentos obtenidos después de la amplificación mediante DOP-PCR (calle 1) o GenomePlex[®] (calles 2, 3 y 4). Las calles 1 y 2 corresponden al cromosoma B₂₄ microdisecionado, y las calles 3 y 4 al cromosoma X.

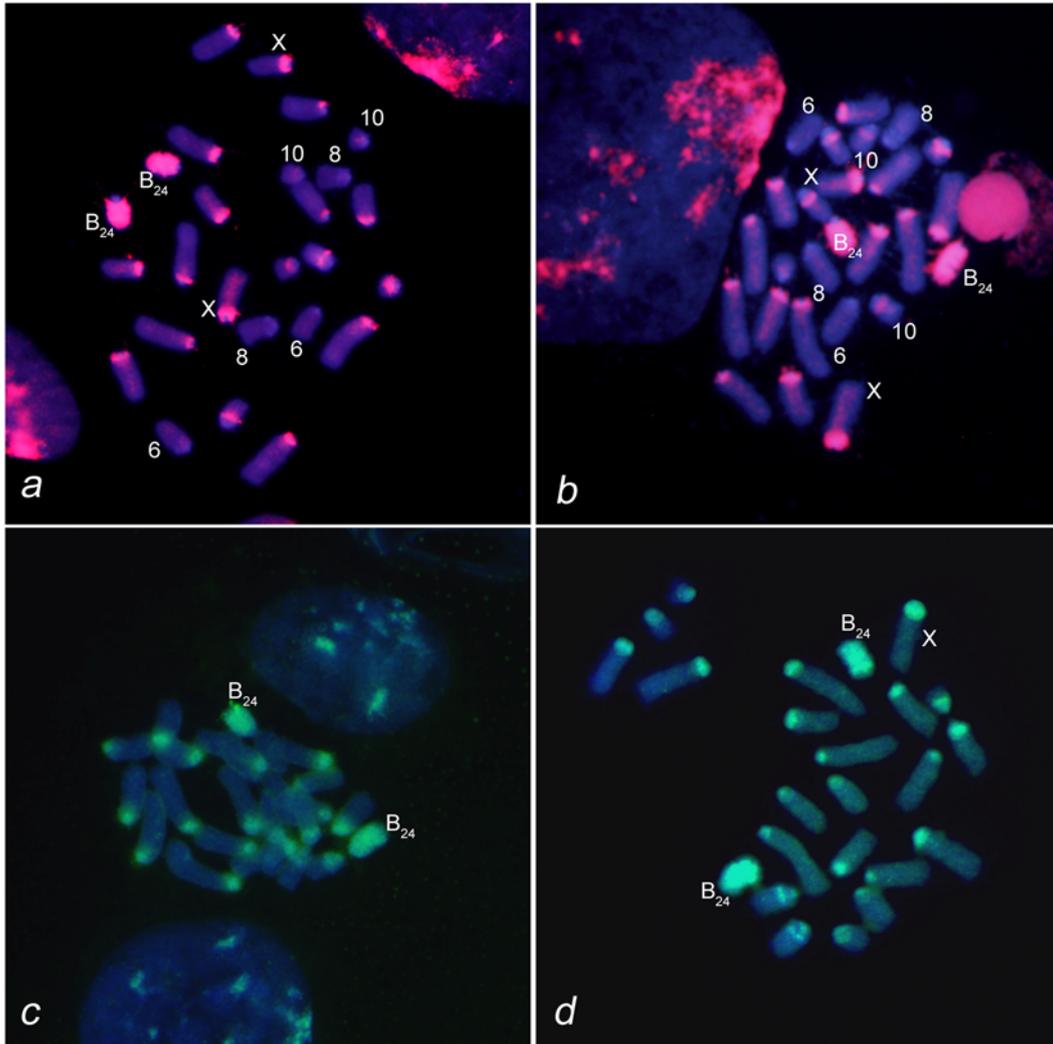


Figura 3.3. *Chromosome painting* realizado con la sonda obtenida de la microdissección de los cromosomas B₂₄ sobre cromosomas en mitosis de embriones portadores de cromosomas B₂₄. La figuras *a* y *b* corresponden a la sonda obtenida por DOP-PCR, mientras que las figuras *c* y *d* corresponde a la sonda obtenida por amplificación con GenomePlex[®].

Cuando el *chromosome painting* se realizó con la sonda GenomePlex[®] en un individuo portador de cromosoma B₁, que posee más rDNA que el cromosoma B₂₄, este cromosoma también se marcó completamente (Fig. 3.4d-f). El mismo resultado obtuvimos al realizar *chromosome painting* sobre un individuo procedente de Turquía y portador de un cromosoma B compuesto mayoritariamente por rDNA (López-León et al. 2008) (Fig. 3.4g-i). Estos resultados indican que la sonda obtenida con el método GenomePlex[®] contiene

una buena representación de las secuencias principales del B, es decir, rDNA, satDNA, secuencias centroméricas y brazo corto.

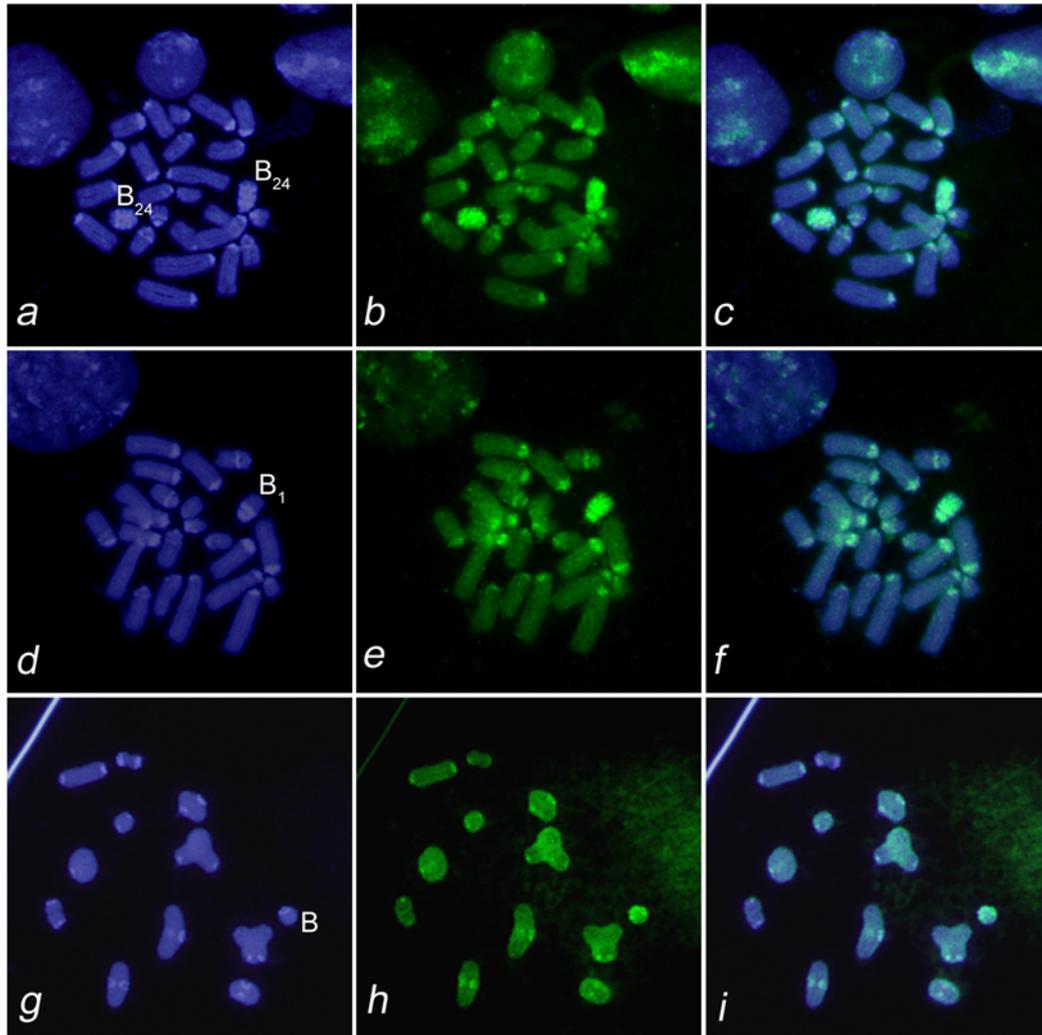


Figura 3.4. *Chromosome painting* utilizando la sonda amplificada con GenomePlex® a partir del cromosoma B₂₄ en células de individuos con diferentes tipos de cromosomas B: el cromosoma B₂₄ (a, b y c), el cromosoma B₁ (d, e y f) y el cromosoma B de las poblaciones de Turquía (g, h e i).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del *chromosome painting* del cromosoma B₂₄, en el caso del cromosoma X hemos utilizado el método GenomePlex® para amplificar el DNA de los cromosomas microdisecionados. Las sondas generadas a partir de las dos microdisecciones del cromosoma X de *E. plorans* no hibridaron completamente con el cromosoma X, sino que sólo se unieron a la región paracentromérica de este cromosoma, que es donde se localiza el satDNA y el rDNA (Fig. 3.5a, b). También se observó señal de hibridación en la región paracentromérica de algunos de los autosomas y en los bloques de satDNA del cromosoma B. Una diferencia importante observada

entre las hibridaciones realizadas a partir de las dos microdisecciones del cromosoma X fue que la sonda obtenida de la segunda microdisección hibridó, además, con el brazo corto del cromosoma B₂₄ (véase Fig. 3.5c, d).

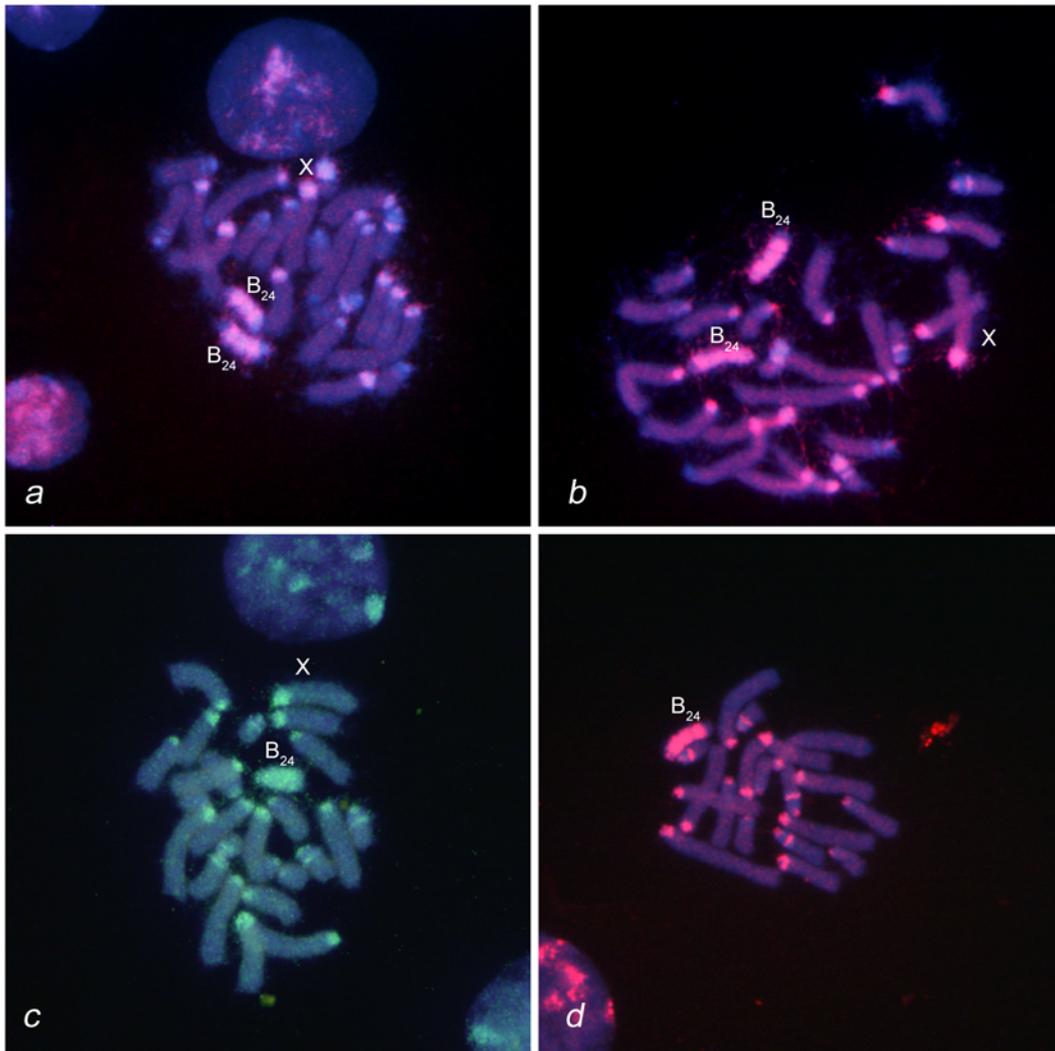


Figura 3.5. *Chromosome painting* realizado con las sondas obtenidas de las dos microdisecciones del cromosoma X, sobre cromosomas en mitosis de embriones portadores de cromosomas B₂₄. La figuras *a* y *b* corresponden a la primera microdisección del cromosoma X, mientras que las figuras *c* y *d* corresponden a la segunda microdisección. En la figuras *c* y *d* se observa cómo la sonda del cromosoma X hibrida con el brazo corto del cromosoma B₂₄.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que el método GenomePlex[®] es un buen método para amplificar el DNA de los cromosomas aislados por microdisección. Tanto el método de GenomePlex[®] como la DOP-PCR amplifican secuencias ricas en ADN repetitivo, como muestra la hibridación preferencial de las sondas

en las regiones heterocromáticas de los cromosomas. Sin embargo, con el método GenomePlex® se obtiene una mejor representación de las secuencias presentes en los cromosomas. Así, con este método hemos conseguido amplificar las principales secuencias del cromosoma B, es decir, rDNA, satDNA, secuencias centroméricas y del brazo corto, no estando estas últimas representadas en el amplificado obtenido por DOP-PCR. La amplificación con DOP-PCR dio lugar a bandas nítidas de tamaños diferentes en el gel de agarosa, supuestamente debidas a la amplificación preferencial de secuencias repetidas, lo que queda de manifiesto por los resultados obtenidos mediante *chromosome painting*. Esta misma conclusión se obtuvo al comparar estos dos mismos métodos en la amplificación del cromosoma X microdisecionado de *Locusta migratoria* (Teruel et al. 2008).

Las sondas obtenidas a partir de la amplificación con el método GenomePlex® muestran señal de hibridación difusa en las regiones eucromáticas de los cromosomas A. Esto podría significar la amplificación de secuencias dispersas de copia única o repetida en bajo número de copias. De hecho, hemos conseguido la amplificación de los genes ribosómicos 5S y los genes para las histonas en los DNA microdisecionados de los cromosomas X y B₂₄ (véase los apartados 3.4 y 3.5) que no se observan por FISH convencional en estos cromosomas. Otro tipo de secuencias que pueden contribuir a explicar estas hibridaciones difusas son los elementos móviles, que también se encuentran dispersos en la región eucromática de los cromosomas de muchas especies de saltamontes, incluyendo *E. plorans* (Montiel et al. datos no publicados).

La repetitividad del método de GenomePlex®, como cualquier método de amplificación de todo el genoma basado en la PCR, es limitada debido a la amplificación al azar y exponencial de las secuencias presentes en los cromosomas, lo que conlleva pequeñas variaciones en el *chromosome painting*, como ponen de manifiesto las dos amplificaciones independientes del cromosoma X realizadas por este método. Por ello, para obtener una mayor y mejor representación de las secuencias de los cromosomas sería conveniente la realización de varias microdisecciones y su posterior amplificación con GenomePlex®.

Los resultados obtenidos por *chromosome painting* confirman que el cromosoma X y el cromosoma B₂₄ de *Eyprepocnemis plorans* comparten secuencias de DNA entre ellos y con la mayoría de los autosomas, principalmente satDNA y rDNA, en concordancia con los resultados obtenidos mediante FISH (López-León et al. 1994, Cabrero et al. 1999, 2003). La existencia de secuencias del cromosoma X presentes en el brazo corto del cromosoma B indican la existencia de otro tipo de secuencias compartidas por ambos cromosomas, aunque no podemos descartar, por los resultados de hibridación, que estas secuencias estén también presentes en los autosomas. La existencia de secuencias compartidas entre los cromosomas A y B de esta especie apoya la hipótesis del origen intraespecífico de los cromosomas B de *E. plorans*. Aunque estos datos no refutan la hipótesis del origen a partir del X (López-León et al. 1994) también abre la posibilidad de que el B se hubiera

originado a partir de algún autosoma. Es posible que el análisis comparativo de secuencias amplificadas a partir de los cromosomas microdisecionados X y B₂₄ proporcionen más y mejor información acerca de la composición molecular y evolución de estos cromosomas, y permitan esclarecer el origen del cromosoma B en *Eyprepocnemis plorans* (véase los apartados siguiente).

Bibliografía

- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 11: 375–381.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM. 1999. Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435–439.
- Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research* 5: 194–198.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. *The evolution of the genome* (Gregory TR, ed.): 223–286
- Guan XY, Meltzer PS and Trent JM. 1994. Rapid generation of whole chromosome painting probes by chromosome microdissection. *Genomics* 22: 101–107.
- Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. 2004. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Research* 12: 143–151.
- Henriques-Gil & Arana 1990. Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* 44: 747–753.
- Henrique-Gil N, Santos JL & Arana P. 1984. Evolution of a complex polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 89: 290–293.
- Houben A, Field BL & Saunders VA. 2001. Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. *Methods in Cell Science* 23: 115–124.
- Langmore JP. 2002. Rubicon Genomics, Inc. *Pharmacogenomics* 3: 557–560.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J, Viseras E, Camacho JPM, Santos JL. 1993. Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 71: 352–362.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87–92.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Camacho JPM. 2008. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res.* 121: 260–265

- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, de la Guardia RD, Sánchez A. 2004. X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* 12: 767–776.
- McQuade L, Hill R, Francis D. 1994. B chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia, Pseudocheiridae). 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. *Cytogenetics and Cell. Genetics* 66: 155–161.
- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, Camacho JPM. 2004. Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J Evol Biol.* 17: 716–719.
- Telenius H, Carter N.P, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA and Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718–725.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosoma* (DOI 10.1007/s00412-008-0197-x).

3.2. DNA REPETITIVO DE 180 PB

Introducción

El DNA altamente repetitivo, también denominado DNA satélite (satDNA) está constituido por secuencias simples repetidas en *tándem* hasta millones de veces en los genomas de los organismos eucariotas (Charlesworth et al. 1994). Se suele localizar en las proximidades de la región centromérica y constituye un componente principal de la heterocromatina constitutiva (Charlesworth et al. 1994). El estudio del satDNA de numerosas especies de plantas y animales ha permitido conocer una serie de características comunes a todos ellos relacionadas con su secuencia y evolución.

Las unidades monoméricas del DNA satélite se caracterizan por presentar una longitud de secuencia muy parecida, en torno a 150–180 pb o 300–360 pb, correspondientes a una o dos vueltas al nucleosoma (Dover 2002, Plhol et al. 2008), y un alto contenido en adenina y timina (A+T). El contenido de A+T superior al 50% es debido principalmente a la repetición de tres o más As o Ts, cuya periodicidad a lo largo de la secuencia se ha demostrado que es importante para la curvatura de este DNA en la compactación de la heterocromatina (Lobov et al. 2001). También se ha observado la presencia de repeticiones internas, directas o invertidas, de secuencias palindrómicas, secuencias similares a elementos transponibles y de regiones conservadas de unión a la proteína CENP-B o similares (véase la revisión de Palomeque & Lorite 2008). En el DNA satélite alpha de *Homo sapiens* se ha descrito, por ejemplo, la presencia de una región conservada de 17 nucleótidos que reconoce la proteína CENP-B, la cual está implicada en la formación del cinetocoro durante la segregación de los cromosomas (Masumoto et al. 1989). Para otras especies de animales esta caja CENP-B se ha descrito de manera indirecta a partir de la conservación de esas secuencias, aunque no existen datos empíricos que lo confirmen (López & Edström 1989, Lorite et al. 2002, 2004). Es posible, además, que el DNA satélite se una a otras proteínas implicadas en la segregación de los cromosomas como son, por ejemplo, la proteína CENP-C u otras proteínas centroméricas (Henikoff & Dalal 2005, Plohl et al. 2008, Palomeque & Lorite 2008).

En los últimos años, se ha conocido que el DNA satélite se transcribe en multitud de especies tanto de plantas como de animales (para una revisión más profunda véase Ugarković 2005, Palomeque & Lorite, 2008). En la mayoría de los casos no está claro cuál es la función de estos transcritos, pero su transcripción diferencial entre estadios y tejidos indica que puede desempeñar un papel regulador.

Las características de secuencia y estructura del DNA satélite favorecen la evolución concertada de estas secuencias (Dover 1986). Los mecanismos de recombinación desigual y conversión génica entre secuencias homólogas facilitan su homogenización. Estos mecanismos de homogenización suelen ser más eficientes a nivel intracromosómico, conduciendo a secuencias de DNA

satélite específicas de cromosoma (Bonaccorsi & Lohe 1991, Bizzaro et al. 1996). La fijación de las secuencias de DNA satélite en los genomas está influida por la segregación aleatoria de los cromosomas durante la meiosis y la posterior unión de los gametos (reproducción sexual) así como a factores poblacionales como el tamaño efectivo de la población (Plohl et al. 2008). Así, por ejemplo, en las especies partenogenéticas no se ha observado la fijación de ninguna secuencia de DNA satélite (Plohl et al. 2008). En los insectos sociales haplodiploides, se ha observado la ausencia de homogenización y fijación de las secuencias de DNA satélite debido principalmente a su sistema de reproducción y al bajo tamaño efectivo de la población (véase Palomeque & Lorite 2008, Lorite et al. 2004, Luchetti et al. 2006).

Las secuencias de DNA satélite pueden ser específicas de especie, siendo la divergencia observada al nivel poblacional debida a factores genéticos y demográficos que pueden producir la fijación de algunas variantes en poblaciones de pequeño tamaño (Pons et al. 2002). La divergencia observada en una familia de DNA satélite se ha demostrado que puede incluso conducir a procesos de especiación (Henikoff et al. 2001, Malik & Henikoff 2001). Otras familias de DNA satélite son específicas de género y se encuentran relativamente conservadas entre las especies. Además, dentro de un genoma pueden coexistir más de una familia de DNA satélite (Ugarković & Plohl 2002). En estos casos pueden existir algunas diferencias en la secuencia de nucleótidos, en el número de copias y/o en la composición de la familia de DNA satélite (Ugarković & Plohl 2002). En este sentido, se han propuesto varios modelos para explicar la dinámica y mantenimiento de estas familias de DNA satélite (véase Ugarković & Plohl 2002, Plohl et al. 2008, Palomeque & Lorite 2008).

Uno de los principales componentes de los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans* es el DNA de 180 pb repetido en *tándem* (satDNA). Por ejemplo, el cromosoma B₂₄ se caracteriza por presentar tres bloques de satDNA que ocupan la mayor parte de su longitud (López-León et al. 1994, Cabrero et al. 1999). En los cromosomas A, el satDNA se localiza exclusivamente en regiones próximas al centrómero, con excepción de los cromosomas M₆, M₈ y S₁₀ donde no está presente, aunque existe variación entre poblaciones para la presencia de satDNA en estos cromosomas (Cabrero et al. 2003a). Se trata de un satDNA específico de *E. plorans*, ya que no se ha observado en otra especie del mismo género (*E. unicolor*) ni en otras especies de la subfamilia Eyprepocnemidinae (Cabrero et al. 2003b). Este satDNA fue aislado, clonado y secuenciado por primera vez por López-León et al. (1995), mediante la digestión del DNA genómico con la enzima de restricción *DraI*. Su análisis reveló una alta homogeneidad entre las diferentes unidades de repetición.

Puesto que el satDNA de 180 pb es uno de los componentes principales del cromosoma B₂₄ y además también se encuentra en la región centromérica del cromosoma X y de la mayoría de los autosomas, el objetivo de este trabajo ha sido comparar esta secuencia aislada a partir del DNA genómico de *E. plorans* con las aisladas a partir de los cromosomas X y B₂₄ microdisccionados,

analizar los posibles mecanismos de evolución a los que están sujetos dichas secuencias en el genoma de este saltamontes, e inferir posibles explicaciones sobre el origen de los cromosomas B en esta especie.

Material y Métodos

El satDNA de 180 pb se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico (gDNA) de *E. plorans* obtenido de machos adultos con y sin cromosoma B, y de DNA de los cromosomas X y B₂₄ (μDNA) obtenido por microdissección y amplificación con el Kit GenomePlex[®] Single Cell de Sigma. Para la amplificación del satDNA diseñamos los cebadores divergentes 180repldiv1R (5' GCA CTG CTT TCC AGA TAT CAC ACT AAA ATG 3') y 180repldiv1L (5' CGC ATT TCT GCC GCC TGT GGC GCT ACA TT 3'), a partir de la secuencia de DNA satélite de 180 pb (X75637) obtenida por López-León et al. (1995). Estos cebadores amplifican una región de 146 pb (Fig. 3.6). La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 μl de volumen final y con las siguientes concentraciones finales: 100 ng de gDNA (o de μDNA), 1x PCR buffer sin Mg²⁺, 2 mM Cl₂Mg, 200 μM de dNTPs, 0,4 pmol/μl de cada uno de los cebadores y 1U de MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002). Las condiciones para la amplificación han sido: una desnaturalización del DNA a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final de 72 °C durante 7 minutos. El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1,5%.

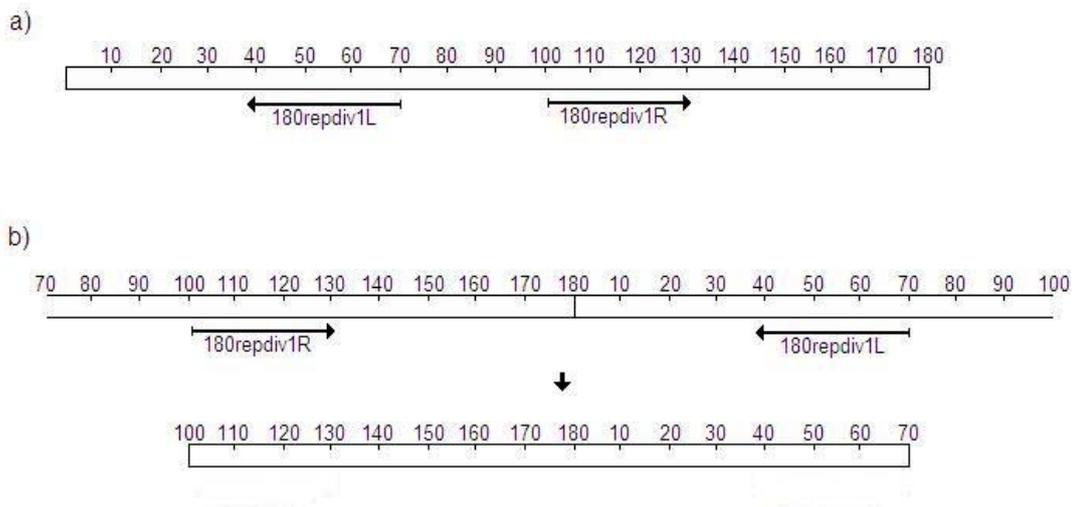


Figura 3.6. a) Esquema donde se muestra la región donde anclan los cebadores divergentes diseñados a partir de la secuencia de DNA satélite de 180 pb (X75637) obtenida por López-León et al. (1995). b) Esquema de la unidad monomérica de 146 pb utilizada para este estudio.

Los productos de la amplificación (monómeros parciales de satDNA de las diferentes procedencias: gDNA 0B, gDNA 1B, μ DNA X y μ DNA B) fueron recortados del gel de agarosa, purificados y ligados dentro del vector TOPO TA *cloning* (Invitrogen), el cual se clonó dentro de las células competentes One Shot[®] TOP10 Competent Cells (Invitrogen). Seleccionamos 10 colonias de cada uno de los cuatro tipos amplificados, para su secuenciación. La obtención del DNA plasmídico se realizó con el kit de Purificación Estándar de Plásmidos (Dominion MBL).

Los diferentes clones se secuenciaron en las dos direcciones usando un equipo 3100-Avant Genetic Analyzer de electroforesis capilar (4 capilares), de Applied Biosystems del Departamento de Genética de la Universidad de Granada (véase Material y Métodos).

Para el manejo de las secuencias se ha utilizado el programa BioEdit v.7.9.0 (Hall 1999). El alineamiento de las secuencias se ha realizado con ClustalW (Thompson et al. 1994) desde BioEdit.

Los parámetros básicos de composición nucleotídica y tamaño medio de las secuencias, así como el cálculo de las distancias genéticas y filogenia, se han realizado con el programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Debido al bajo nivel de sustitución observado en el alineamiento de las secuencias, hemos elegido el modelo evolutivo más simple, el de Jukes-Cantor (1969) considerando los *gaps*, mediante la opción *pairwise deletion* y una distribución homogénea de las tasas de cambio. El árbol filogenético se ha inferido utilizando el modelo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) obteniendo el nivel de robustez mediante un *bootstrapping* de 1000 replicas.

La diversidad nucleotídica (π) por sitio, para analizar la distribución de las sustituciones, se ha calculado con el programa DnaSP v. 4.20.2 (Rozas et al. 2003).

Para analizar el proceso de evolución concertada, hemos utilizado el programa satDNA Analyzer desarrollado por Navajas-Pérez et al. (2007). Este programa implementa el modelo de Strachan et al. (1985) para estudiar la evolución concertada dentro de una misma familia de DNA satélite entre dos especies. El modelo se basa en analizar la variación nucleotídica en cada una de las posiciones cuando se comparan dos especies y considerando de manera independiente cada una de las repeticiones obtenidas para cada familia de DNA satélite. Se necesita trabajar con más de 5 repeticiones de una misma familia de DNA satélite por especie. Este modelo distribuye las diferentes variaciones no compartidas dentro de 6 clases diferentes. Clase 1, engloba los sitios completamente homogéneos para todas las unidades de repetición muestreadas de un par de especies; la clase 2, muestra sitios de bajo nivel polimórfico ($\leq 25\%$); la clase 3, muestra sitios donde se observan tasas intermedias de variación (25-50%); la clase 4, muestra posiciones altamente polimórficas (50-100%); la clase 5 incluye aquellos sitios donde una nueva variante se ha homogenizado y fijado en todos los miembros de una misma familia de DNA satélite de una especie, mientras que la otra especie presenta el nucleótido

original, y por último, la clase 6, muestra un nuevo cambio en la posición fijada en algún miembro de algunas de las dos familias de DNA satélite, por tanto representa un paso más con respecto al estado 5, ya que significaría la aparición de una nueva variante en alguna de las especies objeto de estudio. Por tanto, las clases 2 y 3 son posiciones polimórficas no compartidas distribuidos más o menos al azar; mientras que las clases 4 y 5 corresponden a polimorfismos no compartidos entre ambas familias pero que mostrarían un proceso de divergencias entre ellas.

Los datos de diversidad nucleotídica (π) intra- e inter-grupos, además de una secuencia promedio para cada grupo considerado, se han calculado con el programa satDNA Analyzer. Los análisis se han realizado incluyendo todos los sitios polimórficos y considerando los *gaps* (*pairwise option*).

El satDNA monomérico amplificado a partir de μ DNAX y μ DNAB se marcó, por el método de *nick translation*, con rhodamine-11-dUTP para realizar experimentos de FISH y comprobar su localización en los cromosomas del complemento de *E. plorans* y de *E. unicolor*, este último material cedido por A.G. Bugrov del *Institute for Systematics and Ecology Animals Siberan Branch of Russian Academy, Novosibirsk* (Rusia). La FISH se llevó a cabo en preparaciones de embriones y folículos testiculares, en el caso de *E. plorans*, y en preparaciones de folículos testiculares de *E. unicolor*, según el protocolo descrito por Cabrero et al. (2003c) (véase Material y Métodos).

Resultados

El resultado de la PCR mostró, en todos los casos, un patrón en escalera típico de las secuencias de DNA repetitivo en tándem (Fig. 3.7). Al haber utilizado cebadores divergentes para la amplificación, la unidad monomérica presenta un tamaño de aproximadamente 146 pb (Fig. 3.6b), algo menor de 180 pb que es el tamaño de la unidad de repetición (López-León et al. 1995).

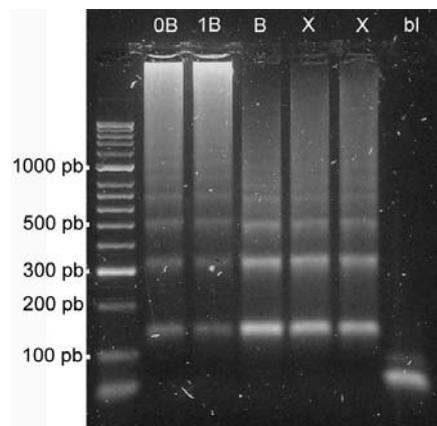


Figura 3.7. Amplificación del DNA satélite en los cromosomas X y B₂₄ microdisecionados. La banda monomérica es de 146pb. Como controles positivos se han utilizado el DNA genómico de individuos de *E. plorans* con y sin cromosoma B₂₄.

Las bandas monoméricas de 146 pb obtenidas de las diferentes muestras fueron clonadas, y 10 de los clones obtenidos, de cada una de las muestras, fueron secuenciados en las dos direcciones. Para el análisis de las secuencias, las agrupamos en tres grupos: el grupo 1, que incluye las secuencias procedentes de DNA genómico (con y sin cromosoma B), el grupo 2, que incluye las secuencias obtenidas del cromosoma X, y el grupo 3 donde se incluyen las secuencias obtenidas del cromosoma B₂₄. El alineamiento de todas las secuencias presentó una longitud de 147 pb, aunque el tamaño medio de las secuencias por grupo es de 146 pb (Tabla 3.1).

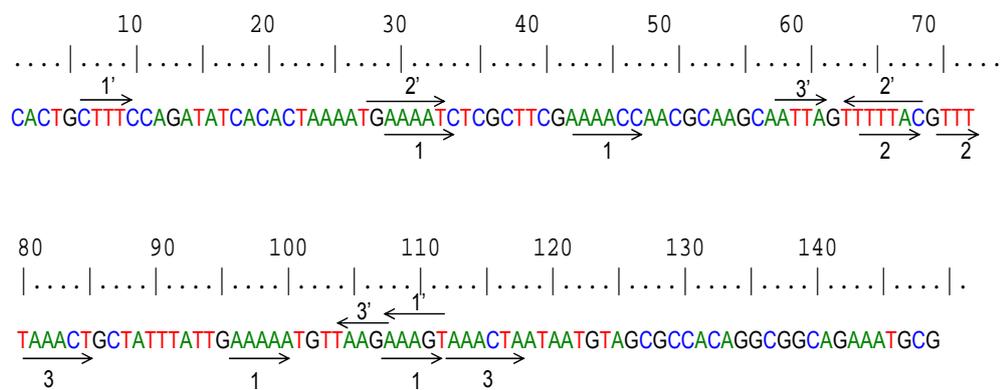
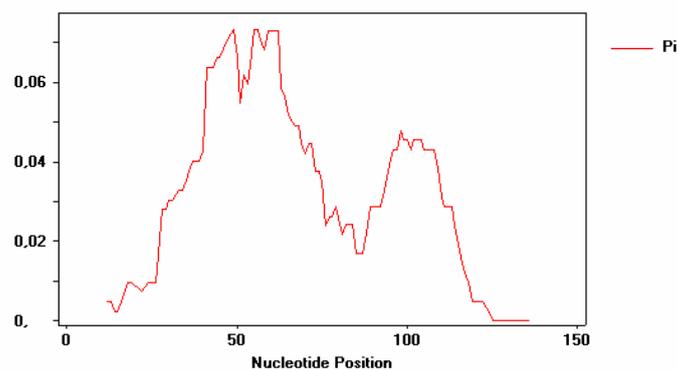
Las secuencias tienen un contenido en A+T superior al 60%, debido a repeticiones de A o T de más de tres nucleótidos (Alineamiento 1 en el Anexo). No se observan diferencias significativas en el contenido de nucleótidos entre los diferentes grupos de secuencias (véase Tabla 3.1). También se observan pequeñas repeticiones de varios nucleótidos dispuestos en la misma dirección o direcciones opuestas, que son típicas del DNA satélite (Fig. 3.8). Estas repeticiones parecen formar estructuras cruciformes sugiriendo que pueden estar implicadas en la interacción DNA-proteína (Bigot et al. 1990). Sin embargo, Rojas-Rousse et al. (1993), sugieren, por el contrario, que estas estructuras son importantes en la condensación de la heterocromatina en insectos.

La mayoría de las diferencias observadas entre las diferentes secuencias se deben a sustituciones más que a inserciones o deleciones, aunque se puede apreciar la deleción de algunos nucleótidos en algunas de las secuencias. La mayoría de los sitios están conservados y sólo aparecen 49 sitios variables, de los cuales solo 17 son sitios informativos, mientras que las otras 32 variaciones corresponden a sustituciones presentes en una única secuencia, algunas de las cuales pueden deberse a errores de la Taq polimerasa. Sin embargo, la distribución de estas sustituciones no es al azar, sino que se localizan principalmente en dos regiones de la secuencia (Fig. 3.9), situadas entre las posiciones 30 y 110, aunque la máxima variación se observa entre las posiciones 50 y 80. Las sustituciones observadas entre las posiciones 100 y 110 corresponden principalmente a sustituciones localizadas en las secuencias pertenecientes al cromosoma X (véase Alineamiento 1). El patrón de sustitución no aleatorio se ha descrito para otras familias de DNA satélite (Pons et al. 2002, Maravinac et al. 2004) y se ha sugerido que puede poner de manifiesto sitios potenciales para la recombinación entre monómeros (Hall et al. 2005).

Tabla 3.1. Características generales de las secuencias del DNA satélite analizado.

Grupo	Longitud		
	media (pb)*	%AT	π (JC)
DNA genómico (gDNA)	146,53	64,22	0,03078
Cromosoma X (μ DNA X)	146,10	63,58	0,03432
Cromosoma B ₂₄ (μ DNA B ₂₄)	146,40	63,78	0,03271

* El alineamiento de todas las secuencias tiene una longitud 147 pb
 π (JC), diversidad nucleotídica con la corrección de Jukes–Cantor

**Figura 3.8.** Secuencia consenso de DNA satélite obtenida con el programa satDNA Analyzer. En ella están señaladas las diferentes repeticiones directas e invertidas localizadas.**Figura 3.9.** Distribución de las sustituciones del DNA satélite. La distribución de estas sustituciones no es al azar, sino que se localizan principalmente en dos regiones de la secuencia, alcanzándose las máximas variaciones en las posiciones 50 y 110.

Las sustituciones observadas en las secuencias de satDNA no son compartidas por los 3 grupos. De hecho, sólo dos variaciones polimórficas, localizadas en las posiciones 52 y 57 son compartidas por los tres grupos de secuencias. Sin embargo, la mayoría de los polimorfismos no compartidos están en baja frecuencia y distribuidos aparentemente al azar, es decir, se incluyen dentro de la clase 2 según el modelo de Strachan et al. (1985). No hay ningún polimorfismo que sea compartido por la mayoría de las secuencias pertenecientes a un mismo grupo y, por tanto, muestre un proceso de divergencia, es decir, no hay ningún polimorfismo no compartido que se incluya en las clases 4 y 5 (véase Tabla 3.2). Estos datos ponen de manifiesto la alta homogenización de la secuencia de satDNA en el genoma de *E. plorans*, no observándose grupos de secuencias que puedan asignarse a cromosomas concretos. Es posible que en la evolución de estas secuencias esté implicado algún mecanismo de homogenización que sea efectivo a nivel de todo el genoma.

Los datos de diversidad nucleotídica obtenidos son indicativos de la gran homogeneidad de estas secuencias, ya que los tres grupos presentan valores similares de diversidad nucleotídica (Tabla 3.1). También se observa en la Tabla 3.2 que los datos de divergencia obtenida al comparar los tres grupos son muy similares entre sí.

De igual manera, el dendrograma obtenido por el modelo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) evidencia la homogenización de las secuencias de DNA repetitivo dentro del genoma de *E. plorans* (Fig. 3.10), no observándose ningún clado específico para el cromosoma X ni para el cromosoma B₂₄.

Tabla 3.2. Distribución de la variación nucleotídica en las distintas clases definidas por Strachan et al. (1985).

Comparación entre grupos	Polimorfismos no compartidos				N	K	(Dxy(JC))
	Clase 1	Clase 2-3	Clase 4-5	Clase 6			
gDNA/ μ DNA X	99	28	0	0	146	4,553	0,03228
gDNA/ μ DNA B ₂₄	100	30	0	0	146	4,511	0,03190
μ DNA X / μ DNA B ₂₄	106	22	0	0	146	4,670	0,03313

N, longitud promedio de las secuencias de DNA satélite

K, número promedio de diferencias nucleotídicas

(Dxy(JC)), diversidad nucleotídica con la corrección de Jukes-Cantor

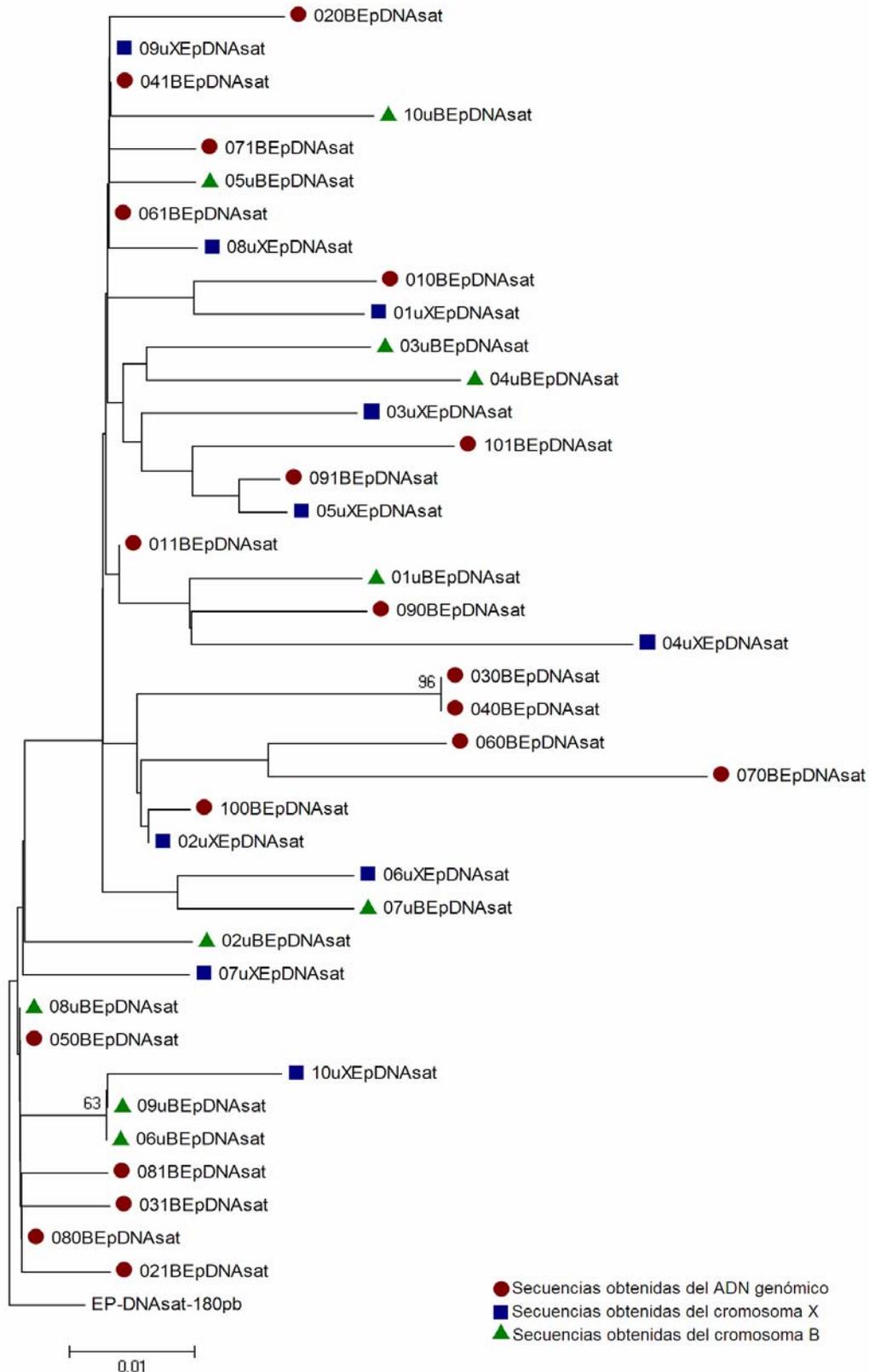


Figura 3.10. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor-Joining, donde puede inferirse la homogenización de las secuencias de satDNA (obsérvese la alta politomía existente y como las secuencias de un mismo grupo aparecen en varios *clusters* diferentes). Los valores corresponden a valores de bootstrapping. La secuencia EP-DNA sat-180pb, corresponde a la secuencia X75637 obtenida por López-León et al. (1995).

Por otro lado, los experimentos de FISH realizados muestran que el satDNA suele agruparse en ciertas regiones celulares (posiblemente como una consecuencia de la orientación Rabl de los centrómeros) durante las primeras etapas de la profase meiótica (Fig. 3.11), mientras que en las interfases somáticas (Fig. 3.12d) se dispone separadamente en pequeños grupos. Esta disposición del DNA satélite durante las primeras etapas de la meiosis, en las que se produce la recombinación, podría facilitar la homogenización de las secuencias del satDNA.

Las sondas de satDNA construidas a partir de los cromosomas B₂₄ y X hibridaron con la región pericentromérica y/o paracentromérica de la mayoría de los cromosomas del complemento de *E. plorans*, a excepción de los cromosomas M₆, M₈ y S₁₀ donde no se observó señal para ninguna de las dos sondas (Fig. 3.11e y Fig. 3.12c). No obstante, en algunos de los embriones analizados, hemos observado la presencia de satDNA en uno de los dos cromosomas M₆ (Fig. 3.12a, b), sugiriendo que el satDNA podría estar colonizando este cromosoma en esta población, presumiblemente facilitado por la cercanía de las regiones centroméricas de los cromosomas no homólogos durante la orientación Rabl de la primera profase meiótica (Rabl 1885, Fussell 1984).

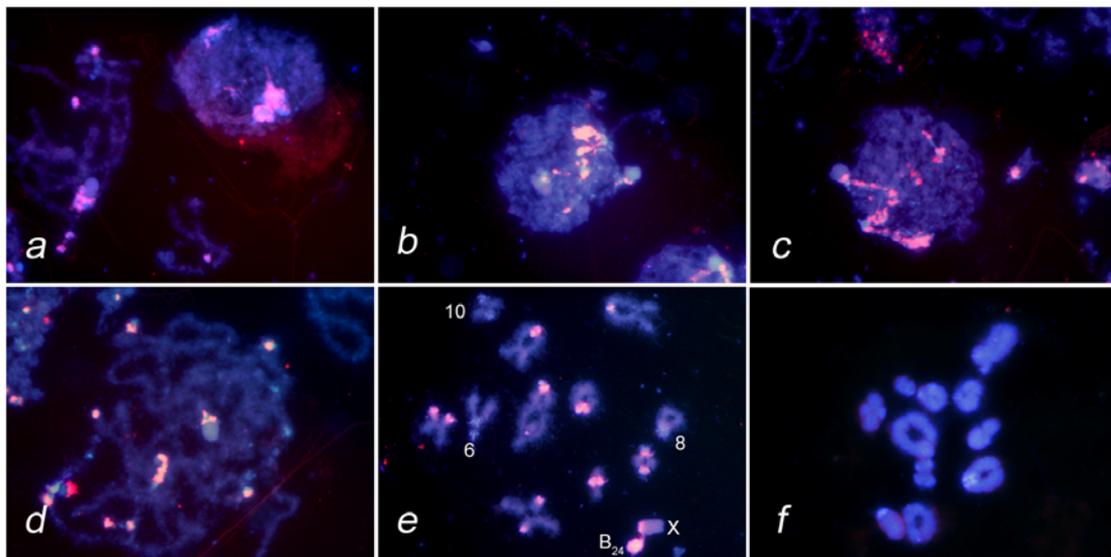


Figura 3.11. Hibridación *in situ* fluorescente donde puede observarse la disposición del DNA satélite (marcado en rojo) durante las primeras etapas de la meiosis masculina. En leptotene, el satDNA se agrupa en una misma zona (figuras *a*, *b* y *c*), y a medida que avanza la profase I se va separando (figura *d*). La figura *e* muestra una célula en diplotene, donde se observa la presencia de satDNA en todos los cromosomas menos M₆, M₈ y S₁₀. En *E. unicolor*, sin embargo, no se observa la presencia de este satDNA (figura *f*).

La sonda de DNA satélite no hibridó con los cromosomas del genoma de *E. unicolor* (Fig. 3.11f), tal como ya habían constatado Cabrero et al. (2003c). La ausencia de hibridación de esta sonda en otras especies de la subfamilia Eyprepocnemidinae Cabrero et al. (2003c) indica que este satDNA es específico de *E. plorans* (Cabrero et al. 2003c).

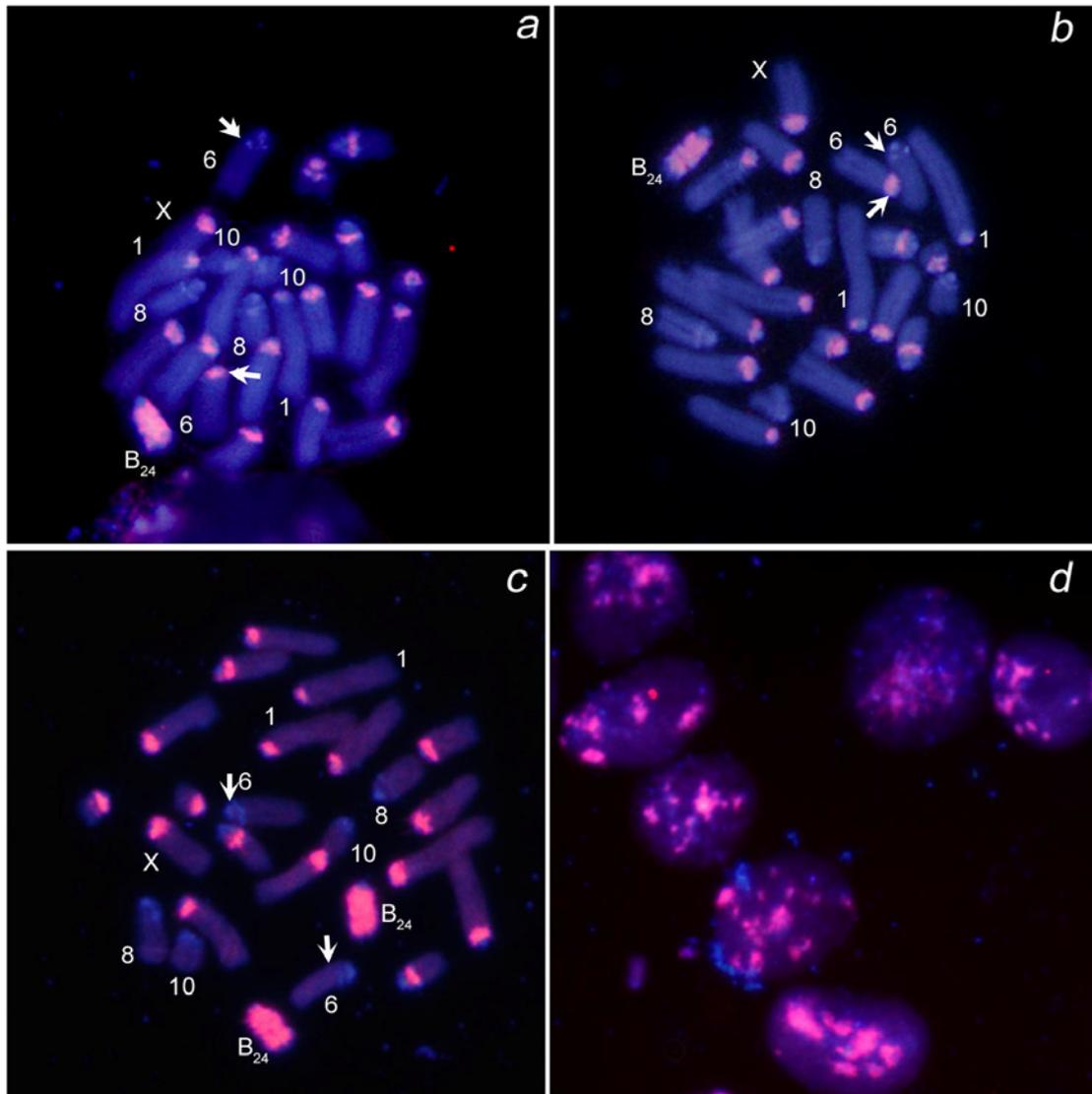


Figura 3.12. Hibridación *in situ* fluorescente realizada en embriones portadores de cromosoma B₂₄ utilizado como sonda el satDNA (en rojo) obtenido del cromosomas B₂₄ (figura a) y del cromosoma X (figura b). En ambas imágenes se observa el polimorfismo existente en el cromosoma M₆ para la presencia/ausencia de satDNA (ausencia en c y heterocigosis en a y b). Obsérvese en c la ausencia de satDNA en los cromosomas M₆, M₈ y S₁₀. En interfase (figura d) el satDNA se dispone en varios grupos separados.

Discusión

El análisis de la secuencia del satDNA de *E. plorans* muestra que este DNA satélite presenta las características comunes descritas para este tipo de secuencias repetidas: tiene una longitud de 180 pb, un alto contenido de A+T debido a la existencia periódica de repeticiones de 3 ó más A o T y la existencia de repeticiones internas directas o indirectas.

López-León et al. (1995) clonaron y secuenciaron por primera vez el satDNA de 180 pb, observando la misma secuencia en los cinco clones secuenciados. Nosotros hemos analizado la secuencia de un total de 40 clones y hemos observado alguna variación. La mayoría de las sustituciones observadas estaban presentes en una única secuencia, no siendo, por tanto informativas. No es posible descartar que algunas de estas sustituciones pudiera deberse a errores cometidos por la Taq polimerasa. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de las sustituciones observadas se concentran en una región muy concreta de la secuencia del DNA satélite (alrededor de los nucleótidos 30 y 150 de la unidad de alineamiento) sugiere que la mayoría podrían ser sustituciones reales. Además, la gran mayoría de las sustituciones en la segunda de estas regiones se observaron en las secuencias de satDNA procedentes del cromosoma X, sugiriendo que el satDNA del cromosoma X está empezando a divergir del satDNA de los otros cromosomas del genoma. Este patrón de sustitución no al azar se ha descrito para otras familias de DNA satélite (Pons et al. 2002, Maravinac et al. 2004), y los sitios variables han sido propuestos como sitios potenciales para la recombinación entre monómeros (Hall et al. 2005). Además, algunos autores proponen la existencia de fuerzas selectivas actuando sobre las secuencias de DNA satélite (véase Ugarković 2005), para la preservación de determinados motivos estructurales, como por ejemplo, la secuencia diana de la proteína CENP-B presente en el DNA satélite alpha (Masumoto et al. 1989).

A pesar de las sustituciones encontradas, la secuencia de DNA satélite es muy homogénea dentro del genoma de *E. plorans*, como muestran los datos de diversidad nucleotídica y divergencia, que son muy bajos, indicando que los mecanismos de homogenización de secuencias están siendo eficientes en este saltamontes. Aunque se sabe que los mecanismos de homogenización son más eficaces sobre secuencias localizadas dentro del mismo cromosoma (Dover 1986), en *E. plorans* no hemos observado un grado mayor de homogenización entre variantes intracromosómicas (tanto para el X como para B₂₄) que entre las intercromosómicas. La orientación Rabl durante la primera profase meiótica, y su relación con la recombinación meiótica (Rabl 1885, Fussell 1984) podría facilitar la homogenización de secuencias para el satDNA en *E. plorans*. La elevada homología del satDNA en todos los cromosomas, incluido el B₂₄, no lo hacen un buen marcador para dilucidar el origen de este cromosoma.

La elevada conservación de la secuencia del satDNA de *E. plorans* podría deberse a un posible papel funcional de este DNA repetitivo. Su localización peri- y/o paracentromérica en casi todos los cromosomas sugiere que podría tener alguna relación con la función centromérica (Cabrero et al. 1999). No obstante, su ausencia de algunos cromosomas, por ejemplo M₆, M₈ y S₁₀, indica

que o bien el satDNA de 180 pb no está asociado a la función centromérica, o bien hay otros satDNAs en *E. plorans* que harían esa función en los cromosomas que carecen del satDNA de 180 pb.

Por otro lado, los remplazamientos observados en determinadas poblaciones del sur de España de variantes de cromosoma B cada vez con más cantidad de satDNA (véase introducción del capítulo 2; Camacho et al. 2000), y la alta frecuencia de transmisión del cromosoma B₂₄ en la población de Torrox (Zurita et al. 1998), que es la variante que presenta mayor cantidad de satDNA (Cabrero et al. 1999), indican que éste podría estar implicado en la transmisión y acumulación de los cromosomas B (Cabrero et al. 1999), aunque, por el momento, se desconoce el mecanismo por el cual el satDNA podría estar implicado en esa función.

La localización cromosómica del satDNA de 180 pb muestra variación poblacional (Cabrero et al. 2003a, b, Abdelaziz et al. 2007, López-León et al. 2008). Por ejemplo, en la población de Torrox, el satDNA se sitúa en la región peri- y/o paracentromérica de la mayoría de los cromosomas del complemento, a excepción de los cromosomas M₆, M₈ y S₁₀; mientras que en otras poblaciones españolas la distribución del satDNA es ligeramente diferente, existiendo variación para su presencia/ausencia en los cromosomas M₄-M₈ y S₉ (véase la Tabla 1 de Cabrero et al. 2003a). El cromosoma S₁₀ no era portador del satDNA de 180 pb en ninguna de las 12 poblaciones españolas analizadas por Cabrero et al. (2003a), por lo que es poco probable que éste sea el cromosoma ancestral que originó el cromosoma B, compuesto mayoritariamente por satDNA.

Las localizaciones cromosómicas presentes en todas las poblaciones españolas podrían considerarse las ancestrales, en cuyo caso serían las de los cromosomas L₁, L₂, X, M₃ y S₁₁ (Cabrero et al. 2003a). Algunas de las variaciones observadas seguían un patrón geográfico. Por ejemplo, el cromosoma S₉ posee satDNA en las poblaciones del sur de la Península Ibérica y del Norte de Marruecos, pero no en poblaciones de la cuenca del río Segura (Cabrero et al. 2003a) ni del Cáucaso (Cabrero et al. 2003b). La presencia de satDNA en el cromosoma S₉ de poblaciones del Mediterráneo central, como Grecia (Abdelaziz et al. 2007) y Turquía (López-León et al. 2008) indica que el satDNA puede expandirse entre los cromosomas A del genoma, y que los patrones resultantes tienen cierta relación con la geografía, sugiriendo que la migración y/o deriva contribuyen a incrementar la distribución geográfica de las nuevas localizaciones cromosómicas del satDNA. El polimorfismo para la presencia/ausencia del satDNA en el cromosoma M₆, que no había sido observado por Cabrero et al. (2003a), sugiere una posible vía para la movilidad y expansión de estas secuencias dentro del genoma de *E. plorans*.

En una población de Grecia (Abdelaziz et al. 2007) y en otra de sudáfrica (perteneciente a la subespecie *E. plorans meridionalis*), el satDNA está presente en todos los cromosomas del complemento. En poblaciones de Marruecos, la distribución del satDNA es semejante a la observada en Torrox, estando presente en la región paracentromérica de la mayoría de los cromosomas, excepto en los cromosomas M₆, M₈ y S₁₀ (Cabrero et al. 2003a, b). La presencia

de satDNA en todos los cromosomas del genoma de *E. plorans* podría ser la condición ancestral en la especie, habiéndose perdido de algunos cromosomas en algunas poblaciones de la subespecie *E. plorans plorans* (véase arriba). Sin embargo, existe la posibilidad de que la presencia de este satDNA en todos los cromosomas del complemento sea el carácter derivado y no el ancestral.

El satDNA de 180 pb es específico de *E. plorans* ya que está ausente en otras especies de la familia Eyprepocnemidinae (Cabrero et al. 2003c). Como hemos mencionado anteriormente, este satDNA está presente en la región paracentromérica de todos los cromosomas de la subespecie *E. plorans meridionalis* (López-León et al. 2008). No obstante, un estudio comparado de las secuencias de satDNA en otras subespecies africanas de *E. plorans*, podría arrojar luz acerca del origen y evolución de este DNA repetitivo. Además, para esclarecer la condición ancestral de esta secuencia en *E. plorans* sería necesaria una filogeografía de esta especie, que quizás revelara las rutas de migración de este saltamontes y aclarase los posibles eventos de expansión o pérdida de esta secuencia que pudieran estar ocurriendo en las diferentes poblaciones analizadas, aportando una idea más clara sobre la dinámica y evolución del DNA satélite de *E. plorans*.

En la actualidad no tenemos datos robustos de transcripción del DNA satélite de 180 pb de *E. plorans*, aunque se han conseguido amplificados a partir de cDNA. Sin embargo, todavía no se ha confirmado sin lugar a dudas ya que se tratan de estudios preliminares en curso. En multitud de insectos se han citado casos de transcripción del DNA satélite (véase la revisión de Ugarković 2005). Es muy posible que este fenómeno sea común a todas las familias de DNA satélite (Palomeque et al. 2008) y pueda contribuir a su homogenización, por lo que en el futuro sería interesante intentar detectar la transcripción de este DNA satélite y su posible función.

Bibliografía

- Abdelaziz M, Teruel M, Chobanov D, Camacho JP, Cabrero J. 2007. Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. *Cytogenet Genome Res.* 119 (1-2):143-6.
- Bigot Y, Hamelin M, Periquet G. 1990. Heterochromatin condensation and evolution of unique satellite-DNA families in two parasitic wasp species: *Diadromus pulchellus* and *Eupelmus vuilleti* (Hymenoptera). *Mol. Biol. Evol.* 7: 351-364.
- Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi U. 1996. Chromosomal localization of a highly repeated EcoRI DNA fragment in *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae) by nick translation and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res.* 4: 392-396.
- Bonaccorsi S & Lohe A. 1991. Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* relationships between satellite sequences and fertility factors. *Genetics* 129: 177-189.

- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM. 1999 Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435–439.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 11: 375–381
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 2003b Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207–211.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM. 2003c. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90: 377–381.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW. 2000. B chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 163–178.
- Charlesworth B, Sniegowsky P, Stephan W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220.
- Dirsh VM. 1958. Revision of the genus *Eyprepocnemis* Fieber, 1853 (Orthoptera: Acridoidea). *Proc R Entomol Soc Lond* 27: 33–45.
- Dover GA. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* 2: 159–165.
- Dover G. 2002. Molecular drive. *Trends Genet* 18: 587–589.
- Fussell CP. 1984. Interphase chromosome order: A proposal. *Genetica* 62: 193–201
- Hall SE, Luo S, Hall AE, Preuss D. 2005. Differential rates of local and global homogenization in centromere satellites from *Arabidopsis* relatives. *Genetics* 170: 1913–1927.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Henikoff S & Dalal Y. 2005. Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 177–184.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS. 2001. The centromere paradox, stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098–1102.
- Jukes TH & Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21–132. In: Munro, H.N. (Ed.). *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York.
- Lobov IB, Tsutsui K, Mitchell AR, Podgornaya OI. 2001. Specificity of SAF-A and lamin B binding in vitro correlates with the satellite DNA binding state. *J Cell Biochem* 83: 218–229.
- López CC & Edström J.E. 1998. Interdispersed centromeric element with a CEP-B box-like motif in *Chironomus pallidivittatus*. *Nucleic Acids Res.* 26: 4168–4172.

- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87-92.
- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM, Camacho JPM. 1995b. Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75: 370-375.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Camacho JPM. 2008. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res.* 121: 260-265.
- Lorite P, Carrillo JA, Tinaut A, Palomeque T. 2002. Comparative study of satellite DNA in ants of the *Messor* genus. *Gene* 297: 113-122.
- Lorite P, Carrillo JA, Tinaut A, Palomeque T. 2004. Evolutionary dynamics of satellite DNA in species of the Genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Gene* 332: 159-168.
- Luchetti A, Marini M, Mantovani B. 2006. Non-concerted evolution of the RET76 satellite DNA family in *Reticulitermes* taxa (Insecta, Isoptera). *Genetica* 128: 123-132.
- Malik HS & Henikoff S. 2001. Adaptive evolution of Cid, a centromerespecific histone in *Drosophila*. *Genetics* 157: 1293-1298.
- Mravinac B, Plohl M, Ugarković Đ. 2004. Conserved patterns in the evolution of *Tribolium* satellite DNAs. *Gene* 332: 169-177.
- Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T. 1989. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J. Cell Biol.* 109: 1963-1973.
- Navajas-Pérez R, Rubio-Escudero C, Aznarte JL, Rejón MR and Garrido-Ramos M. 2007. SatDNA Analyzer: a computing tool for satellite-DNA evolutionary analysis. *Bioinformatics* 23(6): 767-768.
- Palomeque T y Lorite P. 2008. Satellite DNA in insects: a review. *Heredity* 100: 564-573.
- Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of *tandem* repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409: 72-82.
- Pons J, Petitpierre E, Juan C. 2002. Evolutionary dynamic of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Mol. Biol. Evol.* 19: 1329-1340
- Rabl C. 1885. Über Zelltheilung, *Morphologisches Jahrbuch* 10, zweites Heft, Seiten 214 - 330
- Rojas-Rousse D, Bigot Y, Periquet G. 1993. DNA insertions as a component of the evolution of unique satellite DNA families in two genera of parasitoid wasps: *Diadromus* and *Eupelmus* (Hymenoptera). *Mol Biol Evol* 10: 383-396.

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Strachan T, Webb D, Dover GA. 1985. Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J* 4: 1701-1708.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson JD., Higgins DG. and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Ugarković D. 2005. Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* 6: 1035-1039.
- Ugarković D & Plohl M. 2002. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *EMBO J* 21: 5955-5959.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274-277.

3.3. REGIONES ITS DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 45S

Introducción

Los genes ribosómicos 45S se encuentran moderadamente repetidos en *tándem* en el genoma de la mayoría de los organismos eucariotas (Long & Dawid 1980). La unidad de transcripción está flanqueada por pequeñas secuencias espaciadoras externas (ETS, External Transcribed Spacers) e incluye los genes 18S, 5,8S y 28S, que se encuentran separados entre sí por espaciadores internos (ITS, Internal Transcribed Spacers). Los espaciadores externos e internos se escinden en el proceso de maduración de los ribosomas. Cada una de las unidades de transcripción está separada de la copia adyacente por un espaciador no transcrito, los llamados IGS (Intergenic Spacers). La figura 3.13 esquematiza la estructura de los genes ribosómicos 45S eucarióticos (para más detalle de la estructura y organización de los genes ribosómicos véase Long & Dawid 1980, y el capítulo de Sylvestre et al. en el libro *The Nucleolus*, editado por Mark OJ Olson 2004).

Estos genes se encuentran muy conservados a lo largo de la evolución, ya que su transcripción da lugar a parte de los RNAs que conforman la subunidad mayor y menor de los ribosomas, que son esenciales para la síntesis de las proteínas en el citoplasma de la célula (Lafontaine & Tollervy 2001). Sin embargo, las secuencias espaciadoras de estos genes no están sometidas a intensas fuerzas selectivas por lo que acumulan más variación y son, por tanto, muy utilizadas como marcadores para la reconstrucción de filogenias (Coleman 2007). El segundo espaciador interno, el ITS-2 (véase Fig. 3.13), es más homogéneo que el primero, el ITS-1, y se ha visto que suele ser específico de especie e incluso de subespecie (Coleman 2007), por lo que es el marcador más utilizado para estas comparaciones a nivel de especie e incluso a nivel de género (para una revisión acerca del ITS-2 véase Coleman 2007).

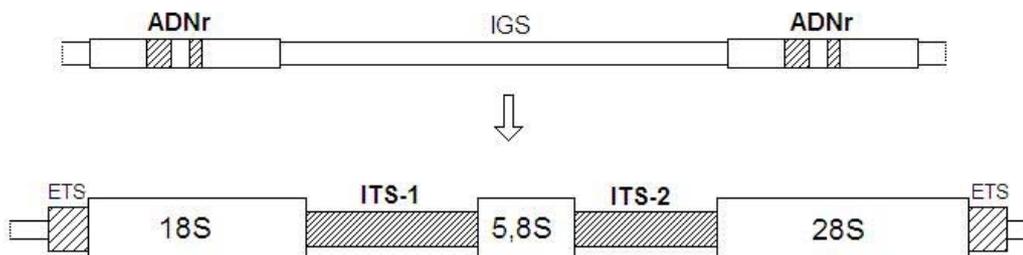


Figura 3.13. Esquema de la disposición en *tándem* de los genes ribosómicos.

La estructura secundaria de los ITS está conservada a lo largo de la evolución porque se ha demostrado que es importante para la escisión de estos

espaciadores durante el proceso de maduración de los ribosomas (Gutell 1996, Harpke & Peterson 2006, 2008). Se sabe que las mutaciones que ocurren en regiones implicadas en la formación de una hélice suelen compensarse (mutaciones compensatorias que mantienen el apareamiento en la estructura secundaria) para evitar la inestabilidad de la estructura secundaria, y mantener así su función (Goertzen et al. 2003). El ITS-1 es más variable que el ITS-2, por lo que su estructura secundaria está sometida a más variación y no siempre está conservada entre las copias funcionales (Zheng et al. 2008, Harpke & Peterson 2006a). Sin embargo, la estructura secundaria del ITS-2 está muy conservada al nivel intraespecífico, y se ha propuesto que este espaciador es el que está implicado en el mecanismo de escisión de los espaciadores en el primer transcrito (Mai & Coleman 1997, Zheng et al. 2008).

Al igual que el DNA satélite, los genes ribosómicos están sujetos a evolución concertada, que produce la homogenización de las secuencias de rDNA en cada especie. Sin embargo, últimamente están apareciendo datos que muestran que, en algunas especies, estas secuencias no siguen un patrón de evolución concertada, como en el caso de plantas de los géneros *Pyrus* (Zheng et al. 2008) y *Mammillaria* (Harpke & Peterson 2006) y del saltamontes *Podisma pedestris* (Keller et al. 2006). En estos casos se ha detectado la existencia de copias no funcionales, junto a copias potencialmente funcionales, de las secuencias de los ITS. Las copias no funcionales se identifican fácilmente por su posición filogenética, por la diferente composición nucleotídica, por presentar patrones de metilación ligeramente diferentes y por la existencia de sustituciones que disminuyen la estabilidad de la estructura secundaria de los transcritos (Buckler & Holtsford 1996, Zheng et al. 2008). La pérdida de funcionalidad de los ITS no implica pérdida de transcripción y en algunas especies se han detectado transcritos de secuencias ITS no funcionales (Keller et al. 2006).

Es importante diferenciar las copias funcionales de los pseudogenes, ya que se ha observado que éstos pueden sesgar la reconstrucción filogenética, aunque su influencia no está todavía clara (véase Zheng et al. 2008). Los pseudogenes son secuencias parálogas que, al presentar características diferentes a las copias funcionales, aumentan la variabilidad intraindividual y pueden llevar a errores en una reconstrucción de filogenia al sugerir un origen polifilético para las secuencias de un mismo individuo (Harpke & Peterson 2006). Sin embargo, la filogenia obtenida en *Corymbia* a partir de copias no funcionales de los ITS fue más congruente que la obtenida a partir de las copias funcionales (Ochieng et al. 2007).

Los criterios para diferenciar los posibles pseudogenes de las copias funcionales han sido preferentemente los referidos a la posición de éstos en los árboles filogenéticos y a características de los ITS, tales como el contenido de G+C, ya que estos nucleótidos estabilizan la estructura secundaria (en los pseudogenes el contenido de AT es mayor) y a la estructura secundaria de los ITS-2, que está más conservada a nivel de especie; pero sobre todo a características referentes a la funcionalidad del gen 5,8S, como es la presencia

de sustituciones en sitios conservados y potenciales para la metilación (Bailey et al. 2003, Harpke & Peterson 2006). Recientes estudios sugieren que la energía libre mínima de la estructura secundaria del ITS-2, aunque puede ayudar a la identificación de pseudogenes, no es un criterio decisivo para discriminar entre copias funcionales y no funcionales, ya que estas secuencias forman parte de un transcrito mayor (Harpke & Peterson 2006, 2007).

En algunas especies, los genes ribosómicos 45S se encuentran localizados en un par de cromosomas homólogos, mientras que en otras especies aparecen en varias parejas de cromosomas (Long & Dawid 1980). En el caso del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, los genes ribosómicos se encuentran en la región paracentromérica de casi todos los cromosomas del complemento, aunque los bloques mayores se localizan en los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y X. Sin embargo, Cabrero et al. (2003a) observaron la existencia de variación en la localización de los genes ribosómicos entre diferentes poblaciones de este saltamontes. Recientemente, nuestro grupo ha observado que los cromosomas S₁₀ y X no llevan rDNA en las poblaciones del Cáucaso y Armenia (Cabrero et al. 2003b; López-León et al. 2008). En la mayoría de las poblaciones, los cromosomas B muestran el bloque más grande de rDNA de todo el complemento cromosómico.

Debido a la presencia de genes ribosómicos 45S en los cromosomas X y B₂₄, nos propusimos realizar un estudio comparativo de sus secuencias ITS, para someter a prueba la hipótesis del origen del B a partir del cromosoma X (López-León et al. 1994).

Material y Métodos

Para amplificar los ITS de los genes ribosómicos 45S, hemos utilizado los cebadores universales 18S e ITS4 (White et al. 1990), que anclan en los genes 18S y 28S, respectivamente, y amplifican un fragmento de DNA que contiene el ITS-1, el gen 5,8S y el ITS-2, junto a las regiones flanqueantes de los genes 18S y 28S. La PCR se llevó a cabo en 1x PCR buffer sin Mg²⁺, 2 mM Cl₂Mg, 200 μM de dNTPs, 0,4 pmol/μl de cada uno de los cebadores, 1 U de MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002) y 100 ng de DNA, tanto de DNA genómico de individuos 0B y 1B como de DNA de los cromosomas microdisecionados (μDNA X y μDNA B), en un volumen final de 25 μl. Las condiciones para la amplificación fueron: una desnaturalización inicial del DNA a 95 °C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 56 °C y 30s a 72 °C, más una extensión final de 72 °C durante 7 min. El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1,5%.

También hemos realizado PCR añadiendo DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% a la mezcla de reacción, con objeto de amplificar preferentemente secuencias funcionalmente activas. El DMSO es un desnaturalizante que relaja la estructura secundaria de la molécula de DNA y favorece la amplificación de secuencias de

rDNA funcionales, probablemente debido a que facilita la amplificación de secuencias con estructura secundaria más estables (Buckler et al 1997, Keller et al. 2006).

Las bandas obtenidas fueron recortadas y purificadas, y luego fueron ligadas al vector TOPO TA cloning, el cual se clonó dentro de las células competentes de *Escherichia coli* One Shot[®] TOP10 Competent Cells. El DNA plasmídico se aisló con el kit Perfectprep[®] Plasmad Mini (Eppendorff). En el caso de las muestras obtenidas por amplificación sin DMSO, se seleccionaron 5 clones de cada muestra de DNA genómico mientras que de las muestras de los cromosomas X y B₂₄ se seleccionaron 7 clones. Al estudiar estas secuencias se observó que las secuencias procedentes del cromosomas X y del cromosoma B₂₄ eran más homogéneas entre sí que las secuencias procedentes del DNA genómico, por ello decidimos seleccionar 10 clones de las muestras de DNA genómico y 5 clones de las de μ DNA para las secuencias obtenidas con DMSO.

Cada uno de los clones se secuenció en las dos direcciones utilizando los cebadores universales M13. Las secuencias amplificadas sin DMSO se secuenciaron en un equipo 3100-Avant genetic Analyzer de electroforesis capilar (4 capilares), de Applied Biosystems del Departamento de Genética de la Universidad de Granada, mientras que las secuencias obtenidas por la amplificación con DMSO fueron enviadas a la empresa MWG Biotech AG para su secuenciación.

La edición de las secuencias se ha realizado con el programa BioEdit v.7.9.0 (Hall 1999). El alineamiento se ha realizado utilizando el programa MAFFT versión 5 (Kato et al. 2002).

Los posibles eventos de recombinación entre las secuencias de ITS obtenidas se han detectado utilizando el programa RDP3 (Martín et al. 2005). Este programa implementa todos los modelos descritos actualmente para detectar la recombinación entre las secuencias.

La estructura secundaria y la energía libre mínima se han calculado exclusivamente para la región ITS-2. Esta región es específica de especie y está mucho más conservada de lo que lo está la región ITS-1, por lo que permite de manera más clara detectar posibles pseudogenes (Zheng et al. 2008). La energía mínima de los RNA transcritos se ha calculado con el programa online Mfold versión 3.2 (Zuker et al. 1999) a 37 °C que se supone es la temperatura termodinámicamente más estable.

Los parámetros estadísticos básicos de las secuencias, tales como el contenido de G+C y el tamaño de las secuencias, fueron calculados con MEGA 4 (Tamura et al. 2007), y la diversidad nucleotídica (π) y el número medio de nucleótidos diferentes (K) fueron calculados con el programa DnaSP v. 4. 20.2 (Rozas et al. 2003).

Hemos agrupado las secuencias mediante un árbol filogenético inferido por el método de máxima parsimonia mediante el programa PAUP* versión 4.0 b10 (Swofford 2002). Como secuencias externas (*outgroup*) utilizamos los ITS de *Locusta migratoria*, cuya secuencia fue obtenida por nosotros bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y los ITS de *Chorthippus parallelus* (AY585651), cuya secuencia fue obtenida de la base de datos GenBank. El alineamiento de las secuencias obtenidas de *E. plorans* y las secuencias externas tiene una longitud de 993 pb. El análisis por máxima parsimonia se ha realizado usando búsqueda heurística con las opciones TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*) y *MulTrees*, dando el mismo peso a todos los caracteres. Un total de 648 caracteres fueron constantes, 182 fueron sitios variables no informativos y 163 eran sitios variables informativos. Los indels (inserciones o deleciones, también denominados *gaps*) se trataron como quinto estado. Para analizar la congruencia del árbol obtenido realizamos un bootstrapping con 1000 replicas.

Adicionalmente, realizamos hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando como sonda la secuencia de los ITS amplificada a partir del cromosoma B₂₄. Esta secuencia se marcó con fluorogreen-11-dUTP mediante el método de *nick translation*. La hibridación *in situ* se ha realizado sobre preparaciones de embriones de la población de Torrox, portadores de cromosoma B₂₄ según el protocolo descrito por Cabrero et al. (2003c).

Resultados

La amplificación por PCR del μ DNA X y del μ DNA B proporcionó una banda de aproximadamente 1000 pb (véase Fig. 3.14), correspondiente a la región final 3' del gen 18S, el espaciador ITS-1, el gen 5,8S, el espaciador ITS-2 y el inicio 5' del gen 28S. De la amplificación a partir del DNA genómico (gDNA) de individuos con y sin cromosoma B se obtiene, además, una banda de 600 pb. Solo las bandas de 1000 pb han sido clonadas y secuenciadas.

En total, secuenciamos 52 clones, de los cuales cinco se han eliminado del análisis por ser idénticos a otras secuencias clonadas. El alineamiento de las 47 secuencias resultantes tiene una longitud de 957 pb (véase Alineamiento 2 en el Anexo). No se ha observado ninguna diferencia entre las secuencias amplificadas con y sin DMSO, ya hubieran sido obtenidas a partir de gDNA o bien de μ DNA X o μ DNA B. Aunque se ha reportado que las copias de ITS no funcionales se amplifican preferentemente bajo condiciones estándar (Keller et al. 2007), en nuestro caso la adición de DMSO, para relajar la estructura secundaria de estas moléculas, no ha mostrado ninguna diferencia con respecto a las condiciones estándar.

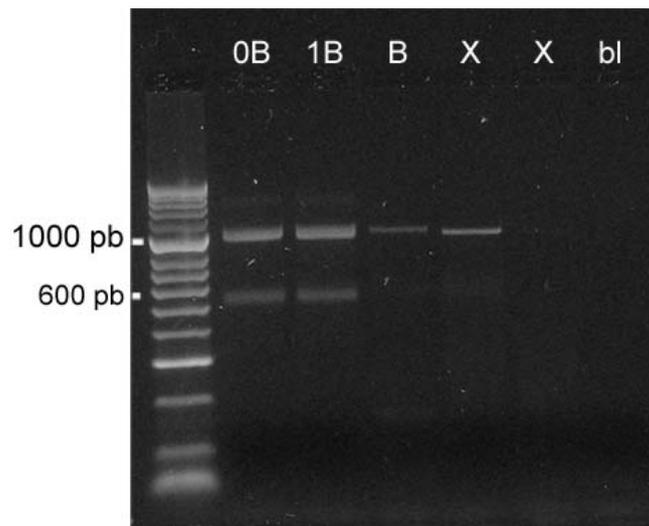


Figura 3.14. Gel mostrando la amplificación de las secuencias de los ITS a partir del DNA genómico de *E. plorans* y de los cromosomas X y B₂₄ microdisecionados. La banda de aproximadamente 1000 pb se corresponde con el amplificado que contiene a los dos ITS y al gen ribosómico 5.8S.

Las diferentes regiones de las secuencias han sido anotadas a partir de la secuencia de *Chorthippus parallelus* (AY585651). En el alineamiento de las diferentes secuencias, se observa que el gen 5,8S se encuentra muy conservado en las 47 secuencias, no observándose sustituciones importantes ni indels (véase Alineamiento 2). Además, estas secuencias 5,8S presentan un contenido G+C igual al de los genes 5,8S de *Ch. parallelus* y de *L. migratoria* (véase Tabla 3.3). La alta conservación de la secuencia del gen 5,8S indica que estas secuencias proceden de genes activos, descartando la existencia de pseudogenes entre las secuencias. Los valores de energía libre mínima obtenida para el ITS-2 son muy similares en todas las secuencias, oscilando entre -92,50 y -80,25 (Tabla 3.3). La variación obtenida en energía libre dentro y entre cada uno de los grupos se explica por la variación que hay entre las diferentes secuencias. Sin embargo, para ninguna de las secuencias de este estudio hemos obtenido una disminución o incremento importante de energía libre con respecto a la mayoría de las secuencias, lo que nos permite asumir que estas secuencias de ITS-2 en principio deben de corresponder a copias funcionales de ITS.

Tabla 3.3. Características generales de las secuencias de los ITS de los genes ribosómicos de *E. plorans*, de *Ch. parallelus* y de *L. migratoria*.

Grupo de secuencias	-ITS1-5.8S-		ITS-1		5.8S		ITS-2		ΔG (kcal/mol) ^a
	ITS2- Sequences		Long.	%GC	Long.	%GC	Long.	%GC	
	Long. (pb)	%GC	(pb)	%GC	(pb)	%GC	(pb)	%GC	
gDNA 0B	925.4	57.98	363.3	60.41	158.0	58.94	178.2	64.38	-91,2/-88,5
gDNA 1B	940.3	58.20	378.0	61.03	158.0	58.96	178.3	64.02	-89,4/-87,0
μ DNA X	927.6	57.81	365.7	59.91	157.9	58.67	178.8	64.21	-93,2/-90,5
μ DNA B ₂₄	950.1	58.74	389.6	62.24	157.9	58.67	178,8	64,60	-92,1/-89,4
<i>Ch. parallelus</i>	899,0	58,10	334,0	59,20	158,0	58,80	184,0	66,80	-97,3
<i>L. migratoria</i>	913,0	59,20	329,0	61,40	158,0	58,80	200,0	68,50	-107,3

(a) ΔG indica los valores máximos y mínimos de la energía mínima libre calculada a 37°C para cada grupo de secuencias.

El análisis realizado para detectar posibles eventos de recombinación muestra la existencia de un único evento entre dos secuencias pertenecientes al cromosoma B, por lo que, al ser un único evento de recombinación y pertenecer al mismo cromosoma, ambas secuencias se han mantenido en los análisis posteriores.

Las principales diferencias que se observan entre las secuencias se producen principalmente en el espaciador ITS-1, en concreto en varias zonas muy específicas de éste, donde se concentran los principales indels (véase Alineamiento 2). El ITS-2 está mucho más conservado y la única diferencia importante que se observa es la inserción de una A al final del espaciador, característica de las secuencias de ribosómico presentes en el cromosoma B (véase Alineamiento 2). No se observan diferencias importantes en las regiones más conservadas correspondientes a los genes 18S, 5,8S y 28S, en concreto, en el gen 5,8S, como se ha comentado anteriormente, no existiendo variación, ni en longitud ni en el porcentaje de G+C, entre las distintas secuencias (Tabla 3.3).

Las secuencias ITS específicas del cromosoma B₂₄ son las más largas y presentan un mayor porcentaje de G+C (véase Tabla 3.3). Esto se explica por la existencia, en la región del ITS-1, de varias inserciones ricas en G+C que no aparecen en las otras secuencias (Tabla 3.3). En cambio, el ITS-1 del cromosoma X muestra una serie de deleciones comunes a todas ellas. Las secuencias del ITS-1 procedentes de gDNA son más heterogéneas y muestran una serie de indels comunes a las secuencias específicas del cromosoma B. Las diferencias entre secuencias no sólo se deben a la existencia de indels sino que existen además sustituciones específicas, principalmente en las secuencias pertenecientes al cromosoma B₂₄ (véase Alineamiento 2).

Puesto que los indels parecen ser un factor importante en la identidad cromosómica de los ITS de *E. plorans*, hemos inferido el árbol filogenético por máxima parsimonia considerando los indels como quinto estado (véase Fig. 3.15). En el árbol obtenido se observa que las secuencias pertenecientes a los cromosomas X y B forman dos clados separados, bien diferenciados del resto de secuencias. Cabe esperar que los cromosomas S₉, S₁₀ y S₁₁, que son los autosomas donde se localizan los *cluster* mayores para genes ribosómicos 45S, contribuyan principalmente a la muestra de secuencias obtenidas a partir de gDNA (tanto de 0B como 1B). La presencia de secuencias obtenidas por amplificación de gDNA1B en el clado formado por las secuencias del cromosoma B, sugiere que estas secuencias deben corresponder a secuencias ITS del cromosoma B presente en ese gDNA. Igual ocurre en el clado formado por las secuencias de cromosoma X, donde se observan tanto secuencias amplificadas a partir de gDNA 0B como de gDNA 1B y que, presumiblemente, deben corresponder a secuencias ITS de los cromosomas X presentes en esos gDNA. El resto de secuencias obtenidas a partir de las muestras de gDNA, y presumiblemente pertenecientes a los autosomas, muestran más variación y no se agrupan conjuntamente en un clado único. No obstante, en el dendrograma se pueden observar también pequeños grupos de secuencias que forman clados, más o menos definidos, que tal vez correspondan a secuencias ITS de algún autosoma concreto, sugiriendo, en conjunto, que la homogenización de las secuencias de rDNA en *E. plorans* es mayor al nivel intracromosómico que al nivel intercromosómico (Fig. 3.15).

El árbol filogenético obtenido muestra que el clado del cromosoma B₂₄ se sitúa más cerca de algunas secuencias presumiblemente procedentes de los autosomas que de las secuencias procedentes del cromosoma X, que parecen disponerse más alejadas del resto de secuencias. Esto sugiere que las secuencias de los ITS del cromosoma B₂₄ están más relacionadas con las secuencias localizadas en los autosomas que con las secuencias del cromosoma X, lo cual rechazaría la hipótesis del origen de los cromosomas B de *E. plorans* a partir del cromosoma X (López-León et al. 1994).

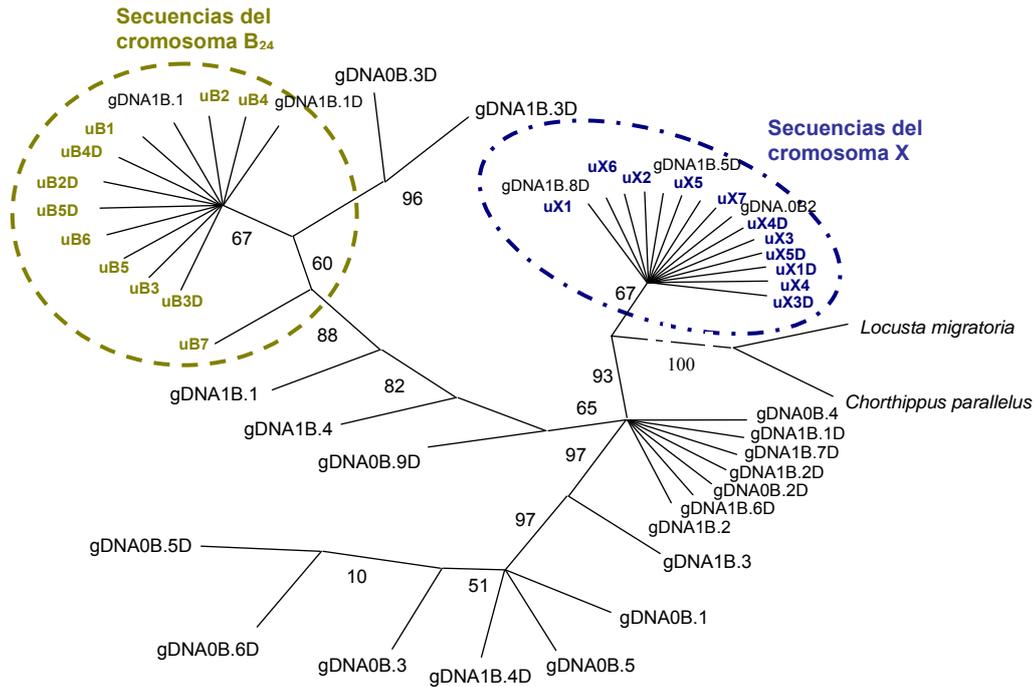


Figura 3.15. Árbol filogenético obtenido por máxima parsimonia considerando los indels como quinto estado. Se observa la homogenización de las secuencias de los ITS dentro del cromosoma X y del cromosoma B₂₄, evidenciada por la politomía en la filogenia. Los valores de las ramas corresponden a los valores de bootstrap tras realizar 1000 replicas.

Tabla 3.4. Comparación de la variación nucleotídica de los espaciadores ITS-1 e ITS-2. Estos valores se han calculados excluyendo los *gaps*.

Regiones	# seq	Sitios		π	K
		variables	Haplotipos		
ITS 1					
gDNA 0B	11	16	8	0,01459	5,01818
gDNA 1B	14	13	10	0,01351	4,71429
μ DNA X	11	3	11	0,00637	2,52727
μ DNA B ₂₄	11	9	6	0,00436	1,63636
ITS 2					
gDNA 0B	11	5	5	0,00931	1,89091
gDNA 1B	14	6	6	0,00931	1,89011
μ DNA X	11	4	4	0,00358	0,72727
μ DNA B ₂₄	11	10	8	0,00891	1,81818

π , diversidad nucleotídica
 K , número medio de sustituciones

Los datos obtenidos muestran que las secuencias del ITS-1 y del ITS-2, pertenecientes a los cromosomas X, son las que presentan una menor diversidad nucleotídica (Tabla 3.4) y haplotípica, siendo por tanto las menos variables de todas las secuencias.

La FISH realizada con la sonda de los ITS obtenidos del cromosoma B₂₄ mostró la localización de los genes ribosómicos en la región paracentromérica de los cromosomas pequeños S₉, S₁₀, S₁₁ y en el cromosoma X y, además, en la región distal del cromosoma B₂₄, como ya se conocía por estudios realizados anteriormente (Fig. 3.16) (López-León et al. 1994; Cabrero et al. 1999; 2003a).

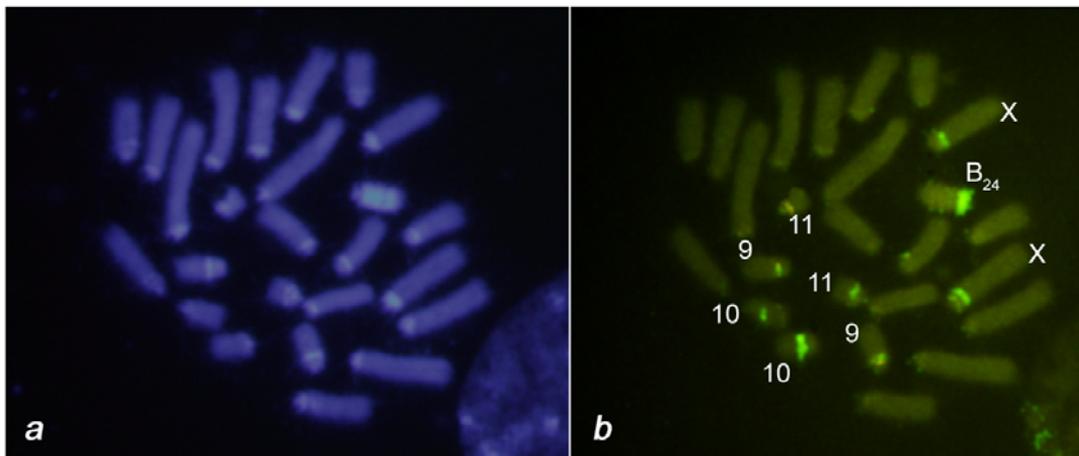


Figura 3.16. Hibridación *in situ* fluorescente utilizando como sonda la secuencia de ITS amplificada a partir del DNA del cromosoma B₂₄ (en verde). En la imagen se observa la localización de los genes ribosómicos en los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁, y en el cromosoma X. El cromosoma B₂₄ presenta el bloque mayor de los genes ribosómicos.

Discusión

Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de evolución concertada de los genes ribosómicos en *E. plorans* son más eficaces dentro de cada cromosoma que a nivel intercromosómico, al contrario que en el caso del DNA satélite que mostró un alto grado de homogenización intercromosómica, originando así secuencias de rDNA específicas de cromosoma, tal como es el caso de las secuencias de los ITS específicas de los cromosomas X y B₂₄. La presencia de varios clados pequeños formados por secuencias de los ITS, presumiblemente pertenecientes a algún autosoma, también apoyaría esta hipótesis. Se sabe que el entrecruzamiento desigual entre copias dentro de un mismo cromosoma suele ser muy eficiente en la homogenización intracromosómica de las secuencias (Dover 1986). Esto es lógico dado que la homogenización intracromosómica puede ocurrir durante la recombinación meiótica, que es probable que sea más frecuente que la recombinación ectópica en la que estaría basada la homogenización intercromosómica. Una

aproximación para dilucidar esta hipótesis, sería la microdissección de los tres autosomas más pequeños de *E. plorans*, y la amplificación de las regiones ITS de sus rDNA, para comprobar si cada uno posee secuencias específicas de ITS-1 del rDNA resultantes de la elevada homogenización intracromosómica. De hecho, recientemente hemos confirmado que uno de estos clados pertenece al cromosoma S₁₁. Sin embargo, hay que decir que la mayor concertación intracromosómica, observada para los genes ribosómicos de *E. plorans*, no se ha observado para otras especies, como en el caso de la planta *Brachycome dichromosomatica*, donde no se observó evolución concertada de la región ITS-2 ni en los cromosomas A ni en varios cromosomas B microdisseccionados en esta especie (Marschner et al. 2007).

Las principales diferencias observadas en la secuencia de los ITS se concentran en el espaciador ITS-1, que es muy variable a nivel intragenómico, pero estas variaciones desaparecen al considerar el nivel intracromosómico. La coexistencia de distintas secuencias de ITS-1 en el genoma de una especie, específicas de cada cromosoma, puede llevar a error a la hora de cuantificar la variación existente en estas secuencias a los niveles individual y poblacional. La existencia de polimorfismo intraespecífico para estas secuencias puede no hacerlas un buen marcador para la reconstrucción filogenética en especies que han divergido recientemente, ya que el fenómeno de separación filética incompleta ("*incomplete sorting*") de estas secuencias podría conducir a errores en la filogenia. Por ejemplo, en el saltamontes *Podisma pedestris*, la variación observada en la secuencia del ITS-1 a los niveles individual y poblacional hizo pensar a Keller et al. (2007) que este espaciador no evoluciona concertadamente en esta especie, pero tal vez un análisis a nivel cromosómico, como el realizado por nosotros, permita apreciar la homogenización intracromosómica de las secuencias ITS. Al ser mucho más conservado al nivel de especie, el espaciador ITS-2 es mejor marcador para estudios filogenéticos (Coleman 2007). De hecho, el ITS-2 de *E. plorans* es mucho más homogéneo que el primero de estos espaciadores, siendo prácticamente igual en todas las secuencias analizadas, con excepción de las secuencias específicas del cromosoma B₂₄, que poseen una inserción de una A que no aparece en el resto de secuencias.

En la mayoría de las poblaciones españolas los genes ribosómicos se localizan en la región paracentromérica de todos los cromosomas del complemento, aunque los mayores bloques, las llamadas NORs primarias, que son las que se encuentran habitualmente activas, se localizan en los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y en el cromosoma X. El hecho de no haber hallado pseudogenes entre las secuencias analizadas en este estudio indica que en el genoma de *E. plorans* deben coexistir distintas variantes funcionales de los genes ribosómicos. Además, la presencia de nucleolo asociado tanto al cromosoma X como al cromosoma B₂₄ en la población de Torrox (véase los apartados 4.2 y 4.3) parece apoyar esta hipótesis.

La presencia de diferentes variantes funcionales de las secuencias de los ITS de los genes ribosómicos en el genoma de *E. plorans*, y la aparente ausencia de pseudogenes, sugiere que estas secuencias podrían estar sometidas, además, a selección purificadora. El modelo de evolución de “nacimiento y muerte” (*Birth-and-Death Evolution*) (Nei & Hughes 1992) sugiere que a través de la duplicación se crean nuevas copias, alguna de las cuales son mantenidas en los genomas por un largo período de tiempo mientras que otras son eliminadas o inactivadas a través de deleciones. Este modelo fue propuesto para explicar la evolución de la familia multigénica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de mamíferos, que no podía ser explicado por el modelo de evolución concertada. Actualmente se está sugiriendo que la evolución de muchas familias multigénicas, tales como las genes de las histonas, los genes de las inmunoglobulinas e incluso de los genes ribosómicos 45S y los genes rDNA 5S, se puede explicar bajo este modelo (Nei & Rooney 2005). Estos autores sugieren que la existencia en *Escherichia coli* de ITS-1 de longitud variable se puede explicar por la acción de una fuerte selección purificadora (puesto que además, los ITS-1 de *E. coli* pueden albergar genes para tRNA) y ocasionales procesos de recombinación desigual. Rooney (2004) ha descrito que los genes ribosómicos de *Plasmodium* evolucionan siguiendo el modelo evolutivo de “nacimiento y muerte”, ya que en esta especie coexisten dos tipos de genes ribosómicos 18S que se localizan en cromosomas diferentes, e incluso se transcriben en momentos diferentes del ciclo de vida del parásito. Es concebible, por tanto, que los genes ribosómicos estén sometidos tanto a evolución concertada como a selección purificadora que actué principalmente a nivel de los genes (Nei & Hughes 1992). En especies con mucho rDNA, presente en la mayoría de los cromosomas, como es el caso de *E. plorans*, habría que explicar cómo serían eliminadas las copias defectuosas. Posiblemente la presencia ocasional de múltiples copias de rDNA defectivas en un individuo pueda ser deletérea, contribuyendo a su eliminación del genoma. Procesos de este tipo pueden extenderse temporalmente y explicar la eliminación de las copias defectivas.

Por otro lado, el árbol filogenético obtenido pone de manifiesto una mayor divergencia de las secuencias específicas del cromosoma X y las secuencias propias del cromosoma B₂₄. La aparente ausencia de genes ribosómicos 45S en el cromosoma X de las poblaciones del Cáucaso y en la subespecie *E. plorans meridionalis*, sugerida mediante FISH (Cabreró et al. 2003a, López-León et al. 2008), indica que la presencia de los genes ribosómicos en el cromosoma X de las poblaciones españolas debe ser reciente. La alta divergencia de las secuencias de los ITS específicas del cromosoma X, con respecto a las secuencias presentes en los otros cromosomas puede estar indicando una tasa de evolución más alta en este cromosoma que para los demás cromosomas, incluyendo al B₂₄. Estos datos apoyan la idea de que la evolución de las secuencias de los cromosomas X es mucho más rápida que la de los autosomas (para más detalle véase la revisión de Singh & Petrov 2007). El sistema de determinación del sexo en *E. plorans* es XX/X0, de manera que los machos de esta especie sólo presentan un cromosoma X, que en la meiosis masculina se muestra de forma univalente y no recombina con los demás cromosomas. La

recombinación entre dos cromosomas X sólo se produce en la meiosis femenina. Este comportamiento diferente en la meiosis de machos y hembras, junto con un censo efectivo poblacional diferente para el cromosoma X y los autosomas (hay solo tres cromosomas X por cada cuatro autosomas), la mayor visibilidad de las mutaciones recesivas en el sexo hemigigótico y la compensación de dosis para los genes del X, pueden interactuar e incrementar la tasa de evolución de las secuencias del cromosoma X con respecto a las de los autosomas (Singh & Petrov 2007).

El árbol filogenético también muestra claramente que las secuencias propias del cromosoma B₂₄ se parecen más a algunas secuencias derivadas de gDNA que a las secuencias derivadas del X. Este resultado no apoya la hipótesis de que los cromosomas B de *E. plorans* derivaron del cromosoma X (López-León et al. 1994). Más bien, sugieren la posibilidad de su origen a partir de alguno de los tres autosomas pequeños. La hipótesis del origen del cromosoma B de *E. plorans* a partir del cromosoma X, estaba basada en la ordenación de las secuencias de el satDNA y rDNA con respecto al centrómero, que sólo coincidía en X y B (López-León et al. 1994). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el cromosoma S₁₁, en poblaciones de Marruecos, muestra la misma ordenación centrómero-satDNA-rDNA que el cromosoma B (Bakkali 2001). Además, en algunas poblaciones españolas se ha observado un polimorfismo para la ordenación de estas dos secuencias en el cromosoma S₁₁ (Cabrerero et al. 2003a). Finalmente, la presencia de rDNA 45S y 5S en los cromosomas B del Cáucaso, la ausencia del rDNA 45S en el X, y la presencia de ambos en el S₁₁, contribuyó a reforzar la hipótesis de que los Bs podrían haber derivado del autosoma S₁₁ (Cabrerero et al. 2003b). Nuestro análisis de las secuencias de los ITS permite rechazar la hipótesis del origen a partir del cromosoma X, y apoya la hipótesis del origen autosómico del cromosoma B en esta especie. La microdissección de los tres cromosomas pequeños, S₉, S₁₀ y S₁₁ y la posterior amplificación de las secuencias de los ITS presentes en ellos, aclararían el origen exacto del cromosoma B de las poblaciones españolas, por lo que actualmente hemos iniciado el proceso de microdissección de estos autosomas y ya hemos obtenido datos preliminares (secuencias rDNA) que indicarían que el autosoma S₁₁ no sería un posible candidato a ser el cromosoma del que deriva el cromosoma B de *E. plorans*.

Bibliografía

- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism paralogy and pseudogenes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 435-455.
- Bakkali M. 2001 Tesis Doctoral: Evolución de los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* en Marruecos.
- Buckler ES, Ippolito A and Holtsford TP. 1997. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832.

- Buckler ESI & Holtsford TP. 1996. *Zea* ribosomal repeat evolution and substitution patterns. *Mol. Biol. Evol.* 13: 623-632.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM. 1999 Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435-439.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 11: 375-381.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 2003b Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207-211.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM. 2003c. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90: 377-381.
- Coleman AW . 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 35 (10): 3322-3329.
- Dover GA. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* 2: 159-165.
- Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR, Jansen RK. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 216-234.
- Gutell RR. 1996. Comparative Sequence Analysis and the Structure of 16S and 23S rRNA. In: *Ribosomal RNA. Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis*. pp. 111-128. Dahlberg A.E. and Zimmermann R.A.. (eds.) CRC Press. Boca Raton.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Harpke D & Peterson A. 2008. 5.8S motifs for the identification of pseudogenetic ITS regions. *Botany* 86: 300-305.
- Harpke D & Peterson A. 2007. Quantitative PCR revealed a minority of ITS copies to be functional in *Mammillaria* (Cactaceae). *Int. J. Plant Sci.* 168: 1157-1160.
- Harpke D & Peterson A. 2006. Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 579-593.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research.* 30: 3059-3066.
- Keller I, Chintauan-Marquier IC, Veltsos P and Nichols RA. 2006. Ribosomal DNA in the Grasshopper *Podisma pedestris*: Escape From Concerted Evolution. *Genetics* 174: 863-874
- Lafontaine DLJ and Tollervey D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 514-520.

- Long EO and Dawid IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 727-764.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Camacho JPM. 2008. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res.* 121: 260-265
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87-92
- Mai JC and Coleman AW. 1997. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae andowering plants. *J. Mol. Evol.* 44: 258-271.
- Martin DP, Williamson C and Posada D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21(2): 260-262
- Marschner S, Meister A, Blattner FR and Houben A. 2007. Evolution and function of B chromosome 45S rDNA sequence in *Brachycome dichromosmatica*. *Genome* 50: 638-644.
- Nei M & Rooney AP. 2005. Concerted and Birth-and Death Evolution of Multigene Families. *Annu. Rev. Genet.* 2005. 39: 121-52.
- Nei M & Hughes AL. 1992. Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. pp. 27-38. In *11th HistocompatibilityWorkshop and Conference*, ed. K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki,. Oxford, UK: Oxford Univ. Press
- Ochieng JW, Henry RJ, Baverstock PR, Steane DA, Shepherd M. 2007. Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 752-764.
- Singh ND & Petrov DA. 2007. Evolution of Gene Function on the X Chromosome Versus the Autosomes. *Gene and Protein Evolution. Genome Dyn.* Basel, Karger 3: 101-118.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Sylvestre JE, González IL, and Mougey EB. 2004. Structure and Organization of Vertebrate Ribosomal DNA. pp 58-72. In *The Nucleolus* (eds. Mark OJ. Olson) Landes Bioscience.
- Rooney AP. 2004. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. *Mol. Biol. Evol.* 21:1704-11
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24: 1596-1599.

- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Zheng X, Cai D, Yao L and Teng Y . 2008. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. Mol. Phylogenet. Evol. 48: 892-903
- Zuker M, Mathews DH and Turner DH. 1999. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. pp. 11-43. In Barciszewski J. and Clark BFC (eds), RNA Biochemistry and Biotechnology. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

3.4. GENES RNA 5S

Introducción

En los eucariotas, los genes que codifican para el RNA ribosómico (rRNA) 5S, que forma parte junto al RNA 5,8S y 28S de la subunidad mayor de los ribosomas, se encuentran separados del resto de los genes ribosómicos debido a que su transcripción la realiza una RNA polimerasa diferente (Bergeron & Drouin 2008). Mientras que el rDNA 45S es transcrito por la RNA polimerasa I, el rDNA 5S es transcrito por la RNA polimerasa III (Pieler et al. 1987, Bergeron & Drouin 2008, López-Piñón et al. 2008). Al igual que los otros genes ribosómicos, los genes rRNA 5S se encuentran repetidos en tándem en el genoma y, dependiendo de la especie, se localizan en uno o en varios cromosomas del complemento (Long & Dawid 1980). La unidad de repetición está formada por el gen rRNA 5S, que tiene una longitud de aproximadamente 120 pb, y un espaciador no transcrito, que varía en longitud según la especie (López-Piñón et al. 2008). Dentro de la secuencia del gen se encuentra el promotor para su transcripción (Pieler et al. 1987, López-Piñón et al. 2008) y tres residuos de T que indican el fin de la transcripción. Recientemente se ha descrito una región en el espaciador, semejante a la secuencia TATA, que favorece la transcripción de este gen (Douet & Tourmente 2007).

Los genes rRNA 5S están muy conservados entre especies, por lo que no son muy utilizados para la reconstrucción de filogenias (Steele et al. 1991). Sin embargo, el espaciador intergénico acumula diferencias tanto en genes funcionales como en pseudogenes y permite resolver filogenias a nivel taxonómico bajo (Suzuki et al. 1994, López-Piñón et al. 2008).

Los genes rRNA 5S, al igual que los genes ribosómicos 45S, presentan evolución concertada (Dover 1986). Pero, si la homogenización no es lo suficientemente efectiva, es de esperar la existencia de variación intragenómica, tanto en los genes y pseudogenes como en el espaciador, el cual puede diferir en secuencia y longitud (López-Piñón et al. 2008). Se ha observado la presencia de secuencias aisladas de rDNA 5S junto a los genes ribosómicos 45S, los genes de las histonas, pequeños RNA nucleares y otras familias multigénicas (Eirín-López et al. 2004, Bergeron & Drouin, 2008, López-Piñón et al. 2008, Drouin & Moniz de Sá 1995). Se ha propuesto la retrotransposición como mecanismo por el que se produce la amplificación, dispersión e integración de los genes rRNA 5S en los genomas (Selker et al. 1981, Drouin 2000, Rooney & Ward 2005). El hecho de que los genes rRNA 5S se encuentren ligados en *tándem* a multitud de familias multigénicas, parece ser consecuencia de la recombinación desigual y los mecanismos de conversión génica que actúan en la homogenización de estas familias multigénicas (Drouin & Moniz de Sá 1995, Bergeron & Drouin 2008).

Recientemente, Rooney & Ward (2005) examinaron los patrones de evolución de los genes RNAr 5S en cuatro especies de hongos y observaron que estas secuencias están sometidas a una fuerte selección purificadora y que

evolucionan según el modelo de “nacimiento y muerte” (Nei y Hughes 1992), por el cual, a través de procesos de duplicación, se crean nuevas copias que son mantenidas durante largos períodos de tiempo o eliminadas por delección. Estos autores observaron la existencia de varios tipos de genes rRNA 5S dentro de un mismo genoma, la existencia de varios tipos de genes rRNA 5S compartidos por varias especies, la existencia de múltiples pseudogenes en cada especie y la presencia de variación entre copias rRNA 5S. Estos patrones de evolución son fácilmente explicables bajo la asunción de selección purificadora actuando sobre estas secuencias. Se ha comprobado recientemente que la evolución de los genes de las histonas, los genes de las inmunoglobulinas e incluso de los genes ribosómicos 45S y 5S se puede explicar bajo este modelo de evolución por nacimiento y muerte (Nei & Rooney 2005).

En *Eyrepocnemis plorans* los genes ribosómicos 5S se encuentran dispersos formando pequeños *clusters* en varios cromosomas del complemento, aunque existe variación interpoblacional para su localización (Cabrero et al. 2003b). Así, en los individuos de la población de Torrox, los genes rRNA 5S se localizan en todos los cromosomas medianos y en dos de los cromosomas pequeños, S₉ y S₁₁ (Cabrero et al. 2003b). Por lo general, ni el cromosoma X ni los cromosomas B presentes en las poblaciones españolas y de Marruecos parecen portar bloques de rRNA 5S visibles mediante FISH. Sin embargo, en las poblaciones del Cáucaso, ambos cromosomas presentan bloques de rRNA 5S en la región proximal (Cabrero et al. 2003b).

En esta sección analizamos las secuencias de rRNA 5S obtenidas mediante amplificación por PCR del μ DNA X y μ DNA B, y las comparamos con las secuencias obtenidas a partir de gDNA de *E. plorans*, con objeto de investigar si esta información contribuye a esclarecer el origen de los cromosomas B de esta especie.

Material y Métodos

La amplificación, mediante PCR, del rDNA 5S a partir de gDNA de individuos con y sin cromosomas B, así como del DNA de los cromosomas X y B₂₄ microdisecionados (μ DNA X y μ DNA B) se llevó a cabo en condiciones estándar (véase Material y Métodos), con una temperatura de hibridación de 52°C y utilizando los cebadores 5S-nRNA.F-1 (5' AAC GAC CAT ACC ACG CTG AA-3' y 5S-nRNA.R-1 (5' -AAG CGG TCC CCC ATC TAA GT-3') diseñados a partir de la secuencia de rRNA 5S de *Drosophila melanogaster* (Cabrero et al. 2003b).

Las bandas amplificadas fueron clonadas por el método TOPO-TA (descrito en Material y Métodos), y 31 clones (13 de gDNA, 8 de μ DNA X y 10 de μ DNA B) fueron seleccionados para la secuenciación del inserto. Las secuenciaciones se realizaron en una única dirección con el cebador universal M13F, en el

Servicio de Secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Granada.

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit v.7.9.0 (Hall 1999), y realizamos el alineamiento con el programa MAFFT versión 5 (Kato et al. 2002). Con MEGA 4 (Tamura et al. 2007) y DnaSP v. 4. 20.2 (Rozas et al. 2003) calculamos los parámetros básicos de las secuencias, tales como diversidad nucleotídica (π), número medio de sustituciones (K), % G+C, sitios hipervariables y número de haplotipos diferentes. Las distancias genéticas fueron calculadas con MEGA 4, por el método de máxima verosimilitud factorizada (Tamura, Nei, Kumar, 2004) considerando los gaps (*pairwise deletion*).

La relación filogenética entre las diferentes secuencias obtenidas fue analizada mediante máxima verosimilitud, seleccionando previamente el mejor modelo de evolución de secuencias con Modeltest 3.8 (Posada 2006, Posada & Crandall 1998), y por máxima parsimonia. En ambos casos hemos utilizado el programa PAUP* versión 4.0 b10 (Swofford 2002). Mediante el criterio bayesiano de información (BIC, Bayesian Information Criterion) implementado en ModelTest 3.8, observamos que las secuencias obtenidas se ajustaban al modelo de *Kimura 2-parametros*, K80 (Kimura 1980), donde todas las bases tienen igual frecuencia (0,25) y con una proporción de transición-transversión de 1,3046. El análisis por máxima parsimonia fue realizado mediante búsqueda heurística con las opciones TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*) y *MulTrees*. El alineamiento final está formado por 96 posiciones, de las cuales 50 son sitios conservados, 19 son sitios no informativos y 27 son sitios parsimoniosamente informativos. A todas las posiciones se les asignó el mismo peso. Los indels se consideraron como un quinto estado. La congruencia de las filogenias obtenidas fue calculada por bootstrapping con 100 réplicas, en el caso de máxima verosimilitud, y 500 replicas en el caso de máxima parsimonia. Como especie externa, utilizamos la secuencia del rDNA 5S de *Mytilus edulis* (AJ312087).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para analizar la localización de los genes rRNA 5S en *E. plorans*, fue realizada sobre preparaciones de embriones portadores de cromosomas B₂₄, usando la sonda de rDNA 5S marcada con fluorogreen-11-dUTP mediante *nick translation*.

Resultados

Hemos amplificado un fragmento de aproximadamente 90 pb, tanto a partir de gDNA (de individuos 0B y 1B) como de μ DNA X y μ DNA B (Fig. 3.17). Las bandas fueron clonadas y secuenciadas, proporcionando un alineamiento final de 96 pb.

Para el análisis de las secuencias del rDNA 5S, éstas fueron agrupadas, según su procedencia, en: i) secuencias amplificadas a partir del gDNA de individuos con y sin cromosoma B, que presumiblemente corresponderán a las

secuencias del rDNA 5S presentes en los autosomas, que es donde se localizan los clusters de genes rRNA 5S visibles mediante FISH; ii) secuencias de los genes 5S obtenidas a partir del cromosoma X microdisecionado; y iii) secuencias amplificadas a partir del cromosomas B₂₄ microdisecionado.

Las secuencias de rDNA 5S obtenidas a partir de gDNA presentan una alta similitud con la secuencia del rDNA 5S de otras especies, tienen una longitud de 94 pb y un 53,12% de contenido en G+C (Tabla 3.5) siendo, por tanto, aparentemente funcionales. En cambio, las secuencias presentes en los cromosomas X y B₂₄ son de menor tamaño y presentan un contenido en G+C mucho mayor (Tabla 3.5), debido a que se trata de secuencias de genes 5S que se encuentran muy degeneradas por la presencia de múltiples sustituciones y, en algunos casos, por la existencia de una delección de 10 nucleótidos (véase Alineamiento 3 en el Anexo).

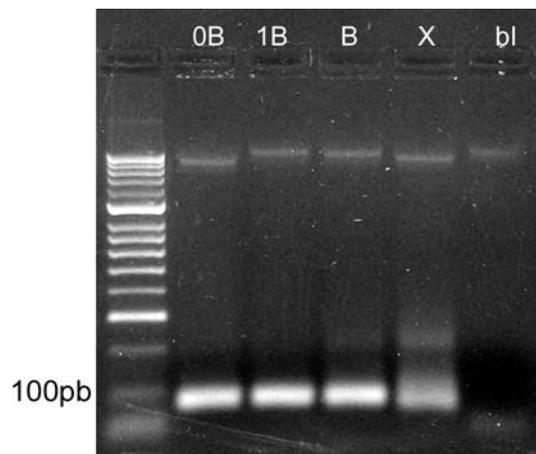


Figura 3.17. Gel al 1,5% de agarosa donde se observa la banda de 90 pb correspondiente a los genes rRNA 5S en el DNA de los cromosomas X y B₂₄ microdisecionados y en las muestras de DNA genómico de individuos con y sin cromosoma B de la población de Torrox.

Tabla 3.5. Características generales de las secuencias de rDNA 5S.

Grupo de secuencias	n. sec	Long. ^a (pb)	% G+C	Long. ^b (pb)	Sitios variables ^c	n. Mutación ^c	Haplotipos ^c	π ^c	K ^c
gDNA	13	94	53,12	93	9	9	8	0,02151	2,00000
μ DNA X	8	89	55,39	84	13	15	7	0,06548	5,50000
μ DNA X B ₂₄	10	92	56,23	83	19	22	7	0,07309	6,06667

a, longitud media de las secuencias incluidas en cada uno de los grupos

b, longitud media de las secuencias excluyendo los *gaps*

c, valores calculados excluyendo los *gaps*

π , diversidad nucleotídica

K , número medio de sustituciones

Tabla 3.6. Distancias genéticas calculadas por máxima verosimilitud factorizada. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Grupo de secuencias	gDNA	Cromosoma X	Cromosoma B
gDNA	0,022 (0,009)		
μ DNA X	0,156 (0,043)	0,072 (0,022)	
μ DNA X B ₂₄	0,138 (0,038)	0,080 (0,020)	0,085 (0,028)

Las secuencias de rDNA 5S del cromosoma B₂₄ se caracterizan principalmente por la fijación de determinadas sustituciones, algunas de las cuales son compartidas por las secuencias del cromosoma X. Pero también hay algunas secuencias de este cromosoma accesorio que presentan la delección de 10 pb y otras que muestran mayor similitud con las obtenidas a partir de DNA genómico (para más detalle véase Alineamiento 3). Por tanto, en el cromosoma B₂₄ aparecen tres tipos de secuencias del gen rRNA 5S. La heterogeneidad de secuencias presentes en el cromosoma B₂₄ queda patente por la elevada diversidad nucleotídica de sus secuencias (el triple que la del gDNA), siendo aun mayor que la de las secuencias procedentes del cromosoma X (véase Tabla 3.5). Además, tal y como muestra la diagonal en la Tabla 3.6, el grupo formado por las secuencias obtenidas del cromosoma B es más heterogéneo que los otros dos grupos. En cambio, las secuencias presumiblemente obtenidas de los autosomas son las menos diversas de todas (Tablas 3.5 y 3.6).

La alta homogeneidad que se observa para las secuencias de rDNA 5S presuntamente procedentes de los autosomas, sugiere la existencia de mecanismos de homogenización actuando sobre ellas. Sin embargo, la mayor diversidad nucleotídica observada para las secuencias del rDNA 5S procedentes de los cromosomas X y B₂₄ sugiere que en estos cromosomas dichos mecanismos evolutivos no deben ser eficientes. La degeneración sufrida por las copias presentes en estos cromosomas indica que es improbable que sean funcionales, lo cual justifica la acumulación de una mayor diversidad.

En las filogenias de estas secuencias, obtenidas por máxima verosimilitud (Fig. 3.18) y por parsimonia (Fig. 3.19), se observa la separación de las secuencias en dos clados: i) las secuencias obtenidas a partir de gDNA, presuntamente localizadas en los autosomas, que aparentan ser funcionales y estar bastante homogenizadas, y ii) las secuencias de los cromosomas X y B₂₄ que, debido al alto grado de degeneración, probablemente sean pseudogenes. Hay que destacar que dos secuencias amplificadas a partir del μ DNA B se encuentran dentro del clado de las secuencias funcionales amplificadas a partir de gDNA. Esto indica la existencia de algunas copias potencialmente funcionales en el cromosoma B₂₄. Entre las secuencias amplificadas a partir de μ DNA X, sin embargo, no observamos ninguna que pudiera ser funcional, sugiriendo que este cromosoma sólo contiene copias degeneradas.

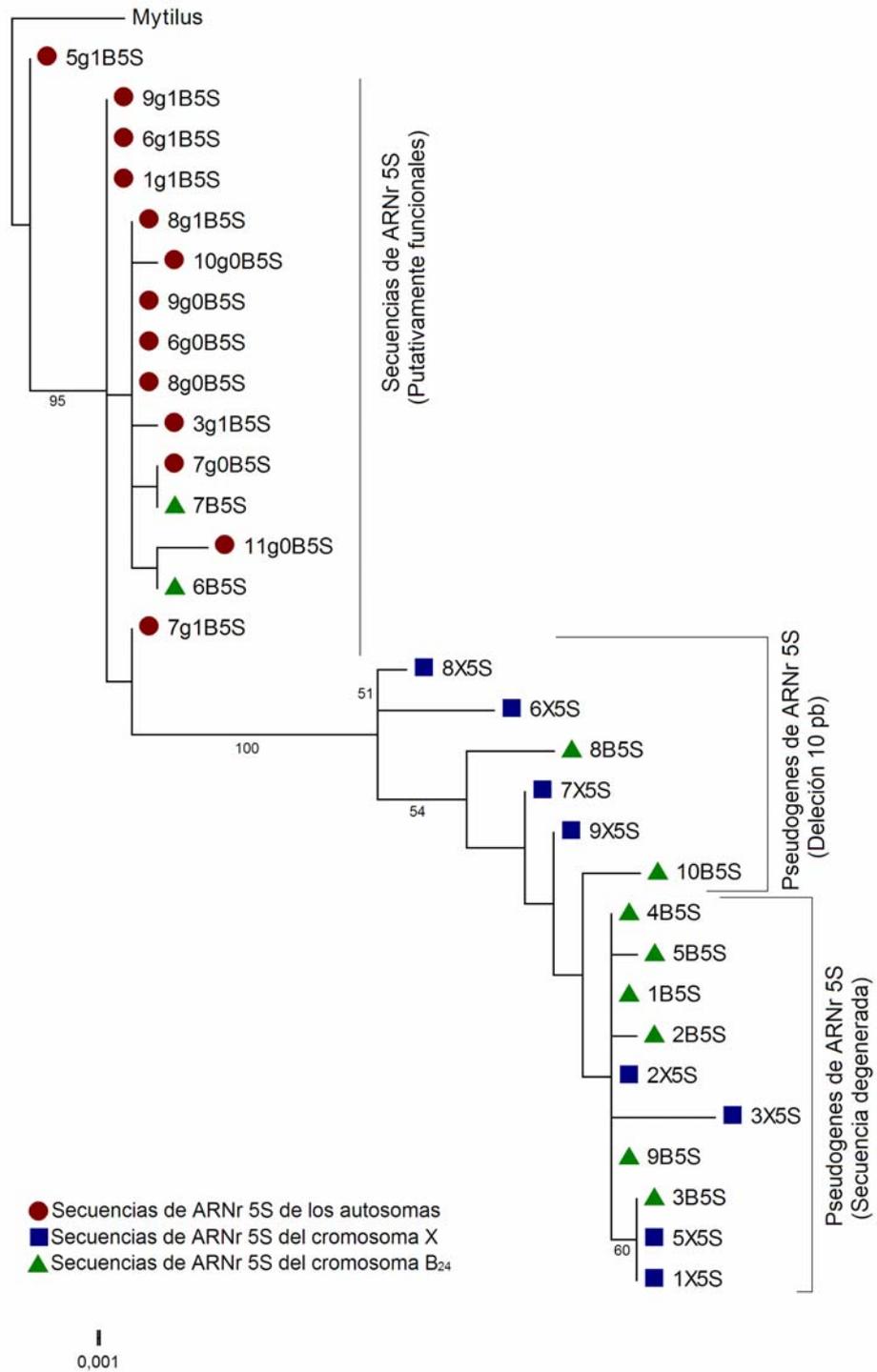


Figura 3.18. Filogenia obtenida según el modelo K80 por máxima verosimilitud para las secuencias de rDNA 5S. Los valores de las ramas corresponden a los valores de *bootstrapping*.

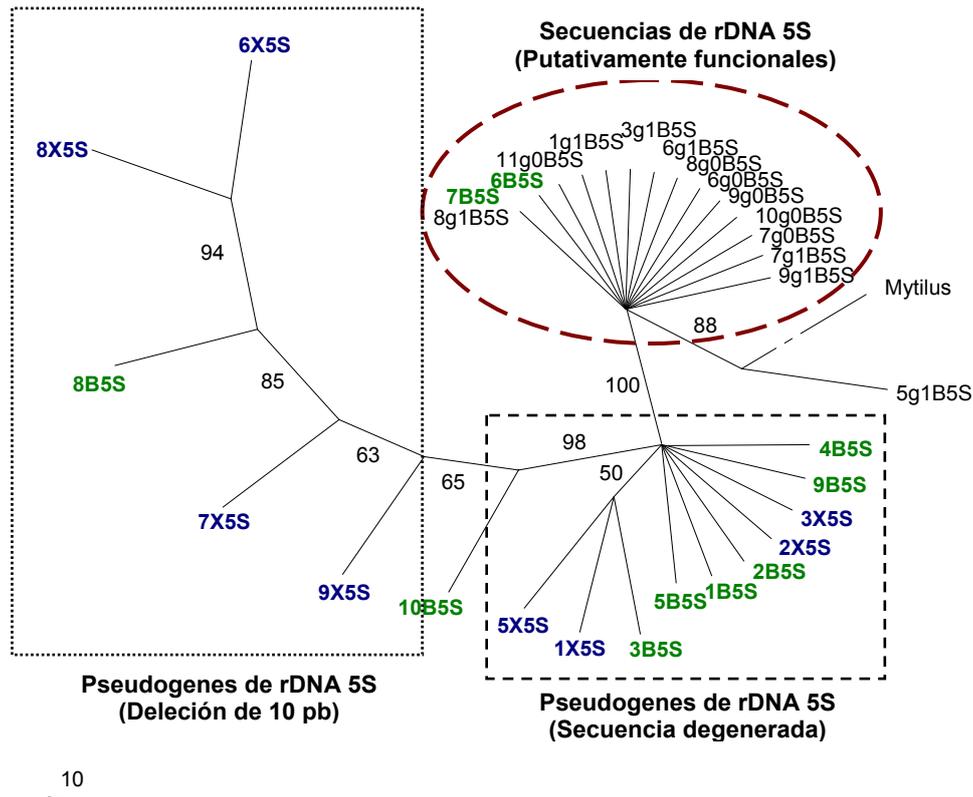


Figura 3.19. Árbol filogenético de las secuencias de rDNA 5S obtenido por parsimonia considerando los indels como quinto estado. Los valores de *bootstrapping* mayores de 50 se muestran en cada una de las ramas.

En *E. plorans*, los genes para el rRNA 5S se encuentran en pequeños bloques localizados en varios cromosomas. En la figura 3.20 puede observarse su localización en una región intersticial de los cromosomas M_4 y M_5 , y en la región proximal de los cromosomas M_6 , M_7 , M_8 , S_9 y S_{11} . En el cromosoma S_9 es donde se observa una señal de hibridación más fuerte. No se observa señal ni en el cromosoma X ni en el cromosoma B_{24} . Sin embargo, la amplificación por PCR a partir de μ DNA X y μ DNA B (véase arriba) sugiere la presencia de algunas copias de rDNA 5S en los cromosomas X y B_{24} , aunque en cantidad inferior al umbral de sensibilidad de la técnica de FISH.

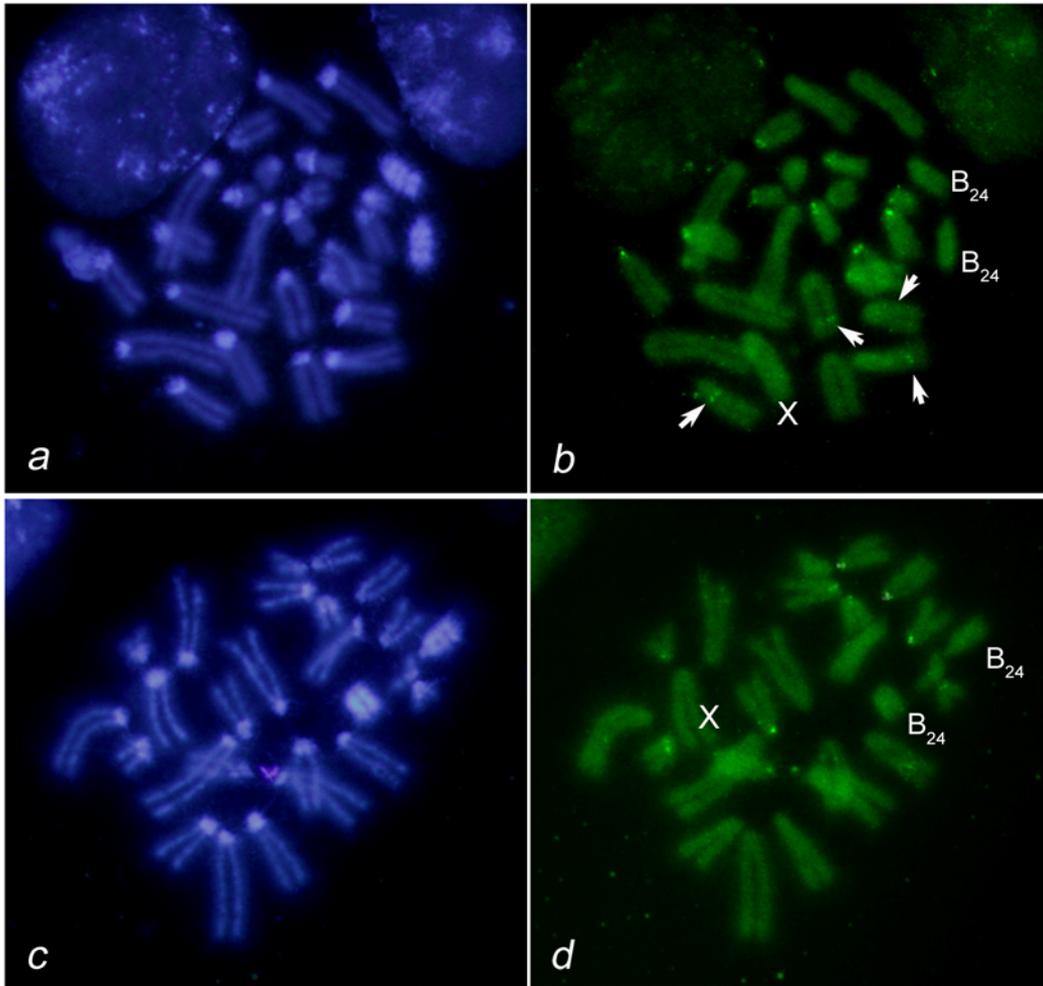


Figura 3.20. Localización de los genes rRNA 5S en los cromosomas de *E. plorans* de individuos de la población de Torrox. En las figuras *b* y *d* se puede observar la localización de esta secuencia en la región proximal de la mayoría de los cromosomas medianos, en los cromosomas S₉ y S₁₁, y en la región intersticial de los cromosomas M₄ y M₅ (señalados con flechas). No se observa señal de hibridación ni en el cromosoma S₁₀, en el cromosoma X ni en los cromosomas B₂₄.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran la existencia de tres tipos diferentes de secuencias de rDNA 5S en el genoma de *E. plorans*: una copia funcional y homogénea del rRNA 5S, presuntamente localizada en los autosomas (con alguna copia en B₂₄), y dos tipos de secuencias degeneradas de rDNA 5S, una debida a la acumulación de sustituciones, y la otra debida, además, a la presencia de una delección de 10 pb. Los dos tipos de secuencias degeneradas se encuentran en los cromosomas X y B₂₄, en muy bajo número de copias.

La alta homogeneidad de las secuencias de rDNA 5S de los autosomas podría ser el resultado de mecanismos de homogenización eficientes actuando sobre ellas. En cambio, la heterogeneidad de las secuencias degeneradas localizadas en los cromosomas X y B₂₄ se debe a que se trata de copias no funcionales y,

sobre ellas, los mecanismos de evolución concertada parecen ser menos eficientes. La divergencia encontrada para los genes rRNA 5S en estos cromosomas, con respecto a las secuencias de los autosomas, apoyan la idea de que se trata de pseudogenes. La existencia de copias no funcionales de los genes rRNA 5S se ha observado en multitud de especies, principalmente en hongos como, por ejemplo, *Neurospora crassa* (Selker et al. 1981, Metzenberg et al. 1985), *Pythium pachycaule* (Belkhiri & Klassen 1996) y varias especies del género *Aspergillus* (Gniadkowsky et al. 1991). En la mayoría de los casos, estos pseudogenes presentan una secuencia diferente a la copia funcional por la acumulación de mutaciones puntuales y deleciones en determinadas regiones. El espaciador de estos pseudogenes también suele ser diferente y, en ellos, es frecuente detectar deleciones, inserciones e inversiones. Para estas especies de hongos con un alto porcentaje de pseudogenes en el rDNA 5S, se ha propuesto que dichas secuencias evolucionan bajo el modelo de “nacimiento y muerte” (Nei & Hughes 1992), con la selección purificadora actuando a diferente tasa en cada una de las especies (Nei & Rooney 2005, Rooney & Ward 2005).

El modelo de evolución por “nacimiento y muerte” puede ser detectado por dos vías: 1) mediante un análisis filogenético de los miembros de la familia multigénica donde sea evidente el agrupamiento de secuencias procedentes de diferentes especies, y 2) a través del análisis de la divergencia de las secuencias, pues niveles altos de divergencia indicarían la pérdida de homogenización (Rooney & Ward 2005). En el genoma de *E. plorans*, la alta divergencia obtenida para las secuencias de rDNA 5S ($0,103 \pm 0,028$), se debe principalmente a la alta divergencia observada para estas secuencias en los cromosomas X y B₂₄, lo que se explica por la existencia de varios tipos de secuencias rDNA 5S en estos cromosomas. Este hecho parece apoyar la idea de que la evolución de las secuencias de rDNA 5S en estos cromosomas puede ocurrir mediante el modelo de “nacimiento y muerte” (Nei & Hughes 1992). En este sentido, tendría lógica encontrar numerosas copias “muertas” en los cromosomas B, dado que son elementos genómicos dispensables. De acuerdo con esto, nosotros hemos observado que los cromosomas B de *E. plorans* muestran una baja tasa de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (Cabrero et al. 2007), indicando su baja potencialidad para la actividad génica. Es esperable, por tanto, que la mayoría de las copias de rDNA 5S presentes en los cromosomas B hayan degenerado. Por el contrario, la presencia de algunas copias intactas, que conservan la potencialidad funcional, podría deberse a que aun no han sufrido mutaciones degenerativas o bien a eventos modernos de transposición de estas secuencias al B a partir de las copias autonómicas. La ausencia de este tipo de copias en el X, además, puede ser un indicio adicional de que los cromosomas B no derivan del cromosoma X sino de un autosoma. No obstante, la existencia de copias degeneradas similares, con la misma deleción, en los cromosomas X y B₂₄ arroja algunas dudas sobre la conclusión anterior, ya que lo más lógico sería que estas copias tuvieran un origen común.

Los genes para el rRNA 5S, por lo general, se localizan como copias repetidas en tándem en uno o varios cromosomas (Long & Dawid 1980), aunque

también se ha observado la presencia de copias dispersas por el genoma de algunas especies (Drouin & Moniz de Sá 1995). También es frecuente encontrar los genes rRNA 5S asociados a repeticiones de otras familias multigénicas, tales como los genes ribosómicos 45S o los genes de las histonas (véase la revisión de Drouin & Moniz de Sá 1995, Drouin 2000, Eirín-López et al. 2004). La hipótesis más probable, y ampliamente aceptada para explicar los patrones de localización observados para el rDNA 5S, es la transposición de estas secuencias a otras localizaciones (Selker et al. 1981, Drouin & Moniz de Sá 1995, Drouin 2000). Esta transposición puede ocurrir mediante el método de integración del DNA circular covalentemente cerrado (cccDNA), ya que estas moléculas se han observado en múltiples eucariotas (Drouin & Moniz de Sá 1995), o por medio de un intermediario de RNA (Drouin & Moniz de Sá 1995, Bergeron & Drouin 2008, Drouin 2000). La transcripción de los genes 5S por la RNA polimerasa III, también implicada en la transcripción de algunos elementos SINES (Short Interspersed Repeated DNA Elements), parece apoyar la idea de que los genes 5S se transpongan a otras regiones a través de un intermediario de RNA (Drouin & Moniz de Sá 1995). En este sentido, Drouin (2000) demostró la retrotransposición, a través de un intermediario de RNA, de secuencias de rDNA 5S junto a secuencias repetidas de rDNA 45S en ratón, en rata y en humanos. Una vez que una copia del gen rRNA 5S se sitúa cerca de alguna familia multigénica, los mecanismos de homogenización a los que están sujetos estas familias, parecen ser los responsables del ligamiento en *tándem* de la copia del gen 5S transpuesto con las unidades de repetición de estas familias multigénicas (Bergeron & Drouin 2008).

Mediante hibridación *in situ* hemos constatado que, en los individuos de *E. plorans* de la población de Torrox, los genes ribosómicos 5S se localizan en pequeños *clusters* en los cromosomas M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, S₉ y S₁₁, pero existe variación interpoblacional en la localización de estas secuencias (Cabrero et al. 2003b). En el caso de *E. plorans* no tenemos evidencias de que algunas copias del gen 5S se encuentren asociadas a algunas de las familias multigénicas presentes en el genoma de este saltamontes, ni con el DNA satélite, ni con los *cluster* de rDNA 45S, ni con las histonas. En otras especies de saltamontes, como *Locusta migratoria*, hemos constatado mediante FISH que ambos tipos de secuencias no colocalizan (Cabrero et al. datos sin publicar). En *E. plorans*, sólo en el caso de los cromosomas S₉ y S₁₁ es posible pensar que los genes 5S puedan colocalizar con las secuencias de DNA ribosómico 45S, porque ambas secuencias se encuentran en la región paracentromérica de estos cromosomas, aunque aparentemente no solapan ya que el rDNA presenta una localización más intersticial que el rDNA 5S. Sin embargo, no tenemos evidencias directas que apoyen esta idea y sería necesario, por ejemplo, la realización de una doble hibridación *in situ* utilizando ambas sondas. Pero, la hibridación *in situ* sólo permite observar señal cuando la repetición de la secuencias se encuentra en alto número de copias por lo que tal vez no es una buena técnica para detectar secuencias dispersas por el genoma asociadas a alguna familia multigénica (Drouin & Moniz de Sá 1995). En este caso, tal vez sea más efectiva la amplificación directa de un fragmento de DNA perteneciente a *E. plorans* que permita, a nivel de secuencia, observar la localización de ambas secuencias.

Otra posibilidad es realizar doble FISH, con sondas de rDNA 5S y otra familia multigénica, sobre preparaciones de fibra extendida.

Como hemos indicado anteriormente, la secuencia del rDNA 5S no cuenta una historia nítida sobre el origen del B, ya que la presencia en éste de copias funcionales, y su ausencia en el X, podrían sugerir el origen autosómico del B. Sin embargo, la presencia de copias degeneradas, portadoras de la misma delección, compartidas por el X y el B sería compatible con el origen del B a partir del X (López-León et al. 1994, Cabrero et al. 2003a) y un movimiento posterior de las secuencias funcionales rDNA 5S de los autosomas al cromosoma B. Sin embargo, el hecho de que los genes para rRNA 5S puedan moverse por eventos de retrotransposición por todo el genoma (véase arriba) implica que no se pueda descartar que se haya producido el movimiento independiente de estas secuencias al cromosoma B, o incluso que el movimiento haya sido en dirección contraria, es decir, del cromosoma B al cromosoma X. Para concluir, podemos afirmar que dada la alta movilidad de los genes rRNA 5S, estas secuencias no constituyen un buen marcador para dilucidar el origen de los cromosomas B de *E. plorans*.

Bibliografía

- Belkhiri A & Klassen GR. 1996. Diverged 5S rRNA sequences adjacent to 5S rRNA genes in the rDNA of *Pythium pachycaule*. *Curr Genet* 29: 287-292.
- Bergeron J & Drouin G. 2008. The evolution of 5S ribosomal RNA genes linked to the rDNA units of fungal species. *Curr Genet* 54(3): 123-31.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jiménez R, Camacho JP. 2007 Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet Genome Res.* 119 (1-2): 135-42.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 11: 375-381
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 2003b Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207-211.
- Douet J & Tourmente S. 2007. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity* 99: 5-13
- Drouin G (2000) Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes. *Genome* 43:213-215.
- Drouin G and Moniz de Sá M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat unit of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* 12: 481-493.

- Eirín-López, J M, Ruiz F and González-Tizón AM, Martínez A, Sánchez L, Méndez J. 2004. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphan” features. *J. Mol. Evol.* 58: 131–144.
- Gniadkowski M, Fiett J, Borsuk P, Hoffman-Zacharska D, StCpiefi PP and Bartnik E. 1991. Structure and evolution of 5s rRNA genes and pseudogenes in the genus *Aspergillus*. *J. Mol. Evol.* 33:175–178.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Long EO and Dawid IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 727–764.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87–92.
- López-Piñón M J, Freire R, Insua A and Méndez J. 2008. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in some scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Hereditas* 145: 9–19.
- Metzenberg RL, Stevens JN, Selker EU, Morzycka-Wrtblewska E (1985) Identification and ehromosomal distribution of 5S rRNA genes in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2067–2071.
- Nei M & Rooney AP. 2005. Concerted and Birth-and Death Evolution of Multigene Families. *Annu. Rev. Genet.* 2005. 39:121–52.
- Nei M & Hughes AL. 1992. Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In *11th Histocompatibility Workshop and Conference*, ed. K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki, pp. 27–38. Oxford, UK: Oxford Univ. Press
- Posada D. 2006. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34: 700–703.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817–818.
- Pieler T, Hamm J, Roeder RG. 1987. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 48: 91–100.
- Rooney AP & Ward TJ. 2005. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Nat. Acad. Sci* 102 (14): 5084–5089.

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Steele KP, Holsinger KE, Jansen RK & Taylor DW. 1991. Assessing the reliability of 5S rRNA sequence data for phylogenetic analysis in green plants. *Mol. Biol. Evol.* 8: 240-248.
- Selker EU, Free S J, Metzenberg RL & Yanofsky C. 1981. An isolated pseudogene related to the 5s RNA genes in *Neurospora crassa*. *Nature* 294:576-578.
- Suzuki H, Sakurai S and Matsuda Y. 1996. Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.* 72: 1-4.
- Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies Using the Neighbor-Joining Method. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 11030-11035.

3.5. GENES PARA LAS HISTONAS H3 Y H4

Introducción

Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular implicadas en la condensación de la cromatina. Las histonas H3, H4, H2A y H2B son las llamadas histonas nucleares (*histone core*), porque forman el octámero al cual se enrolla el DNA para formar el nucleosoma. La histona externa (*histone linker*) H1 está implicada en un segundo nivel de condensación de la cromatina al unirse al DNA existente entre dos nucleosomas consecutivos empaquetándolo aún más (Thoma et al. 1979).

En general, las histonas nucleares presentan un dominio de plegamiento (*histone fold*) de tipo hélice-lámina-hélice muy conservado e implicado en la formación del octámero, y un extremo amino terminal más variable donde ocurren la mayoría de las modificaciones postraduccionales (Fig. 3.21a). Los extremos amino terminales de las histonas se localizan hacia el exterior del octámero facilitando su posterior modificación. Las modificaciones son diferentes dependiendo del tejido y del ciclo celular, por ello se ha propuesto el llamado *código de histonas* (Tordera et al. 1993, Jenhwein & Allis 2001) para explicar la capacidad de regulación génica de la cromatina basada en modificaciones específicas de estas proteínas. Estas modificaciones implican acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones de determinados residuos que producen un cambio conformacional en la estructura de las proteínas, relajándola y facilitando la unión de determinados factores transcripcionales al DNA. Además de la regulación epigenética, también se ha demostrado que las histonas están implicadas en mecanismos de reparación del DNA (Pusarla & Bhargava 2005).

Los genes de las histonas son ricos en G+C, ya que las histonas presentan un elevado contenido de lisina y arginina, y se suelen disponer en bloques separados por pequeños espaciadores ricos en A+T (Fig. 3.21b). La disposición de estos genes así como su dirección de transcripción son específicas de cada especie (Hentschel & Birnstiel 1981). En el caso de los organismos invertebrados, como por ejemplo los artrópodos, los cinco genes se suelen localizar juntos en el mismo bloque (Maxson et al. 1983), aunque para algunas especies, como *Drosophila americana*, se ha observado la coexistencia de *clusters* con los genes de las cinco histonas y otros con sólo los de las cuatro histonas que forman el octámero (Nagoda et al. 2005). En cambio, en la mayoría de las especies de vertebrados la histona H1 suele localizarse independientemente del resto del *cluster* (Eirín-López et al. 2002).

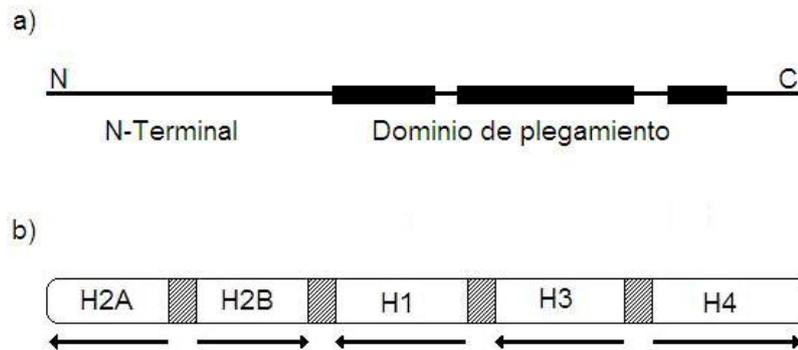


Figura 3.21. a) Esquema de la estructura secundaria de las histonas nucleares, formada por una cola amino terminal, un dominio central de plegamiento (*histone fold*) y un dominio carboxilo terminal. b) Disposición de los genes de las histonas en los artrópodos (esquema de Albig et al. 2003 siguiendo la disposición propuesta por Sellos et al. 1990)

Los genes de las histonas suelen estar activos en la fase S del ciclo celular, ya que es en esta fase cuando se produce la replicación del DNA y, por tanto, se necesita gran cantidad de histonas para la posterior compactación de las dos copias de DNA. Por ello, se les considera parte de los llamados genes dependientes de la replicación, es decir, no presentan intrones ni sus transcritos están poliadenilados (Schümperli 1986). Pero en algunas especies también se han descrito genes para las histonas que son independientes de la replicación, se les denomina de remplazamiento y tienen un patrón de expresión diferente, transcribiéndose durante todo el ciclo celular a tasas muy bajas (Rooney et al. 2002) y, al contrario que los anteriores, se caracterizan por encontrarse como copia única, presentar intrones y originar RNA mensajeros con cola de poliA (Schümperli 1986).

Una de las características más destacables de las histonas es que están evolutivamente muy conservadas, debido a su función en el empaquetamiento del DNA, especialmente las histonas H3 y H4. Además, se ha propuesto que estos genes, al igual que los de otras familias multigénicas, evolucionan concertadamente (Matsuo & Yamazaki 1989, Dover 1986) aunque también se ha propuesto un mecanismo de evolución por nacimiento y muerte (Piontkivska et al. 2002, Nei & Rooney 2005, Rooney & Ward 2005).

Debido a que se trata de genes que se transcriben y traducen a proteínas y están evolutivamente muy conservados, sus secuencias podrían ser muy interesantes como marcadores del posible origen de los cromosomas B, por lo que nos planteamos intentar amplificarlas en los DNAs microdisecionados,

además de en el DNA genómico. En este estudio, nos hemos centrado en los genes de las histonas H3 y H4.

Material y Métodos

Hemos amplificado, mediante PCR, los genes de las histonas H3 y H4 a partir de DNA genómico (gDNA) de machos adultos de la población de Torrox con y sin cromosomas B, además del DNA microdisecionado de los cromosomas X y B₂₄ (μ DNA X y μ DNA B).

La amplificación de los genes de la histona H3 fue realizada con los cebadores H3aF (5' ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC 3') y H3aR (5' ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC 3') (Colgan et al. 1998) cedidos por el Dr. Pasantes (Universidad de Vigo). La reacción de PCR se llevó a cabo con 100 ng de DNA, 1x PCR buffer sin Mg²⁺, 1 mM Cl₂Mg, 200 μ M de dNTPs, 0,4 pmol/ μ l de cada uno de los cebadores y 1 U de MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002). Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización del DNA a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C 15 segundos, 48 °C 15 segundos y 72 °C 15 segundos, con una extensión final de 72 °C durante 7 minutos.

Para la amplificación de los genes de la histona H4, utilizamos tres cebadores universales, uno directo H4F2s (5' TSC GIG AYA ACA TYC AGG GIA TCA C 3') y dos reversos, uno externo H4F2er (5' CKY TTI AGI GCR TAI ACC ACR TCC AT 3') y otro interno H4F2ir (5' GTI ACI GTC TTS CKY TTG GCG TGC TC 3'), que originan productos de PCR de tamaños diferentes, 211 pb y 181 pb respectivamente (véase Pineau et al. 2005). La amplificación se llevó a cabo en 100 ng DNA, 1x PCR buffer sin Mg²⁺, 2 mM Cl₂Mg, 200 μ M de dNTPs, 0,4 pmol/ μ l de cada uno de los cebadores y 1 U de MBL-Taq DNA polimerasa (MBL002). Las condiciones fueron: una primera desnaturalización del DNA a 95 °C durante 5 minutos, a continuación 30 ciclos a 94 °C 20 segundos, 58 °C 20 segundos y 72 °C 30 segundos y finalmente una extensión de 7 minutos a 72 °C.

Del mismo modo, probamos a amplificar el espaciador que separa las histonas H4 y H3 utilizando los cebadores H3aR y H4F2ir. La amplificación se realizó con las mismas condiciones que para el gen de la histona H4, aunque en este caso la temperatura de hibridación fue de 53 °C. Para la amplificación de esta región a partir de μ DNA X y μ DNA B, y dada la fragmentación de los DNAs procedentes de microdisección, diseñamos cebadores específicos, basados en las secuencias conocidas de *E. plorans* de H3 y H4 que generasen fragmentos de tamaño comprendido dentro del rango de tamaños en el DNA obtenido por microdisección. Para ello, utilizamos el programa Primer3 v. 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000) (véase Material y Métodos).

Los productos de las amplificaciones fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% con SYBR safe[®], y las bandas de interés fueron recortadas y purificadas con el kit GenElute[®] Gel Extraction (Sigma), siendo directamente secuenciadas en las dos direcciones en el Servicio de Análisis Genético del

Departamento de Genética de la Universidad de Granada. Un análisis mediante Blasta confirmó su similitud con los genes de las histonas.

Las bandas obtenidas fueron también clonadas (véase Material y Métodos) y 7-10 clones fueron seleccionados, de cada una de las muestras, para su secuenciación en una dirección utilizando el cebador universal M13F. Los clones del espaciador entre H3 y H4 fueron secuenciados en las dos direcciones con los cebadores universales M13. La secuenciación de los diferentes clones fue realizada por la empresa MacroGen Inc.

Las secuencias se editaron con el programa BioEdit v.7.9.0 (Hall 1999). El alineamiento se realizó utilizando el programa ClustalW (Thompson et al. 1994) implementado en BioEdit.

La secuencia de aminoácidos fue deducida a partir de las secuencias de nucleótidos. La anotación de los diferentes dominios de las proteínas H3 y H4 se obtuvo, respectivamente, de las secuencias de proteínas de *Drosophila melanogaster* P02299 y P84040 depositadas en la base de datos UNIPROT.

Las distancias entre grupos de secuencias basadas en la proporción de sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) se calcularon según el modelo de Nei y Gojobori (1986) utilizando el programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Los datos de diversidad nucleotídica (π) y número efectivo de codones (ENC, Effective Number of Codons) (Wright 1990) fueron obtenidos con el programa DnaSP v. 4.20.2 (Rozas et al. 2003). El índice ENC fue utilizado para analizar la preferencia de uso de codones, ya que un valor alto de ENC (61) indica que todos los codones son igualmente usados, mientras que un valor bajo (20) indica que sólo un codón es el más usado de cada clase sinónima (Eirín-López et al. 2002).

Con el programa Modeltest 3.8 (Posada 2006, Posada & Crandall 1998), utilizando el criterio bayesiano de información (BIC, Bayesian Information Criterion), obtuvimos el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a las sustituciones observadas en las secuencias. Para las secuencias obtenidas de los genes de la histona H3 de *E. plorans*, el modelo seleccionado fue el TrN+G de Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993), donde las bases tienen diferente frecuencia. Las secuencias para la histona H4, sin embargo, se ajustaban mejor al modelo TrNef+G, en el cual las cuatro bases tienen igual frecuencia. Bajo ambos modelos, la proporción de sitios invariables es cero y los sitios variables siguen una distribución gamma. En la Tabla 3.6 se muestran los valores de los diferentes parámetros utilizados en cada caso.

Tabla 3.6. Modelo evolutivo seleccionado por Modeltest 3.8 utilizando el criterio bayesiano de información (BIC) para las secuencias de los genes para las histonas H3 y H4 (fragmento de 181pb).

Modelo evolutivo	Histona H3	Histona H4 181 pb
Modelo evolutivo	TrN+G	TrNef+G
Frecuencia Bases		
Frecuencia A	0,2486	0,25
Frecuencia C	0,3117	0,25
Frecuencia G	0,2789	0,25
Frecuencia T	0,1608	0,25
Modelo de Sustitución	a=c=d=f, b, e	a=c=d=f, b, e
R(a) [A-C]	1,0000	1,0000
R(b) [A-G]	2,5369	2,2134
R(c) [A-T]	1,0000	1,0000
R(d) [C-G]	1,0000	1,0000
R(e) [C-T]	7,9407	3,6208
R(f) [G-T]	1,0000	1,0000
Proporción de sitios invariables	0	0
Sitios variables: (γ) Distribución gamma	0,4935	0,2589

Los modelos seleccionados en cada caso sirvieron para inferir la filogenia de las secuencias de los genes para las histonas H3 y H4, mediante máxima verosimilitud, utilizando el programa PAUP* versión 4.0 b10 (Swofford 2002). La robustez de los árboles obtenidos fue calculada por bootstrapping con 100 replicas. Como grupo externo utilizamos las secuencias de los genes para las histonas H3 y H4 de *Locusta migratoria*, que también hemos obtenido de la amplificación con DNA genómico de machos adultos, tal y como se ha descrito anteriormente.

Los amplificadores correspondientes a los genes para las histonas H3 y H4, así como el espaciador que separa ambos genes, fueron marcados con rhodamina-11-dUTP y/o fluorogreen-11-dUTP mediante *nick translation*. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) fue realizada sobre preparaciones de embriones de la población de Torrox portadores de un cromosoma B₂₄, siguiendo el protocolo descrito por Cabrero et al. (2003c).

Resultados

Genes para la histona H3

Utilizando los cebadores específicos para amplificar los genes de la histona H3 obtuvimos una banda de 400 pb, tanto a partir de gDNA como en los procedentes de microdissección (μ DNA X y μ DNA B) (véase Fig. 3.22). Una vez secuenciados estos amplificados, y confirmada su similitud con los genes para H3 depositados en las bases de datos, las bandas fueron clonadas y se seleccionaron 8-10 clones de cada tipo de DNA para su posterior secuenciación.

El gen de la histona H3 tiene una longitud de 405 pb, que codifican los 135 aminoácidos que conforman la estructura primaria de la proteína. La estructura secundaria de la histona está determinada por las colas terminales y un dominio central de plegamiento formado por cuatro hélices alfa y una lámina beta, según la secuencia de la proteína de la histona H3 de *D. melanogaster* (P02299). Con los cebadores utilizados hemos conseguido amplificar un fragmento de 370 pb, que corresponde al dominio amino terminal y parte del dominio de plegamiento de la proteína. Los cebadores no amplifican ni la última de las hélices ni el dominio carboxilo terminal.

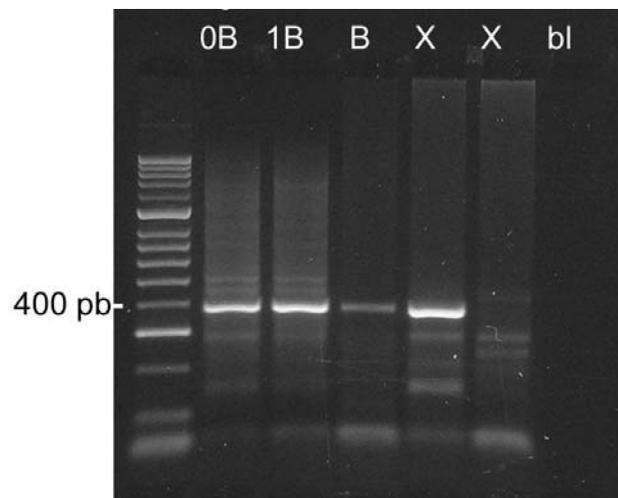


Figura 3.22. Gel de agarosa donde se observa la banda de 400 pb, correspondiente al gen de la histona H3, en el DNA genómico de machos adultos del saltamontes *E. plorans* de la población de Torrox, con y sin cromosoma B, y en el DNA obtenido de la microdissección del cromosoma X y del cromosoma B₂₄.

En la Tabla 3.7 se puede observar que las secuencias amplificadas a partir de los cromosomas X y B₂₄ son las que presentan mayor diversidad nucleotídica (π), mientras que las obtenidas de las muestras de DNA genómico son menos diversas. Las secuencias amplificadas del cromosoma X son las que presentan mayor diversidad nucleotídica en el dominio N-terminal, mientras que las secuencias obtenidas del cromosoma B son las más diversas en el dominio de plegamiento. El mayor número de secuencias no funcionales, tanto por la aparición de mutaciones de STOP como de cambio de fase (principalmente deleciones de un nucleótido), se encuentran en el cromosoma B₂₄, no apareciendo ningún pseudogén en las secuencias analizadas del cromosoma X.

Tabla 3.7. Variación nucleotídica de las secuencias de los genes de la histona H3 presente en los autosomas, en el cromosoma X y en el cromosoma B₂₄ de *E. plorans*.

Regiones	# seq	# seq no func.	Sitios variables	mutación	Haplotipos	π	K
*H3							
gDNA 0B	10	3	13	14	8	0,00875	3,24444
gDNA 1B	8	3	5	6	7	0,00597	2,21429
μ DNA X	9	0	12	13	8	0,01010	3,77778
μ DNA B	8	5	12	13	8	0,01127	4,21429
H3 N-terminal							
gDNA 0B	10		3	4	5	0,00819	1,08889
gDNA 1B	8		1	2	3	0,00541	0,71429
μ DNA X	9		6	7	7	0,01317	1,77778
μ DNA B	8		3	4	6	0,01111	1,50000
H3 Dominio Central							
gDNA 0B	10		10	10	6	0,00906	2,15556
gDNA 1B	8		4	4	6	0,00628	1,50000
μ DNA X	9		6	6	7	0,00837	2,00000
μ DNA B	8		9	9	6	0,01136	2,71429

* Total de la secuencia
 π , diversidad nucleotídica
 K , número medio de sustituciones

La mayoría de las sustituciones observadas en las secuencias de nucleótidos corresponden a sustituciones sinónimas (véase Tabla 3.8), siendo menor el número de sustituciones no sinónimas. No se observaron diferencias claras en el número de sustituciones entre los dos dominios analizados de la histona H3.

En general, las secuencias presentes en el cromosoma X son las que tienen mayor número de sustituciones, aunque la mayoría de ellas son sinónimas y no tienen efecto en la secuencia de aminoácidos (véase Alineamiento 4a, b en el Anexo). Sin embargo, en el dominio de plegamiento, las secuencias del cromosoma B₂₄ presentan un mayor número de sustituciones no sinónimas que el resto de secuencias. Estas sustituciones afectan a la secuencia de aminoácidos y posiblemente a la funcionalidad de estas secuencias (Alineamiento 4a, b).

La divergencia observada entre las secuencias amplificadas a partir del DNA genómico de *E. plorans* y del cromosoma B₂₄ a nivel de nucleótidos, no es muy diferente a la observada entre el DNA genómico y el cromosoma X (Tabla 3.9). Sin embargo, cuando los análisis se hacen a nivel de codones (Tabla 3.10), las secuencias amplificadas del cromosoma X son las que presentan una mayor distancia genética con respecto a los otros tres grupos de secuencias, tanto para las distancias basadas en las sustituciones sinónimas como para las distancias basadas en las no sinónimas. Las mutaciones de STOP que aparecen en cinco de las ocho secuencias analizadas del B₂₄ contribuyen a la divergencia medida a nivel de nucleótido, pero no a las distancias basadas en codones.

Tabla 3.8. Número de sustituciones (sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N)) por sitio (sinónimo y no sinónimo, respectivamente) promediadas para cada grupo de secuencias en el caso de los genes para la histona H3.

Grupos	Proteína completa		Dominio N-Terminal		Dominio central	
	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)
gDNA 0B	0,026 (0,009)	0,003 (0,001)	0,019 (0,019)	0,002 (0,002)	0,030 (0,011)	0,004 (0,021)
gDNA 1B	0,022 (0,011)	0,001 (0,001)	0,021 (0,021)	0,000 (0,000)	0,022 (0,013)	0,001 (0,001)
μ DNA X	0,030 (0,012)	0,004 (0,021)	0,032 (0,021)	0,007 (0,004)	0,029 (0,014)	0,002 (0,002)
μ DNA B	0,021 (0,010)	0,006 (0,002)	0,020 (0,020)	0,003 (0,002)	0,021 (0,012)	0,007 (0,003)

S.E.= error estándar obtenido por el método de bootstrap con 500 replicas

Tabla 3.9. Distancias genéticas (medidas como sustituciones por sitio promediado para todas las secuencias) de los genes de la histona H3. Entre paréntesis aparece el error estándar (SE) obtenido por el método de bootstrap con 500 replicas.

Grupos	gDNA 0B	gDNA 1B	μDNA X	μDNA B
gDNA 0B	0.00915 (0.00251)			
gDNA 1B	0.00742 (0.00236)	0.00593 (0.00266)		
μDNA X	0.01179 (0.00385)	0.23605 (0.02278)	0.01010 (0.00303)	
μDNA B	0.01262 (0.00356)	0.23622 (0.02261)	0.24105 (0.02276)	0.01127 (0.0033)

Tabla 3.10. Distancia genética, sinónima (debajo de la diagonal) y no sinónima (encima de la diagonal), de las secuencias obtenidas de los genes de la histona H3. Entre paréntesis aparece el error estándar (SE) obtenido por el método de bootstrap con 500 replicas.

	gDNA 0B	gDNA 1B	μDNA X	μDNA B
H3*				
gDNA 0B	—	0,002 (0,001)	0,051 (0,015)	0,004 (0,001)
gDNA 1B	0,023 (0,010)	—	0,050 (0,015)	0,003 (0,001)
μDNA X	0,822 (0,052)	0,827 (0,052)	—	0,052 (0,015)
μDNA B	0,031 (0,013)	0,032 (0,014)	0,829 (0,051)	—
H3 N-terminal				
gDNA 0B	—	0,001 (0,001)	0,047 (0,021)	0,002 (0,002)
gDNA 1B	0,020 (0,019)	—	0,046 (0,021)	0,001 (0,001)
μDNA X	0,822 (0,079)	0,833 (0,106)	—	0,047 (0,021)
μDNA B	0,018 (0,017)	0,021 (0,020)	0,823 (0,107)	—
H3 Dominio Central				
gDNA 0B	—	0,003 (0,001)	0,052 (0,021)	0,006 (0,002)
gDNA 1B	0,025 (0,010)	—	0,052 (0,021)	0,004 (0,002)
μDNA X	0,822 (0,071)	0,824 (0,072)	—	0,055 (0,021)
μDNA B	0,038 (0,018)	0,039 (0,020)	0,833 (0,079)	—

* Total de la secuencia

El índice ENC muestra un valor bajo tanto para las secuencias de H3 procedentes de DNA genómico, putativamente funcionales y pertenecientes a secuencias localizadas en los autosomas, como para las procedentes del cromosoma B₂₄, sugiriendo una elevada preferencia codónica para estas secuencias (Tabla 3.11). En cambio, el valor obtenido para las secuencias de H3 procedentes del cromosoma X es un 50% mayor, mostrando así una menor preferencia codónica.

El árbol filogenético inferido por máxima verosimilitud, según el modelo TrN+G, pone de manifiesto la divergencia de las secuencias del cromosoma X (Fig. 3.23), que se agrupan separadamente del resto de secuencias. Las secuencias del cromosoma B₂₄ están relacionadas con las secuencias obtenidas del DNA genómico, pero agrupadas juntas y ligeramente separadas de éstas, mostrando, por tanto, una cierta divergencia con respecto a ellas. La alta homogenización de las secuencias de los genes de la histona H3 obtenidas a partir del DNA genómico, indica que posiblemente estas secuencias se encuentren bajo selección purificadora y/o cierto grado de concertación.

El hecho de no haber obtenido a partir de gDNA secuencias de H3 similares a las observadas en el cromosoma X indica que las secuencias del X deben estar en bajo número de copias y, por ello, la PCR sobre gDNA amplifica preferentemente las secuencias mayoritarias presentes en los autosomas.

Tabla 3.11. Número de codón preferente (ENC) calculado para los genes de las histonas H3 y H4.

Grupos	ENC-H3			ENC-H4	
	Proteína completa	N-Terminal	Dominio central	211 pb	181 pb
gDNA 0B	28,93	33,00	28,41	34,68	32,99
gDNA 1B	28,57	32,65	28,01	33,90	32,26
μDNA X	43,64	37,00	39,99	–	40,91
μDNA B	29,02	34,02	28,45	35,63	39,36

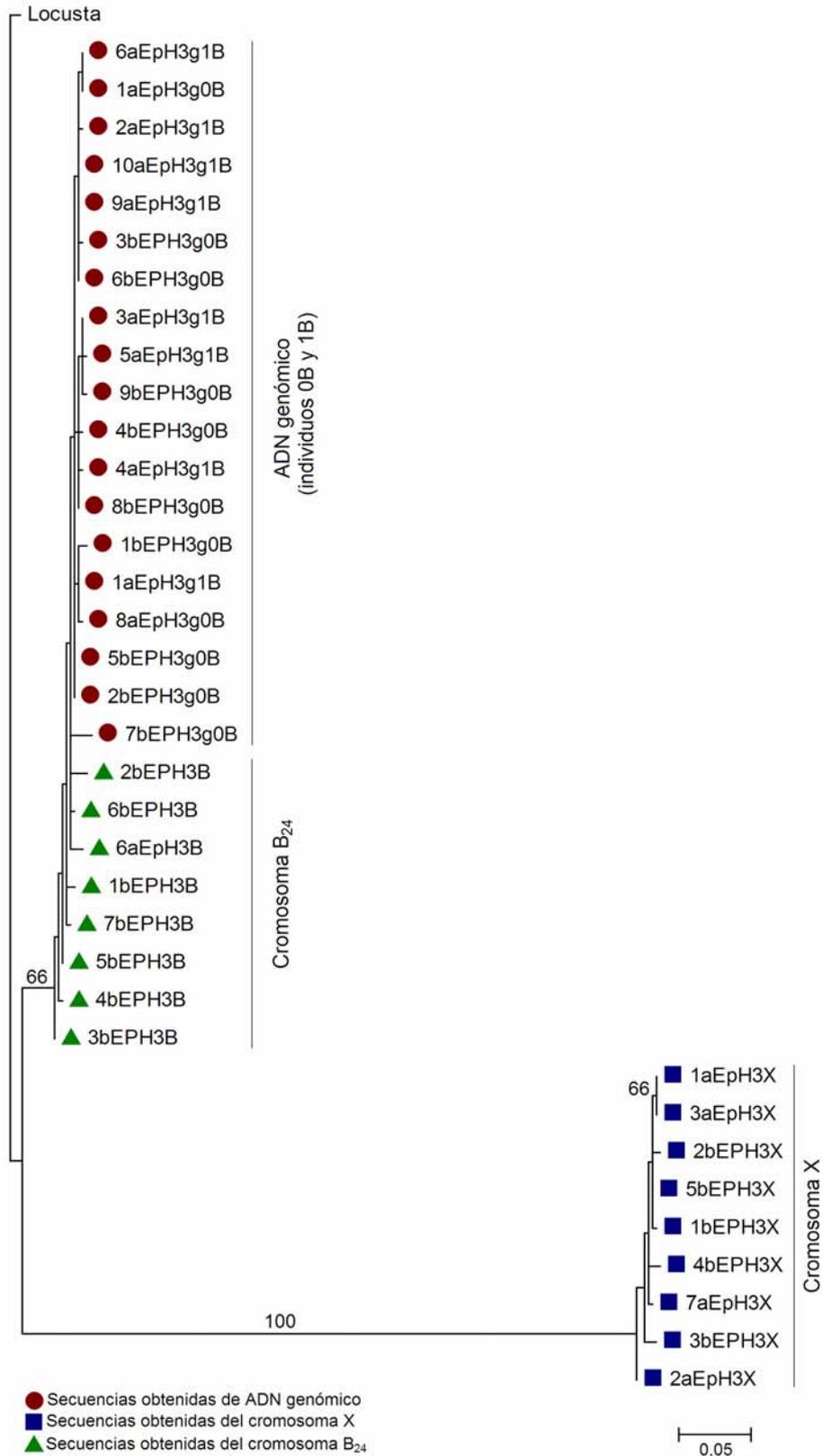


Figura 3.23. Filogenia del gen de la histona H3 de *E. plorans* obtenida por máxima verosimilitud según el modelo TrN+G. Los valores de las ramas corresponden a valores de bootstrapping superiores a 60.

Genes para la histona H4

La amplificación de los genes de la histona H4 tuvo éxito, con los dos conjuntos de cebadores, tanto en el gDNA de individuos 0B y 1B como para el μ DNA B. Sin embargo, para el μ DNA X sólo obtuvimos la banda de 181 pb (véase Fig. 3.24). Al igual que para la histona H3, los resultados en Blasta confirmaron, en todos los casos, que las bandas obtenidas eran similares a las del gen de la histona H4, por lo que procedimos a clonar los amplificados y secuenciamos 6 ó 7 clones en cada caso.

La proteína H4 está formada por 103 aminoácidos. El fragmento de nucleótidos amplificado de 181 pb corresponde a parte del dominio de plegamiento de la proteína ya que incluye solamente las cuatro primeras hélices, mientras que el de 211 pb, incluye, además, la siguiente de las hélices alfa, pero tampoco corresponde al dominio central íntegro porque no está presente el último de los plegamientos correspondientes a una lámina beta. En este caso, las colas amino y carboxilo terminales no estaban incluidas en ninguno de los fragmentos amplificados.

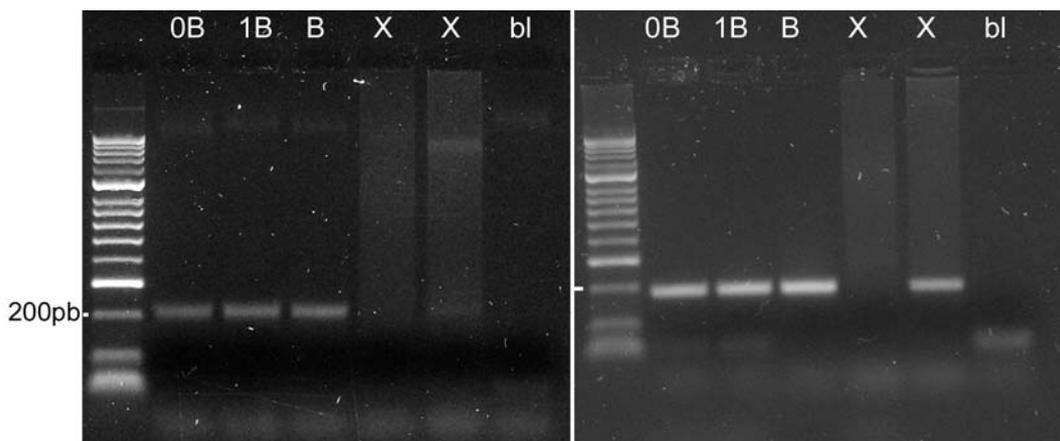


Figura 3.24. a) Gel de agarosa donde se observa la amplificación de parte del gen de la histona H4 en el gDNA de machos 0B y 1B y el μ DNA B₂₄ utilizando los cebadores H4F2s y H4F2er. El fragmento de 211 pb no se consiguió amplificar en el μ DNA X. b) Resultado de la amplificación del fragmento de 181 pb del gen de la histona H4 con los cebadores H4F2s y H4F2ir, en el gDNA y en los cromosomas X y B₂₄ de *E. plorans*.

De manera general, las secuencias de los genes para la histona H4 presentaron más sustituciones sinónimas y no sinónimas que las secuencias de los genes de la histona H3, indicando una mayor tasa evolutiva en H4 que en H3 (Tabla 3.14 y Tabla 3.13). Las secuencias de los cromosomas microdisecionados fueron las que presentaron un mayor número de sustituciones, tanto sinónimas como no sinónimas (véase Alineamiento 5a, b en el Anexo). Y dentro de este grupo, las procedentes del cromosoma B₂₄ fueron las más diversas para ambos tipos de fragmentos (Tabla 3.12), indicando su heterogeneidad. Las secuencias H4-211 pb procedentes del cromosoma B₂₄, mostraron mayor número de sustituciones que las procedente de gDNA (presumiblemente de los autosomas), aunque, al igual que en el caso de los genes de la histona H3, estas sustituciones son, en su mayoría, sinónimas. A diferencia de los genes para H3, las secuencias de H4 procedentes del cromosoma X (H4-181 pb) no fueron las que presentaron el mayor número de sustituciones, tanto sinónimas como no sinónimas, pues la mayor divergencia se observó en las secuencias obtenidas del cromosoma B₂₄ (Tabla 3.13). Las secuencias H4-181pb del X sí mostraron mayor número de sustituciones sinónimas que las secuencias procedentes del gDNA (Tabla 3.13)

Tabla 3.12. Variación nucleotídica de los dos fragmentos amplificados del gen de la histona H4

Regiones	# seq	# seq no func.	Sitios variables	mutación	Haplotipos	π	K
H4-211 pb							
gDNA 0B	7	0	15	16	7	0,02460	5,19048
gDNA 1B	7	0	5	5	6	0,00907	1,90476
μ DNA B	8	0	35	35	7	0,04367	9,21429
H4-181 pb							
gDNA 0B	10	0	5	5	6	0,00944	1,68889
gDNA 1B	8	0	5	5	6	0,01177	2,10714
μ DNA X	7	5	21	21	7	0,03680	6,47619
μ DNA B	7	1	42	61	7	0,13323	23,71429

π , diversidad nucleotídica

K , número medio de sustituciones

Tabla 3.13. Número medio de sustituciones por sitio sinónimo (d_S) y no sinónimo (d_N) en las secuencias obtenidas de los genes de la histona H4. Las primeras columnas (H4) hacen referencia al alineamiento de ambas H4, las de 211 pb y las de 181 pb

Grupos	H4		H4-211 pb		H4-181 pb	
	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)	d_S (S.E.)	d_N (S.E.)
gDNA 0B	0,046 (0,021)	0,004 (0,003)	0,061 (0,020)	0,021 (0,007)	0,022 (0,011)	0,005 (0,005)
gDNA 1B	0,051 (0,023)	0,004 (0,004)	0,034 (0,015)	0,000 (0,000)	0,035 (0,021)	0,002 (0,002)
μ DNA X	0,135 (0,025)	0,005 (0,003)	—	—	0,135 (0,025)	0,005 (0,003)
μ DNA B ₂₄	0,357 (0,031)	0,016 (0,006)	0,140 (0,019)	0,011 (0,004)	0,461 (0,041)	0,016 (0,007)

S.E.= error estándar obtenido por el método de bootstrap con 500 replicas

Tabla 3.14. Distancias genéticas, sinónimas (debajo de la diagonal) y no sinónimas (encima de la diagonal), de las secuencias obtenidas para los genes de la histona H4. Entre paréntesis aparece el error estándar (SE) obtenido mediante bootstrapping con 500 replicas.

Grupos	gDNA 0B	gDNA 1B	μ DNA X	μ DNA B
H4				
gDNA 0B	—	0,004 (0,004)	0,043 (0,017)	0,012 (0,005)
gDNA 1B	0,052 (0,022)	—	0,043 (0,017)	0,012 (0,005)
μ DNA X	0,520 (0,069)	0,522 (0,070)	—	0,046 (0,016)
μ DNA B ₂₄	0,241 (0,025)	0,252 (0,027)	0,562 (0,055)	—
H4-211 pb				
gDNA 0B	—	0,011 (0,004)	—	0,016 (0,005)
gDNA 1B	0,052 (0,019)	—	—	0,005 (0,002)
μ DNA X	—	—	—	—
μ DNA B ₂₄	0,100 (0,016)	0,092 (0,018)	—	—
H4-181 pb				
gDNA 0B	—	0,004 (0,004)	0,043 (0,017)	0,017 (0,008)
gDNA 1B	0,035 (0,017)	—	0,042 (0,017)	0,016 (0,008)
μ DNA X	0,507 (0,066)	0,511 (0,067)	—	0,046 (0,016)
μ DNA B ₂₄	0,377 (0,038)	0,398 (0,040)	0,587 (0,048)	—

Tabla 3.15. Distancias genéticas (medidas como sustituciones por sitio promediado para todas las secuencias) de los genes de la histona H4. La diagonal refleja la distancia media entre las secuencias pertenecientes a un mismo grupo. Entre paréntesis aparece el error estándar (SE) obtenido por el método de bootstrap con 500 replicas.

	gDNA 0B	gDNA 1B	μDNA X	μDNA B
H4				
gDNA 0B	0,015 (0,006)			
gDNA 1B	0,017 (0,006)	0,017 (0,007)		
DNAμX	0,017 (0,006)	0,168 (0,024)	0,040 (0,007)	
μDNA B ₂₄	0,072 (0,009)	0,075 [0,010]	0,075 (0,010)	0,106 (0,013)
H4-211 pb				
gDNA 0B	0,031 (0,007)			
gDNA 1B	0,021 (0,005)	0,009 (0,004)		
μDNA X	-	-		
μDNA B ₂₄	0,038 (0,006)	0,028 (0,005)	-	0,045 (0,007)
H4-181 pb				
gDNA 0B	0,009 (0,004)			
gDNA 1B	0,013 (0,005)	0,012 (0,005)		
DNAμX	0,163 (0,025)	0,164 (0,025)	0,040 (0,007)	
μDNA B ₂₄	0,186 (0,023)	0,116 (0,015)	0,111 (0,015)	0,133 (0,017)

Las secuencias obtenidas para los genes H4 presentaron valores más altos de ENC que las secuencias H3, posiblemente debido a la mayor variación nucleotídica encontrada en H4 (véase Tabla 3.15). Sin embargo, estos valores ENC siguen siendo bajos, lo que sugiere preferencia codónica (véase Tabla 3.11). Para las secuencias H4-181 pb obtenidas de los cromosomas X y B₂₄ se obtuvo un valor de ENC mayor que para las secuencias obtenidas de gDNA (presumiblemente derivadas de los autosomas) debido, quizás, al mayor número de sustituciones encontradas en las secuencias procedentes de los microdisecionados. El valor ENC obtenido de las secuencias H4-211 pb es similar para el gDNA y el μDNA B.

Las distancias genéticas sinónimas y no sinónimas, obtenidas al comparar los cuatro grupos de secuencias, muestran que las secuencias del cromosoma X y las secuencias del cromosoma B₂₄ divergen respecto a las secuencias obtenidas del DNA genómico (Tabla 3.14), siendo las del cromosoma X las más divergentes, tanto para las distancias sinónimas como para las no sinónimas (Tabla 3.13).

La alta divergencia de las secuencias de 181 pb pertenecientes al cromosoma X y al cromosoma B₂₄, también se pone de manifiesto por la agrupación de éstas en un clado independiente, y separado del resto de secuencias, en la filogenia obtenida por máxima verosimilitud, según el modelo TrNef+G (la filogenia se ha obtenido incluyendo solamente los 181 pb comunes a todas las secuencias del gen de la histona H4) (Fig. 3.25). Esta separación sugiere que las secuencias de 181 pb de la histona H4 de los cromosomas X y B₂₄, posiblemente sean copias no funcionales. De hecho, cinco de las siete secuencias H4-181pb del cromosoma X presentan mutaciones de cambio de fase. Las secuencias del cromosoma X también divergen de las secuencias del cromosoma B₂₄, apareciendo claramente separadas en la filogenia. El resto de secuencias pertenecientes a los autosomas, tanto de las secuencias de 181 pb como de las de 211 pb, se encuentran agrupadas juntas, aunque las secuencias de la histona H4-211 pb aparecen separadas de las de 181 pb, formando un grupo separado y homogéneo, indicando la existencia de diferencias en secuencia entre ellas y sugiriendo que se tratan de dos tipos de secuencias de genes de la histona H4 diferentes (Fig. 3.25). La principal diferencia entre estos dos tipos de secuencias se debe a la presencia, en algunas de las secuencias de la histona de 181 pb, de la sustitución de una G por una A en la posición 165 que conlleva el cambio de una Arg (aminoácido básico) por una Ser (aminoácido hidrofílico) (véase Alineamiento 5a, b en el Anexo). Las secuencias de los genes de la histona H4-211 pb del cromosoma B₂₄, no han acumulado tantas diferencias con respecto a las secuencias de los autosomas y aparecen agrupadas, junto a ellas, en el mismo clado. En el dendrograma también se observa que algunas secuencias de 181 pb de la histona H4 del cromosoma B₂₄, son similares a las secuencias de 181 pb de la histona H4 obtenidas a partir del DNA genómico.

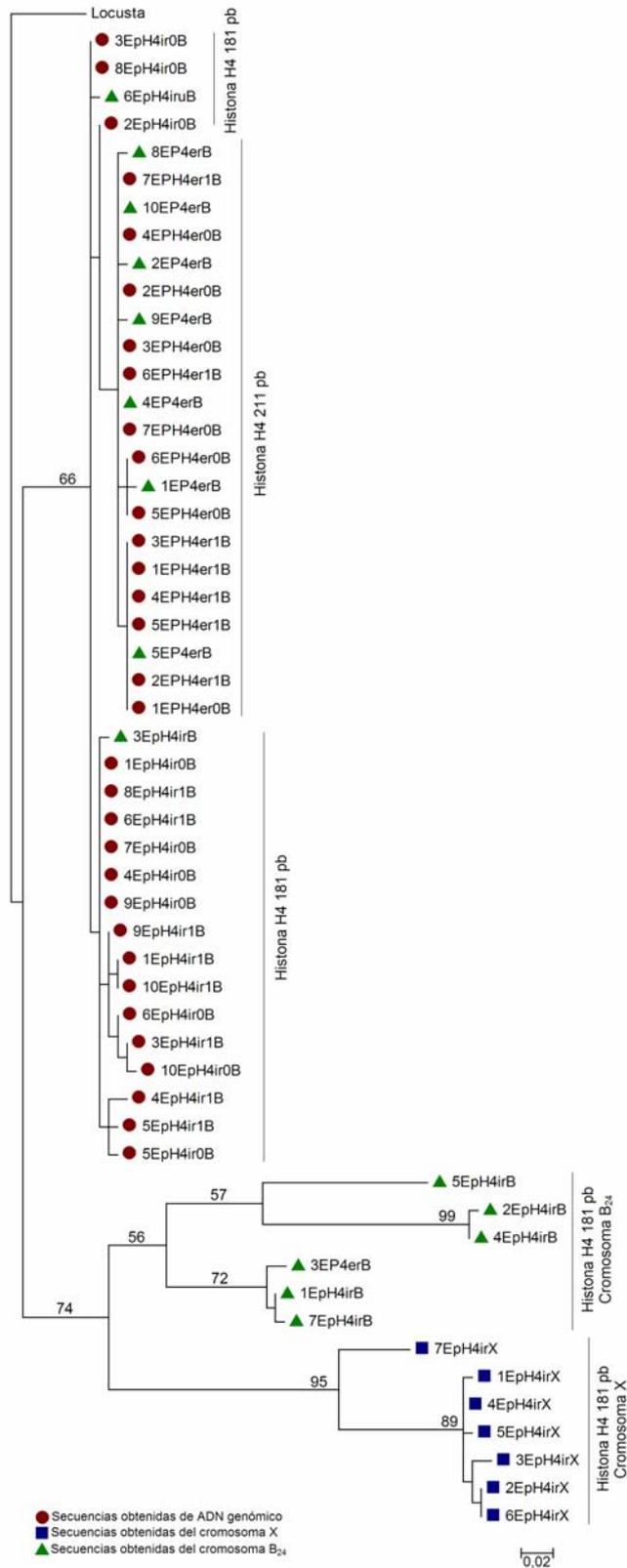


Figura 3.25. Árbol filogenético del gen de la histona H4 obtenido por máxima verosimilitud según el modelo TrNef+G. La filogenia se ha obtenido incluyendo solamente los 181 pb comunes a todas las secuencias del gen de la H4. Los valores de las ramas corresponden a valores de bootstrap superiores a 50.

Espaciador que separa los genes para las histonas H4 y H3

Para intentar obtener un marcador molecular adicional que nos sirviera para esclarecer el origen de los cromosomas B, hemos amplificado el espaciador que separa los genes de las histonas H3 y H4. Utilizando los cebadores H4F2ir y H3aR obtuvimos una banda de aproximadamente 900 pb en el DNA genómico (véase Fig. 3.26). Esta banda estaba formada por un fragmento del gen de la histona H4 de 248 pb, el espaciador, que tiene una longitud de 251 pb, y 382 pb del gen para la histona H3 (véase Fig. 3.27a). Por tanto, la disposición de los genes para H3 y H4 en el saltamontes *E. plorans* (Fig. 3.27) es similar a la que muestran en otros artrópodos (véase Fig. 3.21b) (Albig et al. 2003, Sellos et al. 1990).

Sin embargo, cuando utilizamos como molde el DNA obtenido a partir de los cromosomas X y B₂₄ (μ DNA X y μ DNA B) no obtuvimos amplificado alguno. No hay que olvidar que el DNA de los cromosomas microdisecionados X y B₂₄ está formado mayoritariamente por fragmentos de 400 pb, por lo que es difícil amplificar en ellos fragmentos de tamaño mayor a 500 pb. Solamente hemos conseguido amplificar en el DNA de estos cromosomas microdisecionados el fragmento de 950 pb correspondiente a las secuencias de los ITS de los genes ribosómicos (véase apartado 3.3), ya que en ambos cromosomas estas secuencias se encuentran en alto número de copias, con lo que no es descartable que alguno de los fragmentos de tamaño grande (que son una minoría) lo contuviera. Para intentar soslayar este problema, diseñamos cebadores específicos a partir de las secuencias nucleotídicas de las histonas H3 y H4 de 181 pb previamente amplificados a partir de X y B (Fig. 7b). Sin embargo, a pesar de haber obtenido bandas del tamaño esperado, éstas secuencias no mostraron similitud con ninguna secuencia publicada en la base de datos ni con la secuencia del espaciador amplificada a partir del DNA genómico. Esto sugiere la posibilidad de que el espaciador en estos cromosomas haya acumulado más cambios de los que hemos observado para los genes de las histonas H3 y H4 en el DNA genómico, aunque tampoco hay que descartar una disposición diferente de estos dos genes en estos cromosomas o la inexistencia de este espaciador entre los genes, y por tanto se traten de copias únicas (orfonas) presentes en estos cromosomas.

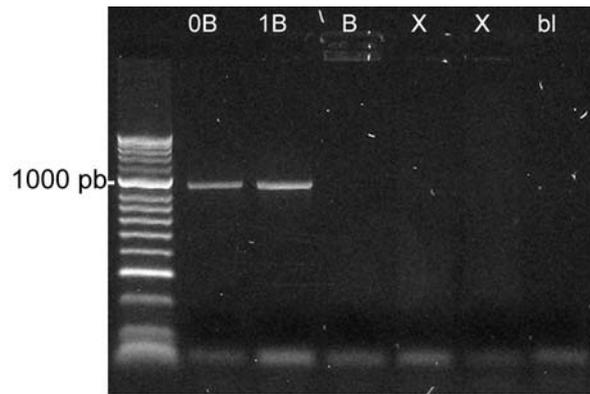


Figura 3.26. Resultado de la amplificación del espaciador que separa los genes de las histonas H4 y H3 en el DNA genómico de machos de *E. plorans* 0B y 1B de Torrox. La banda de 900 pb no se logró amplificar ni en el DNA del cromosoma X ni en el del cromosoma B₂₄.

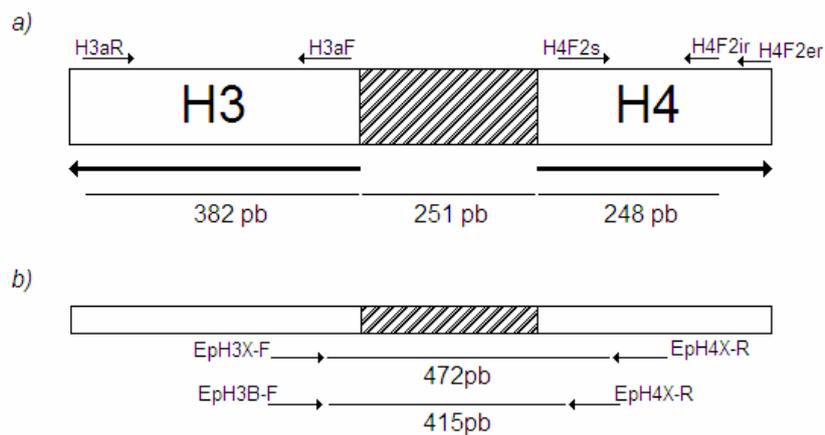


Figura 3.27. a) Disposición de los genes de las histonas H4 y H3 en el saltamontes *E. plorans*. b) Localización de los cebadores diseñados para la amplificación del espaciador que separa los genes de las histonas H4 y H3 en el DNA de los cromosomas microdisseccionados.

Las secuencias obtenidas de los espaciadores presentaban un valor de diversidad nucleotídica (π) de 0.011 (Tabla 3.16), mayor que el mismo índice en las secuencias H3 obtenidas de gDNA (0B 0.009; 1B 0.006) y menor que para H4 (gDNA 0B 0.025; 1B 0.009). Por lo tanto, el nivel de diversidad en el espaciador no parece ser muy diferente de los genes que lo flanquean.

Tabla 3.16. Variación nucleotídica de las secuencias del espaciador que separa los genes H4 y H3 amplificadas a partir de gDNA

Regiones	# seq	Sitios		Haplotipos	π	K
		variables	mutación			
Todas las secuencias	18	8	8	5	0,01092	2,68627
gDNA 0B	8	8	7	4	0,01074	2,64286
gDNA 1B	9	9	8	3	0,01651	4,11111

π , diversidad nucleotídica;

K , número medio de sustituciones

Localización cromosómica del cluster de histonas

Al realizar una doble FISH observamos la colocalización de los genes de las histonas H3 y H4 en la región distal del cromosoma L_2 (véase Fig. 3.28), concretamente en una banda cromomícina positiva, localizada en la región distal de este cromosoma (Camacho et al. 1991). No se observa señal ni en el cromosoma X ni en el cromosoma B. La hibridación realizada con la sonda del espaciador que separa ambos genes amplificadas a partir de DNA genómico, también muestra la localización de ambos genes en la región distal del cromosoma L_2 (Fig. 3.28d, e). El hecho de que no se observe señal de estas secuencias en los cromosomas X y B, pero sí amplifiquen mediante PCR, sugieren la existencia de pocas copias en ellos o su disposición dispersa.

Cuando la hibridación se realizó con exceso de sonda de histona H3, observamos la presencia de esta secuencia, además, en la región paracentromérica del cromosoma M_8 (véase Fig. 3.29). Este bloque de histonas debe estar constituido por pocas copias de modo que sólo el exceso de sonda las pone de manifiesto.

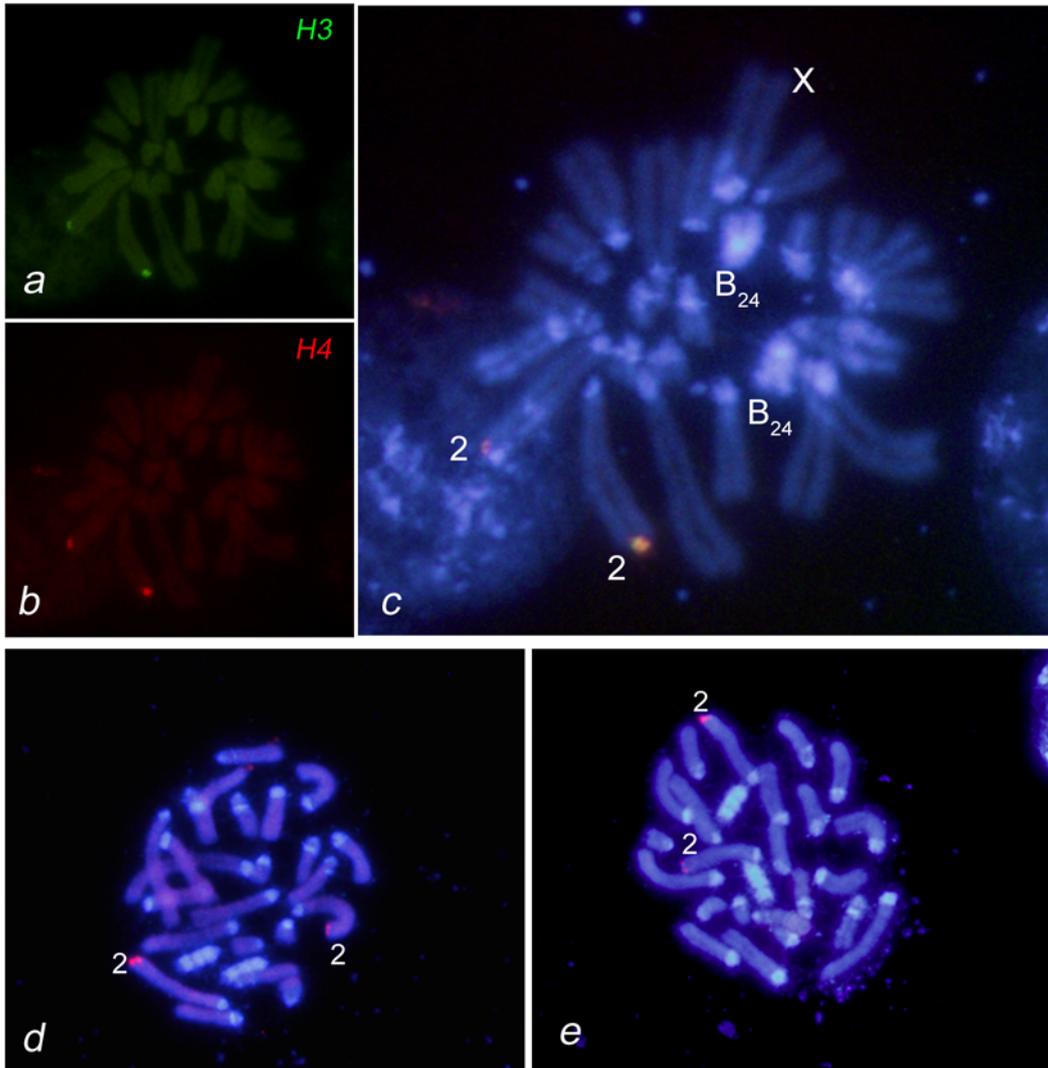


Figura 3.28. Localización de los genes de las histonas en la región distal del cromosoma L_2 en el saltamontes *E. plorans*. a, b, c) Doble FISH realizada con las sondas generadas a partir de los genes de las histonas H3 y H4. d, e) Hibridación *in situ* realizada con la secuencia del espaciador obtenida a partir del DNA genómico.

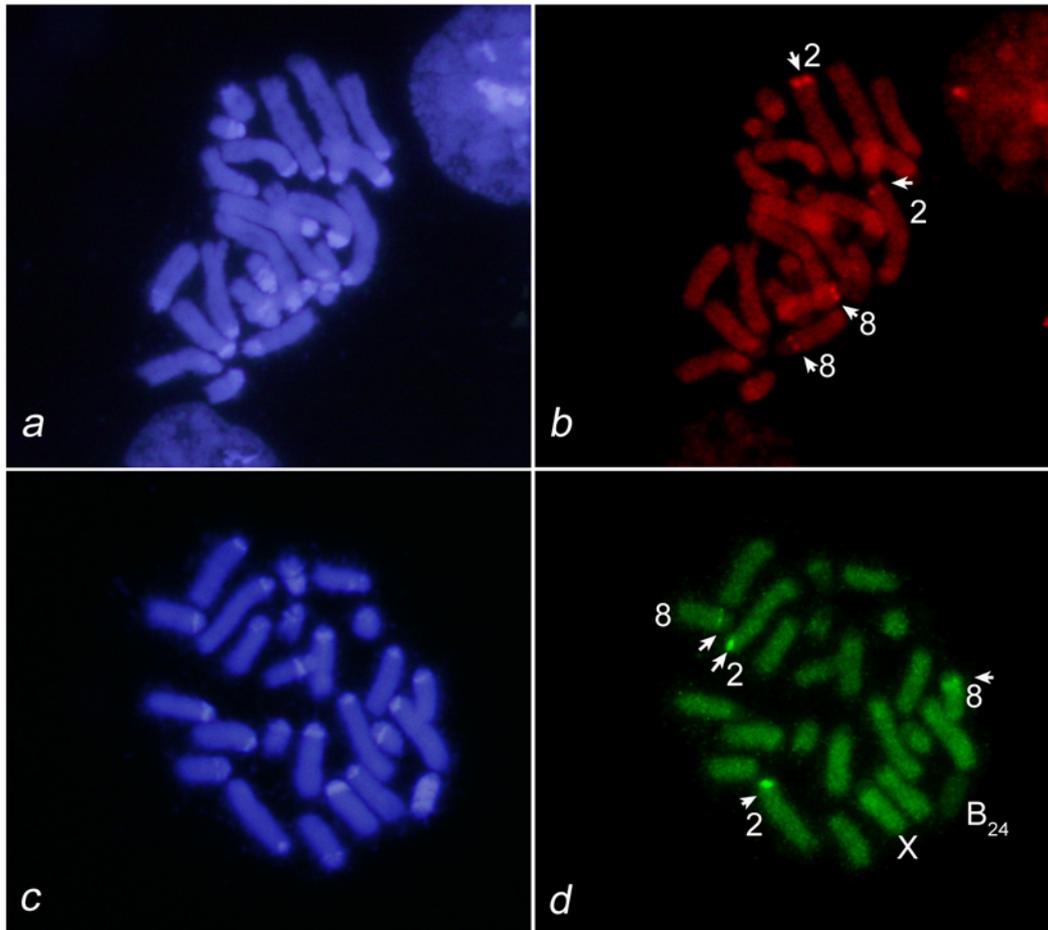


Figura 3.29. Hibridación *in situ* realizada con exceso de sonda del gen de la histona H3. En la figura a y c pueden observarse los genes de histonas en la región distal del cromosoma L_2 y en la región paracentromérica del cromosoma M_8 .

Discusión

En *E. plorans*, los genes de las histonas H3 y H4 se localizan principalmente en la región distal del cromosoma L_2 y, en bajo número de copias, en el cromosoma M_8 . Por tanto, es de esperar que las secuencias obtenidas a partir del DNA genómico sean secuencias mayoritariamente procedentes del autosoma L_2 , ya que son las más representadas, y, en menor medida, del cromosoma M_8 . La presencia del bloque de histonas en el cromosoma M_8 de *E. plorans* coincide con la localización del único bloque existente en la mayoría de las especies de saltamontes acrididos con $2n\delta = 23 + X0$ (Cabrero et al. en prensa), sugiriendo que, en *E. plorans*, las copias presentes en el cromosoma L_2 podrían proceder del cromosoma M_8 mediante recombinación ectópica o translocación. Tampoco podemos descartar que copias adicionales de estos genes (en números inferiores al límite de sensibilidad de la FISH) se encuentren, además, dispersas por el resto del genoma, como indica la presencia de este tipo de secuencias en los cromosomas X y B_{24} .

Los resultados obtenidos muestran que las copias de los genes para la histona H3 presentes en el cromosoma X son las más divergentes. Esta alta divergencia podría indicar la no funcionalidad de estas secuencias. Sin embargo, la existencia de un mayor número de sustituciones sinónimas (d_S) que de sustituciones no sinónimas (d_N) en las secuencias del cromosoma X sugiere que estas secuencias estarían sujetas a selección purificadora y, por tanto, serían funcionales. De hecho, ninguna de las secuencias procedentes del cromosoma X analizadas presentó mutaciones de STOP o cambios de fase, a diferencia de las secuencias procedentes del cromosoma B, donde más del 60% eran secuencias no funcionales.

Las secuencias H3 procedentes del cromosoma B₂₄ mostraron una menor divergencia y, de hecho, quedaron agrupadas junto a las procedentes del gDNA. Sin embargo, acumulan más mutaciones sinónimas y no sinónimas que estas últimas secuencias. Pero además, están constituidas mayoritariamente por pseudogenes. Todo parece indicar que las secuencias H3 del cromosoma B₂₄ han empezado un proceso de degeneración y "muerte", acumulando mutaciones de pérdida de función.

Las secuencias de H3 analizadas pueden proporcionar información relevante con respecto al origen de los cromosomas B en *E. plorans*. Las secuencias de los genes de la H3 del cromosoma B, presentan más similitud con las secuencias de gDNA (probablemente amplificadas a partir de los autosomas) que con las del cromosoma X, refutando así la hipótesis de López-León et al (1994), de un origen del B a partir del cromosoma X. Por otra parte, la elevada divergencia de las secuencias H3 del cromosoma X abre interesantes interrogantes con respecto a si ésta es debida a una mayor tasa de cambio en el cromosoma X, o si la presencia de estas secuencias en el X es muy antigua, dado que, en *Locusta migratoria*, hemos observado este mismo fenómeno de secuencias H3 del X muy divergentes con respecto a las presentes en el resto del genoma (Cabrero et al. en preparación).

En general, las secuencias de los genes de la histona H4 presentan una mayor variación que la observada para los genes de la histona H3 y, al igual que para este último caso, son las secuencias del cromosoma X y del cromosoma B₂₄ las más variables. La mayor diversidad nucleotídica y divergencia observada (tanto en base a mutaciones sinónimas como no sinónimas) entre las secuencias de estos cromosomas con respecto a la de los autosomas, apoyan la idea de una evolución independiente de estas secuencias respecto a las de los autosomas. Así, en el genoma de *E. plorans* parecen coexistir tres tipos diferentes de secuencias para la histona H4, que se han conseguido poner de manifiesto al utilizar parejas de cebadores diferentes. Por un lado, un grupo muy homogéneo formado por las secuencias amplificadas de gDNA (putativamente autosómicas) y las H4-211pb del cromosoma B, por otro las secuencias H4-181 pb de cromosoma B y, finalmente, las secuencias H4-181 pb del cromosoma X. El no haber obtenido secuencias H4-181 pb similares a las presentes en el cromosoma X y en el cromosoma B₂₄ a partir de DNA genómico indica que estas secuencias están en, relativamente, muy bajo número de copias.

A diferencia de lo que ocurre con las secuencias H3 del X, una alta proporción de las secuencias H4 de este cromosoma han acumulado mutaciones que las hacen no funcionales. Además, la no amplificación de secuencias H4-211 pb a partir del cromosoma X podría indicar que las secuencias sobre las que anclan los cebadores estén también mutadas. Así, las secuencias H4 presentes en el X parecen haber entrado en un proceso de degeneración y muerte.

Las secuencias H4-181 pb presentan diferencias importantes que podrían indicar una clase diferente de genes. El cambio de un aminoácido básico por uno hidrofílico encontrado en las variantes H4-180pb tal vez afecte a las propiedades de la proteína y, por tanto, a su funcionalidad, sugiriendo que estos genes podrían ser copias no funcionales. La alta divergencia obtenida para la secuencia de 181 pb, tanto del cromosoma X como del cromosoma B₂₄, apoya la idea de que las secuencias de 181 pb corresponderían a pseudogenes. La aparición de mutaciones de cambio de fase en gran parte de las secuencias H4-181 pb refuerza la anterior hipótesis. La existencia de pseudogenes de la histona H4 se ha detectado también en humanos (Pineau et al. 2005).

Algunas de estas secuencias H4-181 también podrían ser orfones, copias que se producen principalmente por eventos de duplicación que ocasionan la separación de uno de los genes del resto de la familia génica. Los *orfones* son comunes en el genoma de los vertebrados, aunque recientemente se ha detectado su presencia también en el genoma de algunos invertebrados, como por ejemplo, en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Hentschel & Birnstiel 1981) y en el molusco *Mytilus edulis* (Drabent et al. 1999, Erín-López et al. 2002).

Por otra parte, esa alta variación de las secuencias de los genes de las histonas H3 y H4 amplificadas a partir del cromosoma X y el cromosoma B₂₄, junto con la no detección del espaciador que separa estos genes en ambos cromosomas, podría sugerir la idea de que estas copias correspondan a genes de las histonas de reemplazamiento. Estos genes, también llamados genes de histonas independientes de replicación (Schümperli 1986), codifican una secuencia de proteína ligeramente diferente a la obtenida por la transcripción de las llamadas histonas dependientes de replicación. Además, estos genes se encuentran en bajo número de copias y se caracterizan por presentar intrones y dar lugar a RNA mensajeros poliadenilados. En varias especies se ha descrito la existencia de genes de reemplazamiento para las histonas, como por ejemplo, para las histonas H3 y H4 de *D. melanogaster* (Akhmanova et al. 1996). Sin embargo, la ausencia de intrones, al menos en los dominios secuenciados, en los genes de las histonas H3 y H4 de los cromosomas X y B₂₄ no apoya la idea de que se traten de genes de reemplazamiento. Sin embargo, la inexistencia del espaciador entre los genes para H3 y H4, sí apoyaría la idea de que se puedan tratar de copias únicas (orfones) presentes en estos cromosomas.

Ha sido común atribuir un modelo de evolución concertada a las secuencias de los genes para las histonas (Matsuo & Yamazaki 1989, Dover 1986). Sin

embargo, recientemente se ha propuesto que, más bien, siguen el modelo de evolución por “nacimiento y muerte” bajo una fuerte selección purificadora. Concretamente, esto se ha demostrado para los genes de la histona H3 (Rooney et al. 2002) y los genes de la histona H4 (Pointkivka et al. 2002), ya que ambos genes presentan un número de sustituciones sinónimas (d_S) mucho mayor que el número de sustituciones no sinónimas (d_N). La gran diversidad de mutaciones sinónimas, puede ser explicada si todos estos *loci* evolucionan independientemente bajo selección purificadora, acumulándose las sustituciones sinónimas continuamente mientras que las no sinónimas serían eliminadas por selección purificadora. Si los genes de las histonas estuviesen bajo evolución concertada, el número de diferencias sinónimas por sitio sinónimo (p_S) y el número de diferencias no sinónimas por sitio no sinónimo (p_N) debería ser prácticamente cero para cada par de genes, debido a que los mecanismos de homogenización deben afectar por igual a ambos sitios (Nei y Rooney 2005). El caso de los genes de las histonas de *E. plorans* parece ajustarse al modelo de “nacimiento y muerte”, ya que las secuencias analizadas mostraban una tasa de sustitución sinónima mucho mayor que la tasa de sustitución no sinónima, tanto para H3 como para H4. La selección purificadora a la que estarían sometidos estos genes explicaría la alta homogeneidad observada para las secuencias H3 y H4 obtenidas a partir del DNA genómico (presumiblemente derivadas del cromosoma L_2). Pero la existencia de pseudogenes en los cromosomas X y B indicaría una cierta relajación de la selección purificadora sobre las copias situadas en estos cromosomas. Sin embargo, no se puede descartar cierto grado de evolución concertada, puesto que las regiones espaciadoras no presentan mayores niveles de diversidad nucleotídica, como cabría esperar de regiones no sometidas a selección purificadora.

Tanto para los genes de la histona H3 como para las secuencias de 181 pb de los genes de la histona H4, las secuencias del cromosoma X son las más divergentes, mostrando las secuencias del cromosoma B_{24} más similitud con las secuencias de los autosomas (procedentes de la amplificación sobre gDNA) que con las del cromosoma X. Esto aporta algunas ideas interesantes sobre el origen del cromosoma B. En primer lugar, apoyan la idea, repetida por los restantes marcadores moleculares analizados, de que es improbable que el B hubiera derivado del cromosoma X. Los resultados obtenidos podrían sugerir la posibilidad de que el B hubiese derivado del cromosoma L_2 por fragmentación de su región distal, donde se localizan los genes para H3 y H4. No obstante, esa región autosómica no contiene el satDNA de 180 pb ni el rDNA de 45S, que son los dos componentes mayoritarios del B. Además, sería de esperar que, de haberse originado así el B, hubiera conservado un mayor número de copias de los genes H3 y H4, y no sólo unas pocas que resultan no detectables por FISH. La presencia de algunas copias de H3 y H4 en el autosoma M_8 también podría sugerir el origen del cromosoma B a partir de este autosoma. Esto explicaría la escasez de copias de H3 y H4 en el B, así como la presencia de rDNA, que también aparece en la región paracentromérica de M_8 (Cabrero et al. 2003a). No obstante, faltaría explicar la presencia del satDNA de 180 pb en el B, dado que este DNA repetitivo está ausente del autosoma M_8 (Cabrero et al. 2003a). Otras posibilidades son: i) que las copias de genes para H3 y H4 presentes en X y B

se hayan originado por recombinación ectópica con los autosomas L₂ y/o M₈ (de manera independiente, debido a la menor similitud entre las copias de X y B), en cuyo caso no serían útiles para dilucidar el origen del B, o bien, ii) que haya copias de H3 y H4, en bajo número, en otros autosomas del complemento, incluyendo el que putativamente dio origen al B, un hecho que aclararemos en futuras investigaciones.

Bibliografía

- Albig W, Warthorst U, Drabent B, Prats E, Cornudella L, Doenecke D. 2003. *Mytilus edulis* Core Histone Genes Are Organized in Two Clusters Devoid of Linker Histone Genes. *J Mol Evol* 56:597–606
- Akhmanova A, Miedema K, Hennig W. 1996. Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Letters* 388: 219–222.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* *Chromosome Research* 11: 375–381.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM. 2003c. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90: 377–381.
- Camacho JPM, Cabrero J, Viseras E, López-León MD, Navas-Castillo J, Alché JD. 1991. G banding in two species of grasshopper and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. *Genome* 34: 638–643.
- Colgan et al., 1998 D. Colgan, A. McLauchlan, G. Wilson and S. Livingston. 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 46: 419–437.
- Dover GA. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* 2: 159–165.
- Drabent B, Kim JS, Albig W, Prats E, Cornudella L, Doenecke D. 1999. *Mytilus edulis* Histone Gene Clusters Containing Only H1 Genes. *J Mol Evol* 49: 645–655.
- Eirín-López JM, AM González-Tizón, A Martínez, J Méndez. 2002. Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus spp*): possible evidence of an “orphan origin” for H1 histone genes. *J Mol Evol* 55: 272–283.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hentschel CC & Birnstiel ML. 1981. The Organization and Expression of Histone Gene Families. *Cell* 25: 301–313.
- Jenuwein T & Allis CD. 2001 Translating the Histone Code. *Science.* 10;293(5532): 1074–80.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM & Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 2: 87–92.

- Matsuo Y & Yamazaki T. 1989. Nucleotide variation and divergence in the histone multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 122: 87–97.
- Maxson R, Cohn R, Kedes L, Mohun T. 1983a. Expression and organization of histone genes. *Annu Rev Genet* 17: 239–277
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y and Matsuo Y. 2005. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Molecular Biology* 14 (6): 713–717.
- Nei M & Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418–426.
- Nei M & Rooney AP. 2005. Concerted and Birth-and Death Evolution of Multigene Families. *Annu. Rev. Genet.* 2005. 39:121–52.
- Pineau P, Henry M, Suspène R, Marchio A, Dettai A, Debruyne R, Petit T, Lécuyer A, Moisson P, Dejean A, Wain-Hobson S and Vartanian JP. 2005. A Universal Primer Set for PCR Amplification of Nuclear Histone H4 Genes from All Animal Species. *Mol. Biol. Evol.* 22(3):582–588.
- Piontkivska H, Rooney AP, Nei M. 2002. Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family. *Mol Biol Evol*;19:689–97.
- Posada D. 2006. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34: 700–703.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817–818.
- Pusarla RH & Bhargava P. 2005. Histones in functional diversification. *FEBS Journal* 272 (20): 5149–5168.
- Rooney AP, Piontkivska H, Nei M. 2002. Molecular evolution of the nontandemly repeated genes of the histone 3 multigene family. *Mol Biol Evol*;19:68–75.
- Rooney AP & Ward TJ. 2005. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Nat. Acad. Sci* 102 (14): 5084–5089.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- Rozen S & Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132: 365–86.
- Tamura K & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Tordera V, Sendra R, Perez-Ortin JE. 1993. The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia*. 15 49(9): 780-788.

Thoma F, Koller T, Klug A. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 83: 403-427.

Schümperli D. 1986. Cell-cycle regulation of histone gene expression. *Cell* 45: 471-472.

Sellos D, Krawetz SA, Dixon GH. 1990. Organization and complete nucleotide sequence of the core-histone-gene cluster of the annelid *Platynereis dumerilii*. *Eur J Biochem* 190: 21-29.

Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.

Wright F.1990. The "effective number of codons" used in a gene. *Gene* 87: 23-29.



Expresión y Efectos del cromosoma B₂₄

En relación a la expresión del cromosoma B, hemos realizado un primer estudio, analizando los patrones de acetilación de la proteína H3-K9 asociados el cromosoma B₂₄, proporcionándonos información sobre la predisposición de este cromosoma a la transcripción.

Por otra parte, hasta el momento son pocos los estudios que se han realizado sobre los posibles efectos del cromosoma B₂₄ de la población de Torrox. Para estimar estos efectos del B₂₄ en la población de Torrox hemos medido varios parámetros morfológicos, el número de espermátidas anómalas y dos componentes celulares muy relacionados con el control del estrés y la actividad metabólica total: la proteína Hsp70 y el nucleolo. También, hemos analizado mediante citometría de flujo, la morfología celular, la tasa de división celular y el nivel de apoptosis en varios tejidos.

Original Article

Cytogenet Genome Res 119:135-142 (2007)
DOI: 10.1159/000109630

Cytogenetic and
Genome Research

Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper

J. Cabrero M. Teruel F.D. Carmona R. Jiménez J.P.M. Camacho

Departamento de Genética, Universidad de Granada, Granada (Spain)

Manuscript received 29 May 2007; accepted in revised form for publication by M. Schmid, 11 June 2007.

Abstract. The facultative heterochromatic X chromosome in leptotene spermatocytes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* showed marked hypoacetylation for lysine 9 in the H3 histone (H3-K9) with no sign of histone H2AX phosphorylation. Since H3-K9 hypoacetylation precedes the meiotic appearance of phosphorylated H2AX (γ -H2AX), which marks the beginning of recombinational DNA double-strand breaks (DSBs), it seems that meiotic sex-chromosome inactivation (MSCI) in this grasshopper occurs prior to the beginning of recombination and hence synapsis (which in this species begins later than recombination). In addition, all constitutively heterochromatic chromosome regions harbouring a 180-bp tandem-repeat DNA and

rDNA (B chromosomes and pericentromeric regions of A chromosomes) were H3-K9 hypoacetylated at early leptotene even though they will synapse at subsequent stages. This also suggests that meiotic silencing in this grasshopper might be independent of synapsis. The H3-K9 hypoacetylated state of facultative and constitutive heterochromatin persisted during subsequent meiotic stages and was even apparent in round spermatids. Finally, the fact that B chromosomes are differentially hypoacetylated in testis and embryo interphase cells suggests that they might be silenced early in development and remain in this way for most (or all) life-cycle stages.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

During meiosis, sex chromosomes appear as condensed bodies which are transcriptionally inactive, as evidenced by the lack of incorporation of ^3H -uridine during meiosis both in grasshoppers (Henderson, 1963, 1964) and mice (Monesi, 1965). The transcriptional repression of sex chromosomes, known as meiotic sex-chromosome inactivation (MSCI) is also apparent by marked downregulation of several X- and Y-linked transcripts in mice (Singer-Sam et al., 1990; McCarrey and Dilworth, 1992; Odorisio et al., 1996; Mahadevaiah et al., 1998).

Sex-chromosome condensation and inactivation is mediated by the association of specific proteins, such as the checkpoint proteins BRCA1 and ATR, and by differential histone modifications. Recently, Turner et al. (2004) have shown an important role for BRCA1 in recruiting the kinase ATR to XY chromatin at the onset of MSCI and have provided compelling evidence that ATR phosphorylates H2AX and triggers MSCI. Previously, Fernández-Capetillo et al. (2003) had shown that the H2AX histone is essential for the condensation and silencing of male sex chromosomes.

The H2AX histone is phosphorylated in Ser-139 (γ -H2AX) in response to DNA damage produced by both natural and artificial causes (Zhou and Elledge, 2000; Nyberg et al., 2002). During the first meiotic prophase, endogenous DNA double-strand breaks (DSBs) occur associated with recombination (Roeder, 1997; Bishop and Zickler, 2004). In grasshoppers, Viera et al. (2004a, b) and Calvente et al. (2005) have shown that γ -H2AX, along with RAD51 recombinase and SMC3 cohesin, mark the sites of DNA DSBs at

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (CGL2006-06307) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-1664).

Request reprints from Juan Pedro M. Camacho
Departamento de Genética, Universidad de Granada
ES-18071 Granada (Spain)
telephone: +34 958 248925; fax: +34 958 244073
e-mail: jpmcamac@ugr.es

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1424-8581/07/1192-0135\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

the beginning of recombination. However, γ -H2AX also appears in the sex chromosomes at pachytene, with no relationship to recombination but presumably with chromatin condensation and transcriptional inactivation of these chromosomes during meiosis (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Viera et al., 2004a, b).

Histone modifications have been shown to be associated with gene transcriptional activation/inactivation status (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2002). One of the best understood histone modifications is acetylation. It is now generally accepted that hyperacetylated histones are associated mostly with activated genomic regions and, by contrast, deacetylation (and hypoacetylation) results mainly in repression and silencing (Grunstein, 1997; Turner, 2000). H3 and H4 histone hypoacetylation has been shown to be associated with the inactive status of one of the X chromosomes in female mammals (Boggs et al., 1996).

Recently, Turner et al. (2005) have shown that, during late pachytene in mouse, all unsynapsed chromosomal regions are transcriptionally silenced, a process in which BRCA1, ATR, and γ -H2AX play an important role. Similarly, Baarends et al. (2005) have shown that ubiquitinated histone H2A is associated with transcriptional silencing of unpaired chromatin regions in mammalian meiotic first-prophase cells. Therefore, a general mechanism for meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC) has been proposed (Schimenti, 2005; Turner et al., 2006), in resemblance to the meiotic silencing of unsynapsed DNA (MSUD) described in *Neurospora* (Shiu et al., 2001).

Here, we test whether meiotic silencing is operating for facultative (X chromosome) and constitutive (B chromosomes and pericentromeric region of A chromosomes) heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (X0/XXU sex-chromosome determination), by analysing the levels of H3-K9 hypoacetylation and H2AX phosphorylation in male pre-meiotic, meiotic and postmeiotic cells, as well as in embryo cells. As a technical control, we also analyse immunostained pachytene cells in two species of mammals: the mouse *Mus musculus* and the mole *Talpa occidentalis*. The results were consistent with meiotic silencing of facultative heterochromatin in the grasshopper *E. plorans*, but the fact that the X chromosome is already H3-K9 hypoacetylated at leptotene, prior to the appearance of phosphorylated H2AX, indicates that meiotic silencing of the X chromosome in this grasshopper occurs prior to recombination and synapsis. Constitutive heterochromatin, however, tended to be always highly condensed and poorly acetylated for the H3-K9 histone.

Materials and methods

Adult males of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* were collected at Torrox (Málaga, Spain). Embryos were obtained from laboratory cultures. No colchicine treatment was used. Squash preparations of testis follicles or embryos were performed according to Page et al. (1998) with slight modifications according to Barrionuevo et al. (2004). Grasshopper testes or embryos were fixed in freshly prepared 2% paraformaldehyde in PBS (Phosphate-buffered saline) containing 0.05%

Tween 20 for 15 min. Then, they were immersed in a small droplet of the former fixative on a glass slide and gently squashed after setting a coverslip, which was then removed after immersing the preparation into liquid nitrogen, and the slides were immediately transferred into PBS.

As a positive control for the immunostaining techniques employed in grasshopper cells, we also analysed pachytene cells in the mouse *Mus musculus*, the species in which MSCI has been demonstrated (see the Introduction section), and also in the mole *Talpa occidentalis*, a species where this subject has not been investigated. Two adult male mice of the Swiss strain were obtained from the Animal Production Unit of the University of Granada. Two adult male moles were captured alive as described previously (Barrionuevo et al., 2004) in the cultivated area around Granada (southern Spain). Captures were made in November, when these seasonally breeding animals show active spermatogenesis and are thus fully fertile. Moles were captured under permission granted by the Andalusian Environmental Council. Handling followed the guidelines and approval of the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Granada. Mouse and mole testis samples were fixed overnight in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde at pH 7.2 and processed for paraffin embedding and sectioning according to standard procedures. Sections (5–7 μ m thick) were dewaxed, rehydrated, and processed for immunostaining.

For immunofluorescence, the preparations were washed three times for 5 min in PBT (1% PBS, 0.01% Tween 20). Only mammalian tissue preparations were then treated for 5 min with 0.01 M sodium citrate in a microwave oven at 800 W. Subsequently, in all materials, a solution of 10% bovine-serum albumin (BSA) in PBT was used to perform a blocking reaction. Preparations were then submitted to a dilution of the primary antibody (monoclonal mouse antibody, Upstate, USA) raised against amino acids 134–142 of human histone H2AX (Paull et al., 2000) prepared in PBT with 1% BSA (dilution 1:600) and incubated overnight at 4°C. As previously shown by immunoblotting, this antibody recognizes a protein of similar size in both the mouse and the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Viera et al., 2004a). The slides were washed again and exposed to a 1:300 dilution of a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse secondary antibody (Upstate) for 60 min. Monoclonal rabbit antibodies for the acetylated H3 histone (Ac-Lys⁹) (Sigma, USA) were also employed to perform double immunostaining, using rhodamine-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Upstate) (dilution 1:500). The slides were then washed and stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). After a final washing in PBT, preparations were mounted in DAPI-Vectashield mounting medium and observed in an epifluorescence microscope. The images, recorded with a cooled CCD camera, were optimized for the best contrast and brightness with 'The Gimp' freeware. In all cases, a negative control was performed by adding water instead of the primary antibody.

The intensity of acetylated H3-K9 histone labelling was quantified in 33 metaphase I cells from a 2B male, 18 with a B univalent, and 15 with two B bivalents. For this purpose, DAPI and H3-K9A images of these cells were merged to facilitate X and B identification and their accurate measurement. Both X and B chromosomes are positively heteropycnotic during first meiotic prophase, but since the latter are about half the size of the X chromosome, both heteropycnotic elements are easily recognized in the DAPI images of prophase I and metaphase I cells when Bs are univalent. B-bivalents have a size similar to that of the X, but the two were distinguished in metaphase I cells by B-bivalent symmetry versus X-univalent asymmetry and by the amphitelic orientation of B-bivalents. Most B-bivalents were characteristically round. With the ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) we measured the mean intensity of red colour in the X and B chromosomes as well as one autosome bivalent (A) as an internal control. In addition, we measured background intensity in each cell and subtracted it from X, B and A measurements. The resulting X and B intensities, relative to A intensity, were separately compared in cells carrying B-univalents and cells carrying B-bivalents, by means of a Student t-test for dependent samples. In addition, a Student t-test for independent samples was performed to compare B/A labelling levels between B-univalents and B-bivalents.

Fig. 1. Fluorescence immunostaining of pachytene cells in the mouse *Mus musculus* (a-c) and the mole *Talpa occidentalis* (d-f) for phosphorylated H2AX (a and d) and acetylated H3 (b and e) histones (merged images are shown in c and f). Note that sex chromatin (arrows) is rich in phosphorylated H2AX but poor in acetylated H3. Bar represents 10 μ m.

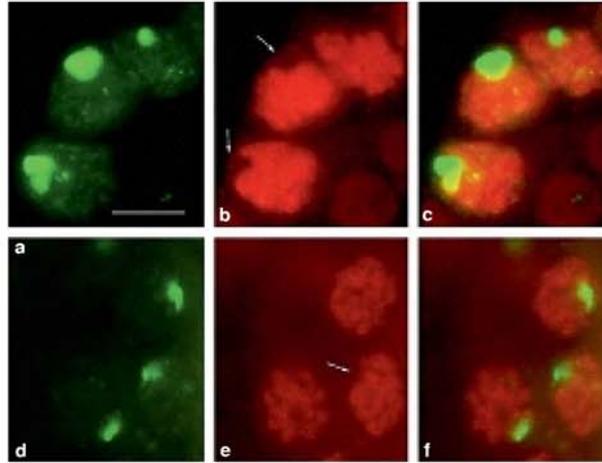
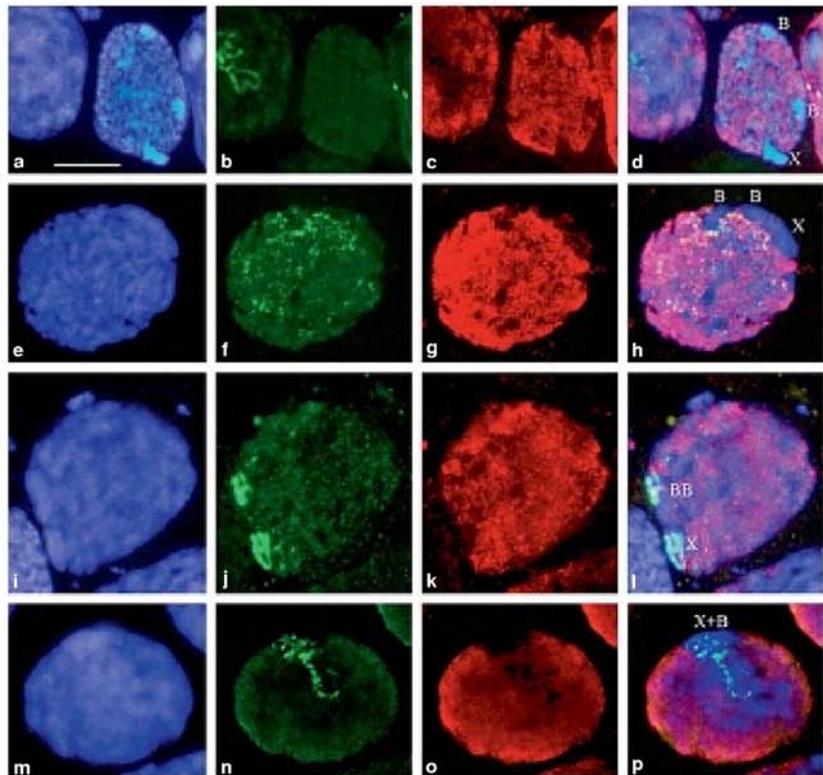


Fig. 2. Fluorescence immunostaining in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* showing DAPI (blue), H2AX phosphorylation (green) and H3 acetylation (red) during leptotene (a-d), zygotene (e-h), late zygotene (i-l) and pachytene (m-p) in 1B (m-p) and 2B (a-l) males. The photograph on the right in each row shows the result of merging DAPI, H2AX and acetylated H3. Bar represents 10 μ m.



Results

MSCI is revealed by H3-K9 hypoacetylation in two mammalian species

Immunostaining of mouse testicular tissue showed that the sex body in pachytene cells is very rich in phosphorylated H2AX histone and is markedly hypoacetylated for the H3-K9 histone (Fig. 1a-c). Pachytene cells in mole testis sections showed the same result, with the sex body remaining green after merging the H3-K9 and H2AX images (Fig. 1d-

f), indicating that it is rich in phosphorylated H2AX and poor in acetylated H3-K9. These results confirm recent findings by Namekawa et al. (2006) in mice and serve to validate our results in grasshoppers from a technical standpoint.

Condensed chromatin during meiotic first prophase in the grasshopper *E. plorans*

The X chromosome in the grasshopper *E. plorans* is condensed and positively heteropycnotic from the onset of meiosis (Fig. 2a). Many individuals carried B chromo-

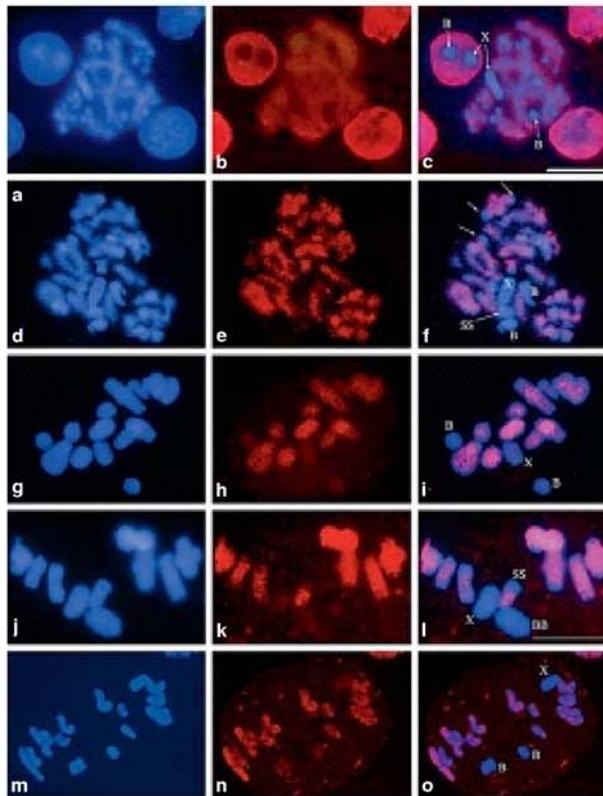


Fig. 3. Fluorescence immunostaining in *Eyrepreocnemis plorans* showing DAPI (blue) and H3 acetylation (red) during diplotene (**a-c**), diakinesis (**d-f**), metaphase I (**g-l**) and metaphase II (**m-o**) in males carrying 1B (**a-c**), 2B (**d-f**) and 3B (**m-o**). Note in **a-c** the presence of a roundspermatid with two chromocentres, the largest one corresponding to the X and the smallest to the B chromosome. Both X and B chromosomes were conspicuously H3 hypoacetylated, the same as in the adjacent diplotene cell. Note in **d-f** the presence of a supernumerary segment (SS) in the smallest autosome bivalent, which is also H3 hypoacetylated, the same as the X and the 2B chromosomes and pericentromeric regions of A chromosomes (arrows). Bar in **l** represents 10 μ m for **j-l**, and bar in **c** represents 10 μ m for the remaining photographs.

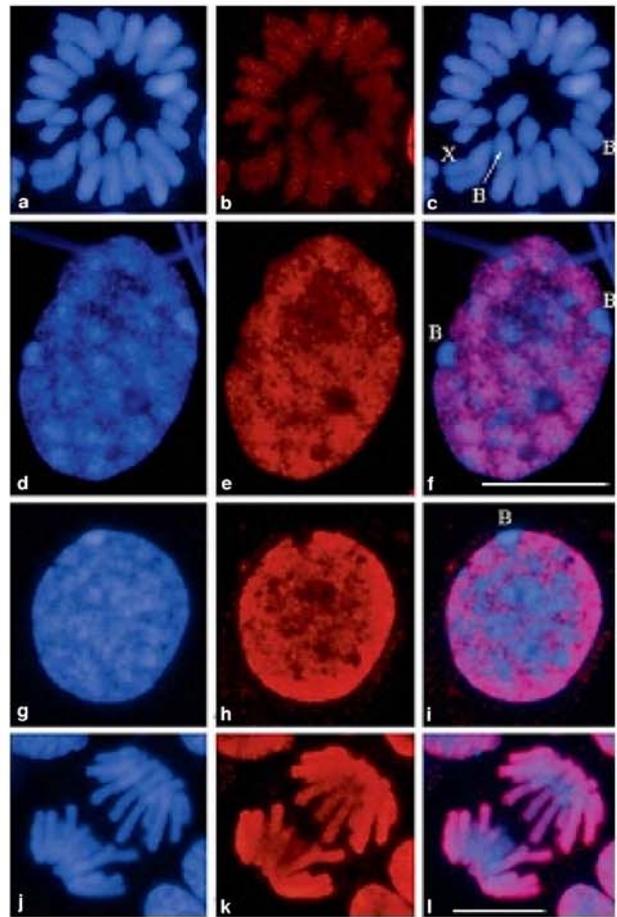


Fig. 4. Fluorescence immunostaining in *Eyrepreocnemis plorans* showing DAPI (blue) and H3 acetylation (red) at spermatogonial mitotic metaphase (**a-c**) and interphase (**d-f**) cells from a 2B male, as well as interphase (**g-i**) and mitotic anaphase (**j-l**) cells from a 1B embryo. Bar in **f** represents 10 μ m for **a-f**, and bar in **l** represents 10 μ m for **g-l**.

somes, in addition to the 22+X0 standard (A) complement. These were predominantly of the B₂₄ variant, which is a parasitic B recently arisen in this population from the neutralized B₂ variant (Zurita et al., 1998). B chromosomes show a pycnotic cycle very similar to that of the X chromosome (López-León et al., 1996), appearing as the second largest chromocentre (the largest being the X) in prophase I cells. The pericentromeric region of all A chromosomes also appeared as condensed bodies during first meiotic prophase, forming smaller chromocentres. B chromosomes and pericentromeric regions of most A chromosomes contain two kinds of repetitive DNA, i.e. a 180-bp tandem repeat DNA and ribosomal DNA (López-León et al., 1994; Cabrero et al., 2003).

Meiotic silencing in the grasshopper *E. plorans*

Leptotene cells may be unambiguously recognized on the basis of their singular morphology, showing the positively heteropycnotic X chromosome placed as it were extruding from the nuclear membrane and about perpendicular to it (Fig. 2a; see also Fig. 5a). No phosphorylated H2AX is still apparent (Fig. 2b) but the X chromosome and other condensed bodies are already differentially hypoacetylated for the H3-K9 histone (Fig. 2c, d). At zygotene (Fig. 2e-h), γ -H2AX is already apparent in the non-condensed chromatin but it is still absent from the X chromosome and other condensed bodies. At late zygotene (Fig. 2i-l), γ -H2AX is also apparent in the X and B chromosomes, whereas at pachytene, it is exclusively present in the X and B chromosomes (Fig. 2m-p). During all these stages, the X chromo-

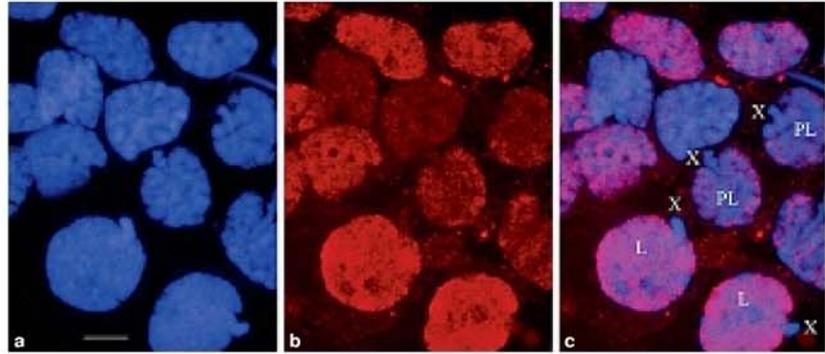


Fig. 5. (a-c) Fluorescence immunostaining in *Eyreprecnemis plorans* showing DAPI (blue) and H3 acetylation (red) at leptotene (L) and pre-leptotene (PL) cells. Note, in both kinds of cells, the X chromosome perpendicularly extruding from the nuclear mass and being differentially hypoacetylated for the H3 histone. Bar represents 10 μ m.

some and other condensed chromatin regions remain H3-K9 hypoacetylated (see Fig. 2c, g, k, o). We have also observed the X chromosome being H3-K9 hypoacetylated at leptotene in the grasshopper *Heteracris adspersa* (Cabrero et al., unpublished), suggesting that early meiotic H3-K9 hypoacetylation of the X chromosome is a general characteristic in grasshoppers.

At diplotene (Fig. 3a-c), the X and B chromosomes remained hypoacetylated for the H3-K9 histone, a fact that was also clearly apparent at diakinesis (Fig. 3d-f), metaphase I (Fig. 3g-i), metaphase II (Fig. 3m-o), and anaphase II as well as telophase II (not shown). The diakinesis cell shown in Fig. 3d-f, and the partial metaphase I cell shown in Fig. 3j-l, belonged to a male carrying 2B and being heterozygous for a heterochromatic supernumerary segment proximally located in the smallest autosome bivalent. This supernumerary segment is made of the same two kinds of repetitive DNA as B chromosomes and pericentromeric regions of A chromosomes. It is clearly apparent in these cells that the supernumerary segment and other pericentromeric heterochromatic regions are H3-K9 hypoacetylated, likewise the X and the two B chromosomes. Also, bearing in mind that condensed bodies, corresponding to X and B chromosomes, can be visualized in round spermatids and they are also hypoacetylated for the H3-K9 histone (Fig. 3a-c), we can conclude that condensed chromatin remains silenced throughout the whole meiotic process, and even postmeiotically.

To ascertain whether this characteristic is exclusively meiotic, we analysed mitosis in two different types of cells: spermatogonia and embryo cells. Spermatogonia divide through mitosis just prior to entering meiosis, so that they constitute good material to test whether H3-K9 hypoacetylated chromatin bodies observed during meiosis are silenced *de novo* at the onset of meiosis or whether they inherited this state from the spermatogonia. The analysis of spermatogonial mitotic metaphase cells indicated that all A and B chromosomes are similarly hypoacetylated for the H3-K9 histone (Fig. 4a-c). Interphase cells, however, showed much higher levels of acetylated H3-K9 and clearly showed the presence of condensed bodies that were similar in size to B chromosomes and that were differentially H3-K9 hy-

poacetylated (Fig. 4d-f). Embryo interphase cells also showed hypoacetylation for H3-K9 in B chromosomes (Fig. 4g-i). In embryo mitotic cells (Fig. 4j-l), however, the level of acetylated H3-K9 was much higher than in spermatogonial cells (compare Fig. 4b with 4k).

Finally, as shown in Fig. 5, preleptotene cells showed lower levels of H3-K9 acetylation than leptotene cells, but they already showed an H3-K9 hypoacetylated X chromosome perpendicularly extruding from the nucleus as in leptotene cells.

Does synapsis influence the level of H3-K9 acetylation of B chromosomes?

To test whether the levels of H3-K9 acetylation in B chromosomes depend on whether they are synapsed, we quantified it in males with two B chromosomes. The MSUC mechanism would predict the existence of more H3-K9 acetylation in B-bivalents than in B-univalents, because synapsed Bs might escape from silencing. To investigate this possibility, we quantified red fluorescence labelling of X and B chromosomes with respect to that of A chromosomes in metaphase I cells. X and B showed more than three-fold less labelling than did A chromosomes, and they did not differ significantly between them in metaphase I cells, where the two Bs appeared as univalents (mean X/A = 0.323, SE = 0.025; mean B/A = 0.295, SE = 0.029; $t = 0.95$, $df = 17$, $P = 0.356$). However, in cells with a B-bivalent, the Bs showed a significantly higher level of labelling (mean B/A = 0.328, SE = 0.035) than the X (mean X/A = 0.274, SE = 0.035) ($t = 2.47$, $df = 14$, $P = 0.027$), suggesting that B-bivalents are more H3-K9 acetylated than the X chromosome at these metaphase I cells. However, labelling of B-univalents and B-bivalents did not differ significantly ($t = 0.73$, $df = 31$, $P = 0.47$). Therefore, predictions of the MSUC mechanism in this respect are not clearly fulfilled in this case, although some changes in the relative labelling of X and B chromosomes were apparent when the Bs were synapsed.

Discussion

Meiotic silencing of the X chromosome

As far as H3-K9 hypoacetylation reveals chromatin silencing, our results suggest that silencing of the facultative heterochromatic X chromosome is a meiotic process whereas that of the constitutive heterochromatin (including B chromosomes, a supernumerary segment and pericentromeric heterochromatic blocks), which remains permanently condensed, is not exclusive in meiosis. X-chromosome silencing is apparent at the very onset of meiosis, since it is evident in preleptotene and leptotene cells, before the beginning of recombinational DNA DSBs evidenced by γ -H2AX and, of course, before synapsis, which in this grasshopper begins later than recombination (Viera et al., 2004a). The consistency of results between the two grasshopper species analysed (*E. plorans* and *H. adspersa*) suggests that early X chromosome meiotic silencing might be a general feature in grasshoppers.

The H3-K9 hypoacetylated X chromosome in *E. plorans* is observed during all meiotic stages and even in round spermatids, thus persisting at this state at least until the onset of spermiogenesis. Turner et al. (2006) showed that mouse sex chromosomes remain postmeiotically repressed compared to the autosomes, this being consistent with the observation by Namekawa et al. (2006) that the vast majority of X-linked genes remain repressed after meiosis. These authors also found the absence of H3 acetylation in the XY body of primary spermatocytes and the sex chromatin of round spermatids, suggesting that meiotic and postmeiotic silencing of sex chromosomes is a continuous process.

In grasshoppers and mice, there is a close association between the H2AX phosphorylated and H3-K9 hypoacetylated states in sex chromosomes at pachytene. Mahadevaiah et al. (2001) suggested that H2AX phosphorylation may be involved in chromatin reorganization in mouse sex chromosomes, and Fernández-Capetillo et al. (2003) showed that H2AX is essential for their condensation and silencing. It might seem that H2AX has the same function in grasshoppers and mammals, suggesting a highly conserved biological role for this protein. However, the fact that, in *E. plorans*, the X chromosome is condensed and H3-K9 hypoacetylated before γ -H2AX begins to appear (in the leptotene-zygotene transition), and much before this histone accumulates in the X chromosome (zygotene-pachytene), suggests that γ -H2AX might play a role different from meiotic silencing in this grasshopper, although it cannot be ruled out that this histone might be important for maintaining the silenced state.

In mice, Turner et al. (2005) showed that, during late pachytene, all unsynapsed chromosomal regions are transcriptionally silenced, so that Schimenti (2005) and Turner et al. (2006) have suggested that MSCI might be explained within the context of MSUC. Consistently, Turner et al. (2006) claimed that MSCI in mice starts as cells enter pachytene. Our present results, however, suggest that meiotic silencing might occur at the very onset of grasshopper meiosis. In mice, McCarrey et al. (1992) suggested that MSCI

begins at early meiotic first prophase, and Wang et al. (2005) showed a decline in the levels of transcript during early stages of first meiotic prophase for certain sex-linked genes. For instance, the Y-linked *Rbmy* gene showed an initial decrease in transcript levels in leptotene-zygotene spermatocytes, as did the X-linked *Usp26*, *Tkt11* and *Tex13* genes. In addition, the X-linked *Fthl17* gene showed a noticeable decrease in transcript level in preleptotene spermatocytes. This suggests that MSCI in mice might begin as early as meiotic silencing in grasshoppers, although it reaches its maximum level at pachytene.

In *Caenorhabditis elegans* and other nematodes, silencing of the X chromosome has been shown in both sexes during early meiosis (Kelly et al., 2002), although the X chromosome becomes transcriptionally active at diplotene in oocytes. In males, X chromosome silencing is associated with its chromosome condensation, in resemblance to the mammalian sex body and grasshopper X chromosome. McKee and Handel (1993) suggested that sex chromosome inactivation in the heterogametic sex is a meiotic adaptation to promote orderly segregation of sex chromosomes. In organisms with XO males, such as *C. elegans* and grasshoppers, the inactive condensation state of the X chromosome might ensure that it will reach one or the other spindle poles despite lacking a partner and a chiasma (Kelly et al., 2002). But this fails to explain why the two X chromosomes in hermaphroditic *C. elegans* and females in other nematode species are also silenced during early meiosis even when they form bivalents and chiasmata. Kelly et al. (2002) explained X chromosome silencing in early oogenesis as a requirement for proper germ-line function during synapsis and recombination events. Remarkably, they found some differences between X and autosome bivalents for crossover localization. In grasshoppers, the analysis of female meiosis is technically difficult, especially for prophase I oocytes. In those at metaphase I, however, Santos and Cano (1990) observed in *E. plorans* that autosomal and sex bivalents are indistinguishable in this respect. So, testing this hypothesis in grasshoppers is currently not affordable.

The beginning of meiotic silencing at leptotene, prior to synapsis, raises the problem of explaining how the cell can pick out and inactivate the facultative heterochromatic X chromosome without a signal indicating that it is unpaired. A possibility is the existence of a mechanism to count chromosomes, in resemblance to those operating for sex determination in *Drosophila* (Cline, 1993) and *C. elegans* (Meyer, 2000), or for X chromosome inactivation in female mammals (Thorvaldsen et al., 2006). A counting mechanism would enable cells to detect the single X chromosome at leptotene, before synapsis, and thus silence it.

Meiotic silencing of B chromosomes

In *E. plorans* males with two B chromosomes, a high frequency of B-chromosome association is observed at diplotene (82.5%), but only 43.5% of B-bivalents persist till metaphase I (Camacho et al., 1980). This is the expected result from the observation that the two Bs in 2B males may be forming a B-bivalent or two B-univalents in pachytene cells.

In these cells, the pericentromeric constitutive heterochromatic regions in all A chromosomes are the last to form a synaptonemal complex (J.L. Santos, personal communication). B chromosomes as well as pericentromeric heterochromatin are H3-K9 hypoacetylated and thus silenced despite undergoing synapsis, most likely because their silencing precedes synapsis.

B chromosomes in *E. plorans* harbour the largest rDNA cluster in the genome but it is inactive in most individuals, the exception being a single male where the B was fused to the longest autosome (Cabrero et al., 1987) and several males we have recently found in the Torrox population (Teruel et al., 2007). The inactivity of the rDNA present in most B chromosome variants in *E. plorans* is consistent with its DNA methylation (López-León et al., 1991) and H3-K9 acetylation (this paper).

In three plant species, it has been shown that euchromatin and heterochromatin in the B chromosomes are subject to histone H3 methylation at lysines 4 and 9 in a similar way as A chromosomes (Houben et al., 2003).

The silencing of constitutive heterochromatin (e.g. B chromosomes and pericentromeric regions of A chromosomes) might have something to do with RNA interference (Lippman and Martienssen, 2004). In *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis*, *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, germline-specific components of the RNAi machinery have been identified which may be directly involved in targeting heterochromatin formation (for review, see Lippman and Martienssen, 2004). More recently, Costa et al. (2006) have found evidence suggesting involvement of the miRNA pathway in the MSUC mechanism in mammals.

Gene repression and the genomic conflict between A and B chromosomes

The MSUC mechanism in *Neurospora* has been claimed to be the result of a genomic conflict between eukaryotic cells and transposons, functioning as a means of diminishing the genetic load caused by transposable elements moving during meiosis (Shiu et al., 2001). This would be expected from a system being able to detect unpaired DNA during meiotic prophase, thus allowing selection against meiotic cells containing novel DNA sequences, or established sequences in novel positions.

Turner et al. (2006) proposed that meiotic silencing might have evolved as a means of genome defence or to aid in the detection and elimination of cells with synaptic errors (Bean et al., 2004; Turner et al., 2005). Most known B chromosomes are considered genome parasites which are maintained because of a transmission rate higher than the Mendelian rate, even though they are harmful for the host genome (see Camacho, 2005 for a recent review). Therefore, parasitic B chromosomes provoke a genome conflict with A chromosomes, the latter responding by evolving a series of defence mechanisms against the parasitic Bs (Camacho et al., 1997; Frank, 2000). One of these mechanisms is selection for resistance genes, i.e. host genotypes avoiding B overtransmission. Other conceivable defence mechanisms would tend to reduce B chromosome harmful phenotypic

effects and, in this context, MSUC might have selective advantage, since meiotic silencing of B chromosomes might avoid the activation of any putative genes, whose expression would constitute the basis for their transmission advantage. A possible way for B chromosomes to escape from MSUC would be to synapse at early meiosis. In *E. plorans*, however, B chromosomes and pericentromeric constitutive heterochromatin of A chromosomes seem to be permanently silenced. It might be possible that the silencing defence mechanism in this grasshopper has permanently switched off B chromosome genes, including rRNA ones which are almost always inactive. The fact that these B chromosome genes are occasionally seen active (Cabrero et al., 1987; Teruel et al., 2007), is further evidence for the dynamic arms race between A and B chromosomes, with some Bs, or B segments, finding their way to escape silencing. It would be informative to analyse whether B chromosomes in other species show similar patterns of silencing through H3-K9 hypoacetylation. However, the fact that pericentromeric heterochromatin shows an H3-K9 hypoacetylated pattern similar to that of B chromosomes, suggests the possibility that silencing in this case is the result of a general strategy for silencing constitutive heterochromatin. The analysis of H3-K9-acetylation patterns in other B chromosome systems might shed light on this subject. For instance, in B chromosomes of interspecific origin, Bs would be expected to contain DNA scarcely represented in the hosting A chromosomes, indicating whether Bs are the direct (and perhaps exclusive) focus of silencing. In other cases (e.g. B chromosomes in rye), plants with 2B do synapse in all cells, but the B-bivalent persists to metaphase I in 87.71% of cells in a line selected for high B transmission rate (H-line), but only in 18.93% of cells in a line selected for low B transmission rate (L-line) (Jiménez et al., 2000). B meiotic pairing assures that all male meiotic products carry 1B in individuals with 2B, and this grants the operation of a powerful drive mechanism: the post-meiotic mitotic non-disjunction during pollen-grain maturation (Puertas, 2002). Since this meiotic behaviour depends on genes in the B itself (Puertas, 2002), it would be useful to know whether B-bivalents in rye are differentially silenced in the H and L lines.

Acknowledgements

We thank Federico Zurita for technical help, Juan Luis Santos for useful data on B chromosome pairing and David Nesbitt for English corrections.

References

- Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, et al: Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* 25:1041-1053 (2005).
- Barriounevo FJ, Zurita F, Burgos M, Jiménez R: Testis-like development of gonads in female moles. New insights on mammalian gonad organogenesis. *Dev Biol* 268:39-52 (2004).
- Bean CJ, Schaner CE, Kelly WG: Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 36:100-105 (2004).
- Bishop DK, Zickler D: Early decision: meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* 117:9-15 (2004).
- Boggs BA, Connors B, Sobel RE, Chinault AC, Allis CD: Reduced levels of histone H3 acetylation on the inactive X chromosome in human females. *Chromosoma* 105:303-309 (1996).
- Cabrero J, Alcázar JD, Camacho JPM: Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organizer regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29:116-121 (1987).
- Cabrero J, Perfecti F, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD: Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 11:375-381 (2003).
- Calvente A, Viera A, Page J, Parra MT, Gómez R, et al: DNA double strand breaks and homology search: inferences from a species with incomplete pairing and synapsis. *J Cell Sci* 118:2957-2963 (2005).
- Camacho JPM: B Chromosomes, in Gregory TR (ed): *The Evolution of the Genome*, pp 223-286 (Elsevier, San Diego 2005).
- Camacho JPM, Carballo AR, Cabrero J: The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). *Chromosoma* 80:163-166 (1980).
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J: Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am Nat* 149:1030-1050 (1997).
- Cline TW: The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? *Trends Genet* 9:385-390 (1993).
- Costa Y, Speed RM, Gautier P, Semple CA, Maratou K, et al: Mouse MAELSTROM - The link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and microRNA pathway? *Hum Mol Genet* 15:2324-2334 (2006).
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, et al: H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4:497-508 (2003).
- Frank SA: Polymorphism of attack and defence. *Trends Ecol Evol* 15:167-171 (2000).
- Grunstein M: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349-352 (1997).
- Henderson SA: Differential ribonucleic acid synthesis of X and autosomes during meiosis. *Nature* 200:1235-1236 (1963).
- Henderson SA: RNA synthesis during male meiosis and spermiogenesis. *Chromosoma* 15:345-366 (1964).
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I: Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 33:967-973 (2003).
- Jenuwein T, Allis C: Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080 (2001).
- Jiménez G, Manzanero S, Puertas MJ: Relationship between pachytene synapsis, metaphase I associations, and transmission of 2B and 4B chromosomes in rye. *Genome* 43:232-239 (2000).
- Kelly WG, Schaner CE, Dernburg AF, Lee MH, Kim SK, et al: X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development* 129:479-492 (2002).
- Kouzarides T: Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198-209 (2002).
- Lippman Z, Marienissen R: The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370 (2004).
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM: A nucleolar organizer region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. *Chromosoma* 100:134-138 (1991).
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM: Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87-92 (1994).
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM: Achiasmate segregation of X and B univalents in males of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* is independent of previous association. *Chromosome Res* 4:43-48 (1996).
- Mahadevaiah SK, Odrisio T, Elliott DJ, Rattigan A, Szot M, et al: Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet* 7:715-727 (1998).
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, De Boer P, et al: Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27: 271-276 (2001).
- McCarrey JR, Dilworth DD: Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 2:200-203 (1992).
- McCarrey JR, Dilworth DD, Sharp RM: Semicquantitative analysis of X-linked gene expression during spermatogenesis in the mouse: ethidium-bromide staining of RT-PCR products. *Genet Anal Tech Appl* 9:117-123 (1992).
- McKee BD, Handel MA: Sex-chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* 102: 71-80 (1993).
- Meyer GF: Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16: 247-253 (2000).
- Monesi V: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp Cell Res* 39:197-224 (1965).
- Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, et al: Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* 16:660-667 (2006).
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA: Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Ann Rev Genet* 36:617-656 (2002).
- Odrisio T, Mahadevaiah SK, McCarrey JR, Burgoyne PS: Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene *Ube1y* and of the closely related *Ube1x* shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but are repressed in pachytene spermatocytes. *Dev Biol* 180:336-343 (1996).
- Page J, Suja JA, Santos JL, Rufas J: Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res* 6:639-642 (1998).
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM: A critical role for histone H2AX in sequential recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10:886-895 (2000).
- Puertas MJ: Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 96:198-205 (2002).
- Roeder GS: Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11:2600-2621 (1997).
- Santos JL, Cano MI: Evidence of a joint control of chiasma formation in spermatocytes and oocytes of a grasshopper. *Heredity* 65:419-422 (1990).
- Schimmenti J: Synapsis or silence. *Nat Genet* 37:11-13 (2005).
- Shiu PK, Raju NB, Zickler D, Metzberg RL: Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 107:905-916 (2001).
- Singer-Sam J, Robinson MO, Bellve AR, Simon MI, Riggs AD: Measurement by quantitative PCR of changes in HPR1, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res* 18:1255-1259 (1990).
- Tenuel M, Cabrero J, Perfecti F, Camacho JPM: Nucleolar size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 15: 755-765 (2007).
- Thorvaldsen JL, Verona RI, Bartolomei MS: X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome. *Dev Biol* 298:344-353 (2006).
- Turner B: Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22:836-845 (2000).
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, et al: BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Curr Biol* 14:2135-2142 (2004).
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, et al: Silencing of synapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37:41-47 (2005).
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Ellis PJI, Mitchell MJ, Burgoyne PS: Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell* 10:521-529 (2006).
- Viera A, Santos JL, Page J, Parra MT, Calvente A, et al: DNA double-strand-break, recombination and synapsis, the timing of meiosis differs in grasshoppers and flies. *EMBO Rep* 5:385-391 (2004a).
- Viera A, Calvente A, Page J, Parra MT, Gómez R, et al: X and B chromosomes display similar meiotic characteristics in male grasshoppers. *Cytogenet Genome Res* 106:302-308 (2004b).
- Wang PJ, Page DC, McCarrey JR: Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes in the mouse. *Hum Mol Genet* 14:2911-2918 (2005).
- Zhou B, Elledge SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 40: 433-439 (2000).
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM: Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52:274-277 (1998).

Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*

Mari'a Teruel, Josefa Cabrero, Francisco Perfectti & Juan Pedro M. Camacho*

Departamento de Genética, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; Tel: +34958248925; Fax: +34958244073; E-mail: jpmcamac@ugr.es

*Correspondence

Received 9 April 2007. Received in revised form and accepted for publication by Pat Heslop-Harrison 3 May 2007

Key words: B chromosomes, *Eyprepocnemis plorans*, meiosis, nucleolus, rRNA

Abstract

The number of nucleoli and nucleolar area were measured in meiotic cells from males of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* collected in three natural populations. Number of nucleoli per cell showed no significant correlation among cells in different meiotic stages, but there was strong positive correlation for nucleolar area between leptotene and interkinesis cells in individuals from distant populations (Salobren'a in Spain, and Smir in Morocco). No correlation was, however, observed for both parameters between the meiotic stages analysed in individuals from the population of Torrox (Spain). The number of nucleoli at leptotene was about double the number at interkinesis, as expected from the double ploidy level at leptotene and the corresponding double number of rDNA clusters. Leptotene nucleolar area, however, was about fourfold that in interkinesis, presumably due to higher requirements for ribosome biogenesis in meiosis I than meiosis II. In Torrox, diplotene cells showed a lower number of nucleoli but larger nucleolar area than in leptotene cells, suggesting an increase in nucleolus size during prophase I. Significant differences were found among populations for nucleolar area but not for number of nucleoli, the smallest nucleolar area being observed in Torrox, which is the population harbouring the most parasitic B chromosome variant. No clear effects on nucleolar area or number of nucleoli were associated with the B-chromosome number. However, B-chromosome effects on the nucleolar area were apparent in the Torrox population when data were analysed with respect to a B-chromosome odd/Even pattern in leptotene and interkinesis cells. However, in diplotene cells no odd/Even pattern was observed for both nucleolar parameters, suggesting that the increase in nucleolar size from leptotene to diplotene dilutes the leptotene odd/Even pattern. The rDNA distally located in the B chromosome was associated with a nucleolus in 6.5% out of the 247 diplotene cells analysed. The implications of these findings are discussed in the context of B chromosomes as stress-causing genome parasites and the nucleolus as a sensor of stress.

Introduction

Nucleolus organizer regions (NOR) are the chromosome sites where the nucleolus is formed (McClintock 1934) through transcription of multiple copies of rDNA loci (28S, 18S and 5.8S). Ribosomes are assembled in the nucleolus from these three resulting rRNAs together with 5S rRNA and about 85 proteins

coded by other loci (for review see Pikaard 2002). Nucleolus size increases and decreases in growing and resting cells, respectively, and it forms and disperses once every cell-division cycle (Pikaard 2002). It has been shown that the size of a nucleolus is proportional to the amount of rRNA synthesized (Caspersson 1950), that NOR size (the number of rRNA cistrons) is, in general, correlated with its

expression level (Shubert & Kunzel 1990), that hypertrophy of the nucleolus is a state in which rRNA and ribosome synthesis has increased (Nakamoto et al. 2001), and that large nucleoli may correlate with cell-division activity and with cellular stages having high protein demand (Mosgoeller 2004). Therefore, the function of the nucleolus is tightly linked to cell growth and proliferation, and recent research suggests that the nucleolus also plays an important role in stress response (Rubbi & Milner 2003, Olson 2004).

A close relationship has been demonstrated between nucleolus area (visualized by silver staining) and the rate of cell proliferation: the shorter the cell-cycle time, the greater the amount of silver staining in the nucleoli, and this is especially useful to distinguish tumorous from non-tumorous cells (Derenzini et al. 1994, 2000, Trere` 2000). The size of silver-stained regions (AgNOR) is closely related to both nucleolar size and RNA polymerase I transcriptional activity (Derenzini et al. 1992, 1998, Derenzini 2000), it is a useful tool for obtaining information on the rate of ribosome biogenesis in in-situ cytohistological preparations (Derenzini 2000) and it is generally considered a sensitive marker of both nucleolar biosynthetic and cell-proliferation activities in individual cells (Busch et al. 1979, Okabe et al. 1991, Thiele & Fischer 1993, Busch 1997).

Nucleolus size is sensitive to factors such as starvation and feeding, since starvation for 24 h in rats produced a 50% decrease in the size of the nucleolus, but feeding of a high-protein diet led to a very rapid increase in nucleolar size (Lagerstedt 1949). It has been shown that the intracellular availability of certain amino acids can markedly influence the regulatory mechanisms of rRNA synthesis (Wannemacher 1972). Likewise, nucleolus size in hepatocytes from American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) enlarges in response to oestrogen in parallel to an increase in the total amount of RNA in the nucleolus (Herbener & Bendayan 1998).

Nucleolus also changes in size in response to environmental contaminants. For instance, Hudson & Ciborowski (1996) submitted larvae of the mosquito *Chironomus salinarius* to several mixtures of contaminated and non-contaminated sediment and found that the proportion of larvae with reduced nucleolus size increased linearly with each doubling of concentration of contaminated sediment. This shows

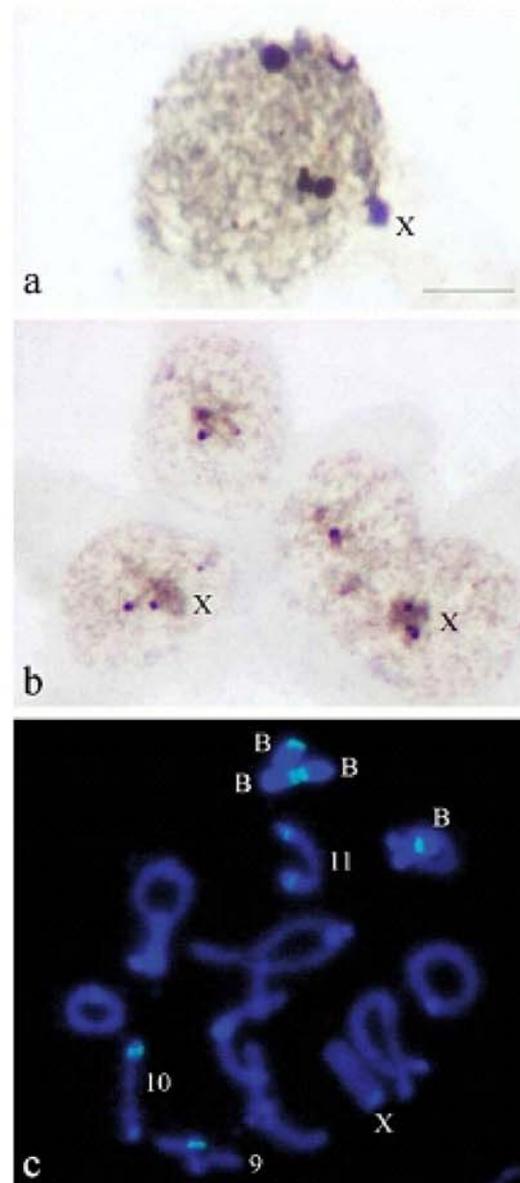


Figure 1. Silver-stained cells of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* at male meiotic leptotene (a) and interkinesis (b), and FISH of a diplotene cell with a rDNA probe (c). Scale bar = 5 μ m.

again that the nucleolus plays an important role in stress response (Olson 2004).

During meiosis, in chordates, there is vigorous nucleolar activity during prophase I, with a maximum

at pachytene (Schmid et al. 1982, 1983, Wachtler & Stahl 1993). Ribosomal RNA synthesis ceases after pachytene in spermatogenesis but continues until diplotene in oogenesis. However, it is completely stopped from metaphase I until the end of the second meiotic division (Sumner 2003).

Meiosis is exploited by B chromosomes, i.e. additional chromosomes found in natural populations of many organisms, showing non-Mendelian accumulation mechanisms (drive) and thus behaving as genome parasites (for review see Camacho et al. 2000, Camacho 2005). The grasshopper *Eyprepocnemis plorans* shows a very widespread B-chromosome polymorphism with B chromosomes being highly mutable and composed mainly of two types of repetitive DNA, i.e. a 180 bp tandem repeat DNA and ribosomal DNA (Cabrero et al. 1999). The B-chromosome polymorphism of *E. plorans* shows B chromosomes passing through stages of parasitism (with drive) and neutralization (with no drive). These stages have been identified in natural populations from both Spain (Camacho et al. 1997, Zurita et al. 1998) and Morocco (Bakkali et al. 2002).

The grasshopper *E. plorans* carries rRNA genes in the paracentromeric region of almost all chromosomes, although NORs in chromosomes 9, 10, 11 and X are large while those in the remaining A chromosomes are small. The B chromosomes actually carry the largest rDNA cluster in a distal location (López-León et al. 1994, Cabrero et al. 1999).

NOR activity appears to be influenced by B chromosome presence in populations such as Salobrenza (Granada, Spain) (Cabrero et al. 1987) and two Moroccan populations (Bakkali et al. 2001), where B-presence was associated with a higher number of

active NORs per cell. Notably, Bakkali et al. (2001) observed that secondary NORs (those corresponding to small rRNA clusters) are frequently active in Moroccan *E. plorans* populations, in contrast to Spanish populations, where they have never been found to be active (Cabrero et al. 1987, López-León et al. 1995).

All these effects refer to the number of active NORs, but the nucleolus size was not controlled. Therefore, we do not know whether these changes in the number and types of active NOR imply differences in nucleolus size and, consequently, differences in the total amount of rRNA among individuals being associated to B chromosome presence or the geographical origin of grasshoppers. To investigate this question we measured nucleolus size and number in two different meiotic stages (leptotene and interkinesis) in males from three different populations. In addition, diplotene cells from Torrox males were scored because they showed NOR activity in the B chromosome.

Materials and methods

Fifteen adult males of the grasshopper *E. plorans* were collected at Salobrenza (Granada, Spain) in 1997, Smir (Morocco) in 1997 and Torrox (Málaga, Spain) in 1999. Testes were fixed in freshly prepared 3:1 ethanol:acetic acid and stored at 4°C. Nucleoli were visualized by the silver impregnation technique developed by Rufas et al. (1982). To facilitate distinction between nucleolar material and chromatin in silver-stained squash preparations, slides were stained with 1% Giemsa for 1 min, yielding blue chromatin and brown nucleoli. Two meiotic stages

Table 1. Correlation analysis for the number of nucleoli (NN) and nucleolar area (NA) per cell between leptotene (L), interkinesis (I) and diplotene (D)

Population	Stages	N	Trait	r	p
Salobrenza	L-I	15	NN	0.183	0.514
	L-I	15	NA	0.714	0.003
Smir	L-I	15	NN	0.390	0.151
	L-I	15	NA	0.563	0.029
Torrox	L-I	15	NN	0.296	0.284
	L-I	15	NA	0.217	0.436
	L-D	15	NN	0.088	0.756
	L-D	15	NA	0.162	0.564
	D-I	15	NN	0.014	0.961
	D-I	15	NA	0.444	0.098

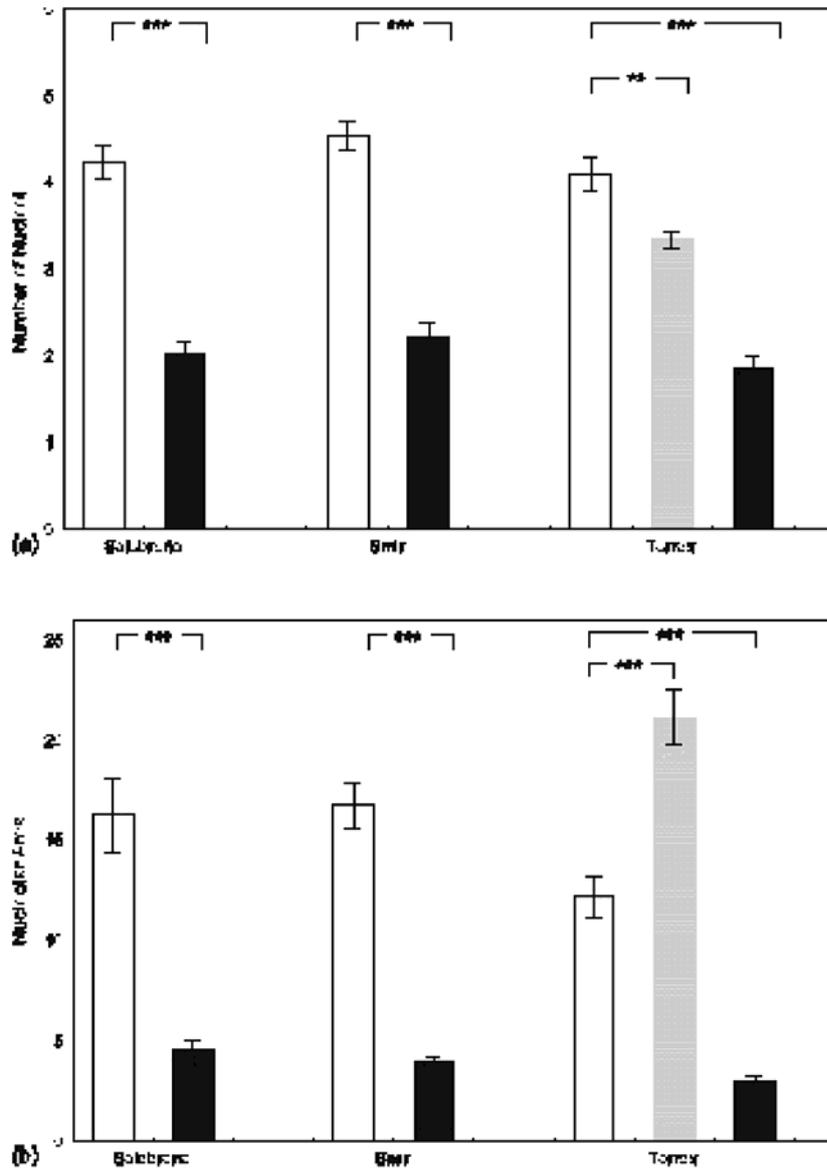


Figure 2. Comparison of the number of nucleoli (a) and nucleolar area (b) per cell between leptotene (white), interkinesis (black) and diplotene (grey). Deviation bars in the histograms indicate mean T 1 standard error. Significance in matched-pairs t-tests is indicated by two (p < 0.01) or three (p < 0.001) asterisks.

were analysed in the three populations: leptotene and interkinesis. In Torrox, diplotene cells were also analysed. Ten leptotene and interkinesis cells and 20 diplotene cells per individual were photographed at 40_ magnification with a digital camera (Olympus

DP70, capture size of 2040_1536). Sizes were transformed to $2m^2$ after calibration with a scaled slide.

The number of nucleoli (NN) per cell was scored in all types of cells and populations. The nucleolus area was measured in arbitrary units (au), with the help of a

Nucleolus size variation during meiosis in a grasshopper

759

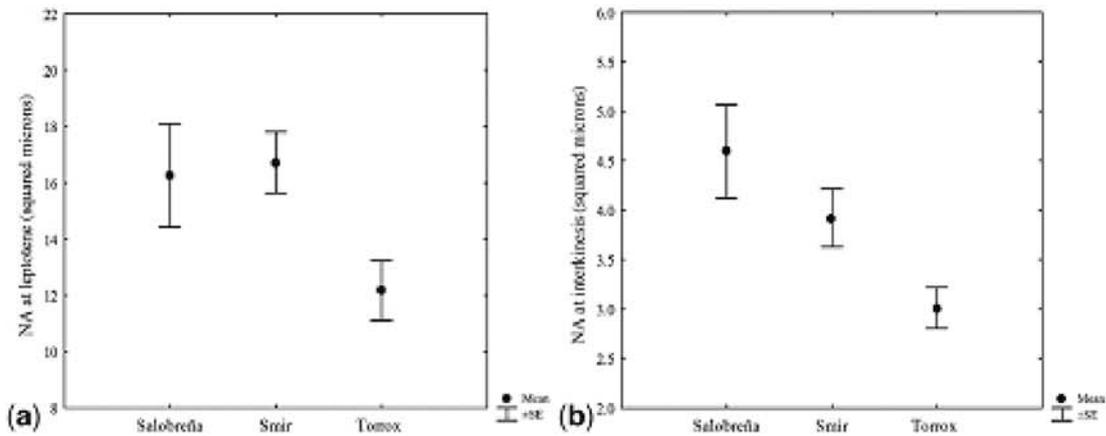


Figure 3. Population differences for nucleolar area (NA) at leptotene (a) and interkinesis (b) expressed in mm.

digital pen tablet and the ImageJ program (Rasband 1997), and then converted to 2m^2 after calculating magnification scale. The sum of all nucleolar areas in a cell (NA) was used for statistical analyses. In diplotene cells it was possible to score and measure the nucleoli attached to each chromosome bivalent (autosomes) or univalent (X and B chromosome).

For statistical analyses we calculated the individual mean per male for both NN and NA prior to applying the Student t-test, one-way ANOVA and correlation analysis.

To ascertain the measurement precision of our experimental approach we first calculated the error for nucleolus size, which was determined by repeating the measurement in a subsample of 30 cells (122 nucleoli) randomly taken from several individuals.

Following Yezerinac et al. (1992), a nested ANOVA was performed to calculate the percentage of measurement error (ME) as

$$\%ME = \frac{s_{\text{within}}^2}{s_{\text{within}}^2 + p s_{\text{among}}^2}$$

where s_{within}^2 represents the within-individual variance (variance between measurements of the same nucleolus) and s_{among}^2 the inter-individual variance (variance among different nucleoli).

To test for possible effects of squashing on area measurements, we measured nuclear area in all leptotene and interkinesis cells from Salobrença males, we inferred nuclear volume by assuming spherical shape for nuclei and compared it between these two stages. If squashing did not influence area

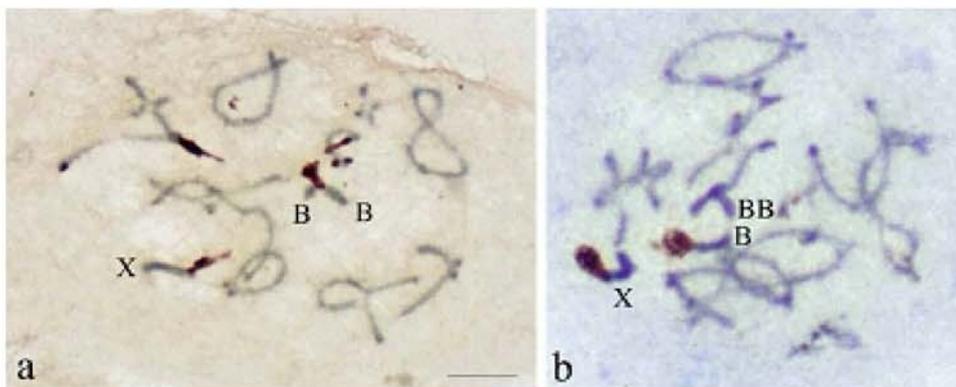


Figure 4. Examples of silver-stained diplotene cells from Torrox males carrying two (a) and three (b) B chromosomes, showing NOR activity in some B chromosomes. Scale bar = 5 mm.

Table 2. Frequency of activity of rRNA genes in the B chromosome in diplotene cells from the 13 B-carrying males collected at Torrox*

Id. no.	Bs	B-NOR		Total cells	Cells with B-NOR ⁺	B-NOR ⁺ /B
		Inactive	Active			
1	1	20	0	20	0	0
2	1	20	0	20	0	0
3	1	20	0	20	0	0
4	1	20	0	20	0	0
5	1	18	0	18	0	0
6	1	20	0	20	0	0
7	2	20	0	20	0	0
8	2	9	1	10	0.100	0.050
9	2	20	0	20	0	0
10	2	20	0	20	0	0
11	3	14	6	20	0.300	0.100
12	4	15	4	19	0.211	0.053
13	6	15	5	20	0.250	0.042
Total or mean	2.08	231	16	247	0.065	0.031

*B-NOR⁺/B in the last column indicates the proportion of B chromosomes showing NOR activity, and is calculated by dividing the proportion of cells with B-NOR⁺ by the number of Bs, since NOR activity was rarely observed in more than one B in a same cell.

measurement, we should expect a volume at leptotene double that at interkinesis. A Student t-test showed no significant differences between leptotene and doubled interkinesis volumes inferred from area measurements ($t = 0.896$, d.f. = 298, $p = 0.371$). We therefore concluded that squashing is negligible in our area measurements.

Results

Changes in nucleolar area during meiosis

The silver-staining technique employed proved to be a convenient and reliable cytochemical technique with a measurement error for nucleolar area of 1.53%, which was acceptably low. Figure 1 shows some examples of silver-stained leptotene and interkinesis cells, as well as rDNA location by FISH. The number of nucleoli per cell (NN) showed no significant correlation between leptotene and interkinesis, but nucleolar area (NA) showed a positive correlation between these two meiotic stages in two (Salobren^a and Smir) of the populations analysed (Table 1). This suggests that nucleolar area is more strictly subjected to cell control than the number of nucleoli, and that some difference exists among populations in this respect. In the Torrox population, however, both NN and NA were independent between the different meiotic stages analysed.

The two parameters measured, i.e. NN and NA, differed significantly between leptotene and interkinesis, with consistent results among populations (Figure 2). In leptotene, NN was about twice that in interkinesis, in accord with its double ploidy level. When we repeated the tests in Figure 2 but, in this case, doubling the interkinesis figures, no significant differences were found (p values 0.53, 0.73 and 0.16 for Salobren^a, Smir and Torrox, respectively), suggesting that the number of nucleoli per cell is proportional to the number of rRNA gene clusters. NA, however, was approximately fourfold larger in leptotene than in interkinesis (see Figure 2).

In the Torrox population, NN was significantly higher at leptotene than at diplotene (Figure 2), indicating that some of the nucleoli produced by the two members of a pair of homologous chromosomes at leptotene are fused after synapsis and appear as a single nucleolus at diplotene. Most importantly, NA was significantly higher at diplotene than leptotene (Figure 2), suggesting that some changes in nucleolar size do occur between leptotene and diplotene which are not solely explained by nucleolar fusion.

Variation in number of nucleoli and nucleolar area per cell among populations

One-way ANOVA showed significant differences among the three populations for NA ($F_{2,42} = 3.35$, $p = 0.045$ at leptotene; $F_{2,42} = 5.42$, $p = 0.008$ at

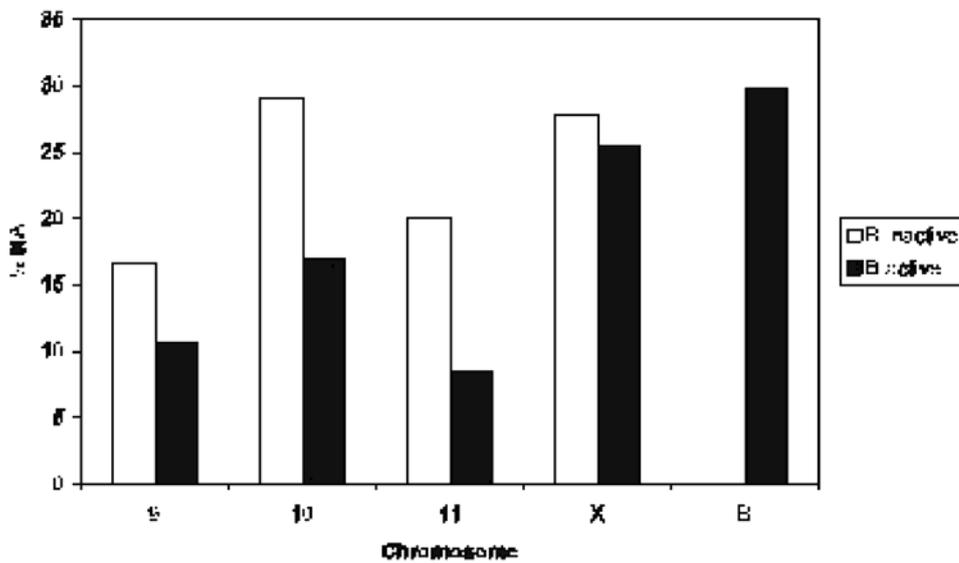


Figure 5. Relative nucleolar area (NA) associated with A chromosomes (9, 10, 11 and X) and B chromosomes in cells with the B-NOR inactive (white bars) and active (black bars), in 13 B-carrying males from Torrox. Note the decrease in nucleolar contribution by chromosomes 9, 10 and 11 when the B-NOR is active.

interkinesis) but not for NN ($F_{2,42} = 1.39$, $p = 0.261$ at leptotene; $F_{2,42} = 1.46$, $p = 0.243$ at interkinesis). Figure 3 shows that NA levels in both leptotene and interkinesis were lower in the Torrox population.

B-chromosome effects

Given the observed differences among populations, B-chromosome effects on NN and NA were separately analysed in each population. A series of one-way ANOVA tests showed no difference for either NN or NA in leptotene or interkinesis among individuals with different numbers of B chromosomes in Salobren \tilde{a} (p ranging from 0.47 to 0.97) and Torrox ($p = 0.18$ – 0.96). In Smir, however, NA at leptotene showed significant differences among males with different B number ($F = 4.19$, d.f. = 2,12, $p = 0.042$). Grouping B-carrying males according to whether they carried an odd or even B number, Student t tests showed the absence of effects in Salobren \tilde{a} ($p = 0.21$ – 0.92) and Smir ($p = 0.06$ – 0.33). In Torrox, however, males with odd B number showed significantly lower NA at leptotene ($t = 2.36$, d.f. = 11, $p = 0.038$) and higher NN at interkinesis ($t = 2.68$, d.f. = 11, $p = 0.021$).

Activity of rRNA genes in the B chromosome at Torrox

In diplotene cells from Torrox the rRNA genes located at the distal region of the B chromosome showed activity in four out of the 13 B-carrying males analysed (Figure 4). The B-NOR was active in 6.5% of diplotene cells, on average, but it was inactive in all six males with 1B and three of the four males with 2B, whereas NOR activity in at least one B was observed in all three males with three or more Bs (Table 2). On average, about 3.1% of the B chromosomes examined into diplotene cells displayed NOR activity.

One-way ANOVAs for NN and NA in diplotene cells (for total cell and chromosomes 9, 10, 11 and X, separately) comparing among males with 0B, 1B and 2B or more (grouped in a single class) showed no significant differences ($p = 0.26$ – 0.99), suggesting that B number does not influence these parameters. Likewise, no odd/Even pattern was apparent for NN or NA, albeit expressed for total cell or for each NOR-carrying chromosome (9, 10, 11, X and B) separately ($p = 0.16$ – 0.82), suggesting that the observed odd/Even pattern for NA at leptotene does not persist until diplotene.

In the 16 diplotene cells where the B chromosome displayed NOR activity, the nucleolus attached to the B measured $5.19 \mu\text{m}^2$ on average, representing about 30% of total NA in the cell, the B thus being the chromosome with the highest contribution to NA in the cell (Figure 5). Total cell NA, however, did not differ between the cells where the B-NOR was inactive (mean = 21.87, SD = 16.69) and those where it was active (mean = 18.59, SD = 7.39) ($t = 0.78$, d.f. = 246, $p = 0.44$). This means that B-NOR activity is performed at the expense of that in A chromosomes, especially chromosome no. 11 (58% decrease), chromosome 10 (42% decrease) and chromosome 9 (36% decrease), the X chromosome (9% decrease) almost not being affected by the B-NOR activity (see Figure 5).

Discussion

Nucleolus size variation during meiosis

The strong positive correlation for nucleolar area between leptotene and interkinesis suggests that it is strictly subjected to cell control. In a species such as *E. plorans*, with rRNA genes in almost all chromosomes, the number of nucleoli formed appears to be irrelevant (since no correlation was found between leptotene and interkinesis), provided that the required amount of rRNA is assured. However, an increase in the number of nucleoli could increase the speed of interchange of molecules between the nucleolus and the surrounding nuclear environments leading to higher efficiency in the nucleolar function. The fact that nucleoli can fuse together or fragment, at different meiotic stages, could also explain the lack of correlation for NN among meiotic stages.

Little is known about how nucleolar size is controlled (Tuma 2005), but recent research suggests that nucleostemin, a nucleolar protein found preferentially in stem and cancer cells, might be involved in transmitting information on the surrounding cell environment to the nucleolus, thus linking growth signals with nucleolar size (Tsai & McKay 2005, Tuma 2005). We have shown that NN and NA vary significantly through meiosis, with nucleoli being present between leptotene and diplotene, during the first meiotic division, and at interkinesis and prophase II in the second division. Differences in NN between leptotene and interkinesis

are explained simply by the double number of rDNA clusters at leptotene, in a way similar to that of the demonstrated increase in gene expression in proportion to gene dosage reported for maize ploidy series (Guo et al. 1996). However, differences in NA between these two stages are not explained by ploidy level or the number of rDNA clusters alone. The higher complexity and longer duration of meiosis I with respect to meiosis II, with the consequent greater needs for ribosome biogenesis, is a most likely explanation.

The finding that total cell nucleolar size at diplotene is significantly larger than that at leptotene indicates that some nucleolar material might be synthesized during meiotic prophase I, in close resemblance to chordates, where nucleolar activity reaches its maximum at pachytene (Schmid et al. 1982, 1983, Wachtler & Stahl 1993). However, we cannot rule out that the observed differences in NA between leptotene and diplotene might be an artefact yielded by higher squashing ease at diplotene because of the lack of a nuclear membrane which is, on the other hand, present at leptotene. This subject would need quantification of some nucleolar components in the two stages. The differences observed between leptotene and interkinesis, however, are not affected by this fact since the nuclear membrane is present at both stages.

Since diplotene is the last stage of the first meiotic division showing the presence of nucleoli, we can infer that the nucleoli present at interkinesis are the result of *de-novo* nucleolar activity at the onset of the second meiotic division, a fact that has not been reported in chordates (Sumner 2003).

Population differences in nucleolus size

Significant differences in NA were found among populations, due to lower values in the Torrox population. The absence of significant differences between specimens from Salobreña and Smir suggests that these differences might be due to reasons other than the geographical origin of the animals. A remarkable difference between Torrox and the two other populations is the type of B chromosome present and its frequency. Whereas Salobreña and Smir harbour neutralized B chromosomes (i.e. showing no drive; B_2 in Salobreña, see Camacho et al. 1997) or almost neutralized (B_1 in Smir, see Bakkali et al. 2002),

the Torrox population harbours the B_{24} chromosome, the most parasitic B variant we have so far found in *E. plorans* (i.e. showing drive and being detrimental to the host; Zurita et al. 1998). B frequency is also different among these populations, since the mean number of Bs per individual is about 0.8 in Salobren^a (Camacho et al. 1997), 0.5 in Smir (Bakkali et al. 1999) and 1.5 in Torrox (Zurita et al. 1998). It is thus clear that the Torrox population is exposed to a higher B-chromosome load, which might lead to a higher degree of stress negatively affecting nucleolar size (see below).

B-chromosome effects

We found no effects of B-chromosome number (except for NA in Smir) but there were remarkable significant effects in Torrox when analysed in relation to the oddEven pattern. In the locust *Locusta migratoria*, Camacho et al. (2004) reported oddEven effects of B chromosomes on NN in diplotene cells, with NN being significantly lower in cells with B-odd numbers. We have observed the contrary pattern at interkinesis in *E. plorans* (i.e. higher NN in B-odd), which was also contrary to that observed for NA at leptotene (i.e. higher NA in B-odd), which might indicate some differences in how NN responds to B-chromosome effects between leptotene and interkinesis. In diplotene cells from *E. plorans* males from Torrox, however, we have not found any B effect associated to the oddEven pattern for either NN or NA. This indicates that the NA increase observed from leptotene to diplotene might be involved in the disappearance of the leptotene oddEven pattern.

It is conceivable that the oddEven patterns for B-chromosome effects are caused by some kind of disturbance associated with the presence of B univalents, which are logically more frequent in individuals with odd B numbers. It is noteworthy that Guo et al. (1996) found oddEven patterns for the expression of several genes (measured by their specific mRNA level per cell) in a ploidy series in maize, from monoploid to tetraploid, including the gene for the ribosomal protein S22. The pattern was, however, contrary to the one observed in *E. plorans*, since odd ploidy numbers showed higher expression levels of the several genes, whereas odd B numbers led to a smaller nucleolar area in *E. plorans*. Perhaps the way in which ploidy and B numbers influence

gene expression is mechanistically different, but this issue requires more research.

Camacho et al. (2004) suggested that the oddEven effects of B chromosomes might be the result of the stressing effects of B chromosomes, as genome parasites. The observation of more intense effects in the Torrox population, which is suffering the higher B chromosome load (see above) is consistent with the former statement. Nucleolus size is indicative of many stress-causing factors, such as starvation (Lagerstedt 1949), hormonal changes (Herbener & Bendayan 1998) or environmental contaminants (Hudson & Ciborowski 1996), in all cases nucleoli being smaller in highly stressful conditions. This suggests that the nucleolus function is more complex than simply synthesizing rRNA and, among others functions, it is important in stress response (Olson 2004). The complexity of nucleolus function is demonstrated by the high number of endogenous proteins that can be isolated from it. Recently, Andersen et al. (2005) have characterized the flux of 489 endogenous nucleolar proteins in response to three different metabolic inhibitors affecting nucleolar morphology. The fact that these authors have demonstrated that the nucleolar proteome changes significantly over time, in response to changes in cellular growth conditions, suggests that it is a sensitive organelle for cell stress, such as that generated by B chromosomes.

NOR activity in B chromosomes

The finding of nucleolar activity in the B chromosomes in 6.5% of diplotene cells from Torrox males opens a series of noteworthy insights on B-chromosome evolution. The only previous evidence for activity of the B-chromosome rDNA was in a single male, collected at the Salobren^a population, which carried its B_2 fused to the longest autosome (Cabrero et al. 1987). The situation in Torrox is different, since the expression of the B-chromosome NOR is a recurrent phenomenon which was observed in four out of the 13 B-carrying males analysed (see Table 2). We have previously shown that B chromosomes in *E. plorans* display a high mutation rate (i.e. about 0.001 per gamete per generation; see López-Leoⁿ et al. 1993, Bakkali & Camacho 2004). The Torrox population contains the B_{24} variant, which derived from B_2 by amplification of satDNA and deletion of some rDNA and replaced B_7 between

1984 and 1992 (Zurita et al. 1998). We have recently observed some new variants emerging in this population, suggesting that B-chromosome evolution is going on. It is thus conceivable that a new B variant has recently emerged in this population which is able to express its rDNA, and this might open the possibility for a new evolutionary pathway with the B providing rRNA material and thus becoming into a beneficial parasite.

Acknowledgements

We thank Juan Luis Santos for providing the Torrox specimens, M. Bakkali for providing Smir specimens, and David Nesbitt for English corrections. This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (CGL2006Y06307) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-165). MT was supported by a fellowship (FPI) from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Andersen JS, Lam YW, Leung AK et al. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433: 77Y83.
- Bakkali M, Camacho JPM (2004) The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. III. Mutation rate of B chromosomes. *Heredity* 92: 428Y433.
- Bakkali M, Cabrero J, Lo'pez-Leo'n MD, Perfectti F, Camacho JPM (1999) The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. I. B variants and frequency. *Heredity* 83: 428Y434.
- Bakkali M, Cabrero J, Lo'pez-Leo'n MD, Perfectti F, Camacho JPM (2001) Population differences in the expression of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Protoplasma* 217: 185Y190.
- Bakkali M, Perfectti F, Camacho JPM (2002) The B-chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. II. Parasitic and neutralized B₁ chromosomes. *Heredity* 88: 14Y18.
- Busch H (1997) Nucleolar and nucleolonemal proteins of cancer cells. *J Tumor Marker Oncol* 12: 5Y68.
- Busch H, Daskal Y, Gyorky F, Smetana K (1979) Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. *Cancer Res* 39: 857Y863.
- Cabrero J, Alche' JD, Camacho JPM (1987) Effects of B chromosome on the activity of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolus organizer region on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29: 116Y121.
- Cabrero J, Lo'pez-Leo'n MD, Bakkali M, Camacho JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435Y439.
- Camacho JPM (2005) B Chromosomes. In: Gregory TR, ed., *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier, pp. 223Y286.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 163Y178.
- Camacho JPM, Shaw MW, Lo'pez-Leo'n MD, Pardo MC, Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am Nat* 149: 1030Y1050.
- Camacho JPM, Perfectti F, Teruel M, Lo'pez-Leo'n MD, Cabrero J (2004) The oddYeven effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenet Genome Res* 106: 325Y331.
- Caspersson T (1950) *Cell Growth and Cell Function, a Cytochemical Study*. New York: WW Norton.
- Derenzini M (2000) The AgNORs. *Micron* 31: 117Y120.
- Derenzini M, Farabegoli F, Trere' D (1992) Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. *J Mol Histol* 24: 951Y956.
- Derenzini M, Sirri V, Trere' D (1994) Nucleolar organizer regions in tumour cells. *Cancer J* 7: 71Y77.
- Derenzini M, Trere' D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152: 1291Y1297.
- Derenzini M, Trere' D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chicco P (2000) Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol* 191: 181Y186.
- Guo M, Davis D, Birchler JA (1996) Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142: 1349Y1355.
- Herbener GH, Bendayan M (1998) A correlated morphometric and cytochemical study on hepatocyte nucleolar size and RNA distribution during vitellogenesis. *Histochem J* 20: 194Y200.
- Hudson LA, Ciborowski JH (1996) Teratogenic and genotoxic responses of larval *Chironomus salinarius* group (Diptera: Chironomidae) to contaminated sediment. *Environ Toxicol Chem* 15: 1375Y1381.
- Lagerstedt S (1949) Cytological studies on the protein metabolism of the liver in the rat. *Acta Anat Suppl* 9: 1Y140.
- Lo'pez-Leo'n MD, Cabrero J, Pardo MC, Viseras E, Camacho JPM, Santos JL (1993) Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). *Heredity* 71: 352Y362.
- Lo'pez-Leo'n MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2: 87Y92.
- Lo'pez-Leo'n MD, Cabrero J, Camacho JPM (1995) Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome* 38: 68Y74.
- McClintock B (1934) The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 21: 294Y328.
- Mosgoeller W (2004) Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ, ed., *The Nucleolus*. New York: Kluwer, pp. 10Y20.
- Nakamoto K, Ito A, Watabe K et al. (2001) Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. *Am J Pathol* 159: 1363Y1374.
- Okabe Y, Nakamura S, Okumura H et al. (1991) The relation of argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) to the proportions of KiY67 or DNA polymerase α -reacting cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res* 11: 2031Y2035.

- Olson MOJ (2004) Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004: e10.
- Pikaard CS (2002) Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. In: Somerville CR & Meyerowitz EM, eds., *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists, pp. 1Y23.
- Rasband WS (1997) *ImageJ*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997Y2006.
- Rubbi CP, Milner J (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilisation of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 22: 6068Y6077.
- Rufas JS, Iturra P, de Souza W, Esponda P (1982) Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Arch Biol* 93: 267Y274.
- Schmid M, Lo'ser C, Schmidtke J, Engel W (1982) Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86: 149Y179.
- Schmid M, Mu'ller H, Stasch S, Engel W (1983) Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis. *Hum Genet* 64: 363Y370.
- Shubert I, Ku'nzel G (1990) Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99: 352Y359.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Oxford: Blackwell.
- Thiele J, Fischer R (1993) Bone marrow tissue and proliferation markers: results and general problems. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423: 409Y416.
- Treter D (2000) AgNOR staining and quantification. *Micron* 31: 127Y131.
- Tsai RYL, McKay RDG (2005) A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168: 179Y184.
- Tuma RS (2005) A GTP signal to the nucleolus. *J Cell Biol* 168: 172.
- Wachtler F, Stahl A (1993) The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24: 473Y505.
- Wannemacher RW (1972) Ribosomal ribonucleic acid synthesis and function as influenced by amino acid supply and stress. *Biochem J* 129: 5PY6P.
- Yezerinac SM, Loughheed SC, Handford P (1992) Measurement error and morphometric studies- Statistical power and observer experience. *Syst Biol* 41: 471Y482.
- Zurita S, Cabrero J, Lo'pez-Leo'n MD, Camacho JPM (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274Y277.

Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*

María Teruel & Josefa Cabrero & Francisco Perfectti & Juan Pedro M. Camacho

Received: 10 October 2008 / Revised: 6 November 2008 / Accepted: 12 November 2008
Springer-Verlag 2008

Abstract The B₂₄ chromosome in the Torrox population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* is recurrently attached to a nucleolus in diplotene cells, indicating the activity of its distally located ribosomal DNA (rDNA). The frequency of males expressing the B chromosome nucleolus organizer region (B-NOR) almost doubled in 4 years. The likelihood of expressing the B-NOR increased with the B number and, in males expressing it, about 20% of their cells showed a nucleolus attached to the B. When active, the B-NOR contributed more than 25% of total cell nucleolar area (NA). Within males expressing the B-NOR, total cell NA did not differ between cells showing the active or inactive B-NOR, suggesting that total cell NA is tightly regulated in this species. However, this parameter tended to increase in this population from 1999 to 2004, in parallel to the neutralization process which is taking place in this population. Finally, an analysis of A chromosome NOR interdependence for activity revealed a positive correlation among autosomes but a negative correlation between autosomes and the X chromosome, the manifestation of which depends on B-NOR activity. These results are discussed in the context of the nucleolus as a sensor of the stress caused by parasitic B chromosomes.

Introduction

The major class of ribosomal RNA (rRNA) genes (28S, 18S and 5.8S) are located at the chromosomal loci known

as nucleolus organizer regions (NORs), which are responsible for nucleolus formation and ribosome synthesis. A large part of the cell's energy is devoted to ribosome production (Warner 1999), a tightly regulated process requiring the coordinated activity of all three eukaryotic RNA polymerases: Pol I for rRNA, Pol II for ribosomal protein genes, and Pol III for 5S rRNA (Rudra and Warner 2004). The transcription of rDNA is catalyzed by RNA polymerase I in a highly controlled process (Sollner-Webb and Tower 1986), with Pol I activity regulation playing a critical role (Laferte et al. 2006). This rDNA transcription by RNA polymerase I initiates nucleolus formation (Karpen et al. 1988; Nogi et al. 1991; Santoro 2005) and ribosome production (Grummt 2003).

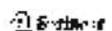
The synthesis of rRNA can be regulated by varying the number of active genes and/or transcription rate per gene (Grummt 2003). Only about half of rRNA genes are active at a given moment, suggesting that eukaryotes control the effective dosage of these genes (Lawrence and Pikaard 2004) through chromatin-mediated epigenetic modifications, such as histone acetylation and methylation or DNA methylation (Lewis and Pikaard 2001), although it is not clear what physiological signals dictate the proper rRNA gene dosage per cell (Lawrence and Pikaard 2004). Recent results in *Arabidopsis thaliana* have suggested that NORs, rather than individual rRNA genes, are the units of regulation (Lewis et al. 2004).

In mammals, a chromatin-remodeling complex (NoRC) has been discovered, which controls rDNA transcription and size and number of nucleoli (Li et al. 2005). It works by recruiting DNA-methylating and histone-modifying activities to the rDNA promoter, thus determining a repressive higher-order chromatin structure (Santoro et al. 2002; Zhou et al. 2002). Recently, it has been shown that RNA transcribed from the intergenic spacer (IGS) also

Communicated by I. Grummt.

M. Teruel · J. Cabrero · F. Perfectti · J. P. M. Camacho (*)
Departamento de Genética, Universidad de Granada,
18071 Granada, Spain
e-mail: jpmcamac@ugr.es

Published online: 02 December 2008



plays a role in rDNA silencing through the NoRC complex (Grummt 2007).

The mechanisms regulating the activation of ribosomal chromatin are less understood than those responsible for repression (Huang et al. 2006). Chromosome context appears to be important for NOR activity, as deduced from changes in the on/off activity status following chromosome rearrangements moving NORs to new locations (for a review, see Pikaard 2000).

The nucleolus is a dynamic cell compartment involved in the control of numerous cellular functions, with an amalgamation of many protein-protein and protein-nucleic acid interactions which are constantly changing (Hiscox 2007). Nucleolus is a sensor of stress caused by a variety of factors as, for instance, nutrient starvation (Langerstedt 1949), environmental contaminants (Hudson and Ciborowski 1996), or viruses (Hiscox 2007). In general, nucleoli are smaller under stressful conditions (see Olson 2004). Likewise, conditions causing stress and harming cellular metabolism (e.g., starvation, toxic lesion, cancer, and viral infection) down-regulate rDNA transcription and impair ribosome and protein synthesis (Grummt 2003). Nutrient starvation leads to significant nucleolar size reduction in both yeast and mammalian cells (Tsang et al. 2003). In yeast, this morphological change is accompanied by the release of RNA Pol I from the nucleolus, deacetylation of the histone H4, and the inhibition of rDNA transcription (Tsang et al. 2003). Therefore, there seems to be a chromatin-mediated mechanism modulating the nucleolar structure, RNA Pol I location, and RNA gene expression in response to nutrient availability (Tsang et al. 2003).

The former results clearly indicate that nucleolus size reflects the activity of rRNA genes, as was first shown by Caspersson (1950). Additional evidence comes from the observation that: (1) nucleolus size correlates with cell-division activity, being larger in stages with high protein demand (Mosgoeller 2004); (2) that nucleolus hypertrophy coincides with an increase in ribosome synthesis (Nakamoto et al. 2001); and (3) that increases in rDNA transcription result in an overall greater volume of the nucleolus relative to the nucleus (Caperta et al. 2007).

Silver staining distinctly labels RNA Pol I transcription machinery, including B23, nucleolin, UBF, and RNA Pol I subunits (Roussel et al. 1992; Roussel and Hernandez-Verdun 1994; Roussel et al. 1996). It has been shown that the degree of silver staining of the nucleoli and the rate of RNA synthesis are strongly correlated (see references in Pebusque and Seite 1981). Recently, Caperta et al. (2007) have shown that rRNA gene transcription, silver staining, and NOR decondensation are interrelated in rye. Therefore, silver staining provides a simple and dependable technique to measure nucleolus size as an indirect measure of rRNA gene transcription.

B chromosomes are supernumerary (accessory) chromosomes found in some individuals of about 15% of eukaryote species, which frequently show drive (i.e., higher transmission rate than standard (A) chromosomes) and decrease the fitness of individuals carrying them, thus behaving as genome parasites (for recent reviews, see Camacho 2004, 2005; Jones et al. 2008). B chromosomes in many species carry rRNA genes (Camacho 2005), in most cases having been detected by silver staining thus being active, but only in the plant *Crepis capillaris* have transcripts derived from the B chromosome rDNA hitherto been detected (Leach et al. 2005).

The grasshopper *Eyprepocnemis plorans* harbors B chromosomes passing through parasitic and neutralized stages as a consequence of their arms race with the host (A) chromosomes (Camacho et al. 1997). The most parasitic B was found in the Torrox (Málaga, Spain) population, where the B₂₄ variant was transmitted to 70% of progeny through females, and it significantly decreased egg fertility (Zurita et al. 1998). Another sign of the parasitic nature of B₂₄ was a higher increase in cell chiasma frequency than other variants showing signs of neutralization (Camacho et al. 2002).

E. plorans carries rRNA genes in the paracentromeric region of almost all chromosomes, although the different clusters may be classified into large (in chromosomes 9, 10, 11, and X) and small (in most remaining A chromosomes), with the largest rDNA cluster being distally located on B chromosomes (López-León et al. 1994; Cabrero et al. 2003). The large clusters on A chromosomes correspond to the so-called primary NORs, which are the only active NORs detected in Spanish populations, and the small clusters contain secondary NORs which are usually inactive in Spanish populations (López-León et al. 1995b), but are sometimes active in Moroccan populations (Bakkali et al. 2001). The rRNA genes located on the B chromosomes are usually inactive, with the exception of a male from the Salobreña (Granada, Spain) population carrying a B₂ chromosome fused to the longest autosome (Cabrero et al. 1987), and the B₂₄ chromosome in Torrox which has recently been observed recurrently expressing its NOR (Teruel et al. 2007).

The frequency of activity of the primary NORs appears to be influenced by B chromosome presence in some populations. For instance, in Salobreña, B-carrying males showed a higher number of active NORs per cell than OB males (Cabrero et al. 1987). In Jete (Granada, Spain), however, this difference was not observed (López-León et al. 1995b). In two Moroccan populations, the situation was similar to that of Salobreña, with B-carrying males showing a significantly higher number of active NORs per cell (Bakkali et al. 2001).

However, all these analyses referred to the active/inactive status of the different NORs without consideration

of the size of the nucleoli attached to these active NORs. In rye, Morais-Cecilio et al. (2000) reported that nucleolar activity, measured as the size of the silver-stained Ag-NORs in metaphase chromosomes, was significantly lower in B-carrying plants. Recently, we measured nucleolus size at several meiotic stages in the grasshopper *E. plorans* and found that it was lower in Torrox than in Salobreña or Smir populations, which were exposed to a lower B-chromosome load than in Torrox (Teruel et al. 2007). In addition, we observed the recurrent activity of the B chromosome NOR in a Torrox population sample collected at 1999, as indicated by the attachment of nucleolus material to the B chromosomes in diplotene cells (Teruel et al. 2007). In the present paper, we have scored the number of nucleoli and measured nucleolus size in diplotene cells from males collected in 2003 and 2004 from the Torrox population, in order to investigate whether the frequency of B chromosomes expressing their NOR and the size of the produced nucleolus is changing over time and how this B chromosome activity influences A-chromosome NOR activity.

Materials and methods

Males of the grasshopper *E. plorans* were collected at Torrox (Málaga, Spain) in 2003 and 2004. The 2003 sample was representative of B-chromosome frequency in the field since males were collected at random. The 2004 sample, however, was chosen among more than 100 males collected in the field to include about 12 males in each of the 0B, 1B, 2B, and 3B classes, in order to get a balanced design for statistical analyses. Testes were fixed in freshly prepared 3:1 ethanol-acetic acid and stored at 4°C. Squash preparations were silver impregnated following Rufas et al. (1982) for visualizing nucleoli. In addition, a faint Giemsa staining was performed to differentially staining nucleoli (dark brown to black) and chromatin (blue-green). Twenty diplotene cells per male were photographed with a digital camera (Olympus DP70) coupled to an Olympus microscope.

Two nucleolar parameters were analyzed, i.e., the number of nucleoli (NN; attached to each chromosome bivalent or univalent per cell) and nucleolus area (NA). The latter was measured, in arbitrary units (au), with the help of a digital pen tablet and the ImageJ program (Rasband 1997), and then converted to squared microns after calculating magnification scale. As shown previously (Teruel et al. 2007), the measurement error of the nucleolus area by the former method was low (1.53%), and squashing produced only negligible effects on measuring the area of the nucleolus.

In addition, in each diplotene cell, we scored the total number of chiasmata and determined whether B chromosomes were forming bivalents in males with two or more

Bs. The variables used for statistical analyses were: the number of chiasmata per cell, the number of nucleoli per cell (NN), nucleolus area per cell (NA), and nucleolus area attached to chromosome 9 (NA₉), chromosome 10 (NA₁₀), chromosome 11 (NA₁₁), X chromosome (NA_X), and B chromosomes (NA_B).

In males where B chromosomes showed NOR activity, it was found consistently in only part of the cells analyzed, and therefore, we calculated the different variables separately for those cells showing and those not showing B-NOR activity. For each male, we calculated the mean for each variable, and the resulting data were used for intraindividual comparisons (between cells with active or inactive B chromosomes, and between cells with B bivalents or B univalents) as well as interindividual comparisons (with respect to collection year or B chromosome number). Statistical analyses were performed by means of contingency χ^2 , Student's t test, analysis of variance (ANOVA), multivariate analysis of variance (MANOVA), and analysis of covariance (ANCOVA).

Results

Frequency of males showing NOR activity in B chromosomes across years

Twelve out of 22 B-carrying males (55%) collected in 2003, and 19 out of 36 B-carrying males (53%) analyzed in 2004 (Table 1), showed NOR activity in some of their B chromosomes (Fig. 1). There was no significant difference between these consecutive years ($\chi^2=0.2$, $df=1$, $P=0.90$), but the frequency of B-carrying males showing B-NOR activity was greater than the 31% observed in a sample collected 4 years before in this same population (Teruel et al. 2007).

Within B-carrying males showing B-NOR activity, the mean proportion of cells showing B-NOR activity was 0.236 (SE=0.063) in 2003 and 0.195 (SE=0.046) in 2004, the difference lacking significance (Student $t=0.53$, $df=29$, $P=0.60$). These figures were very similar to the 0.213 (SE=0.043) observed in four males collected in 1999 (Teruel et al. 2007). Table 1 also shows that the chance of a specimen bearing a B chromosome having an active NOR grows with B number (about 40% for 1B, 50% for 2B and 66% for 3B), but the proportion of active cells within males showing B-NOR activity was larger in males with 1 and 3 Bs, especially in 2003.

Number of nucleoli per cell (NN)

The NN in diplotene cells (3.54 ± 0.18 in 2003 and 3.57 ± 0.10 in 2004) did not vary between years ($t=0.14$, $df=74$, $P=0.89$)

Table 1 Number of *E. plorans* males analyzed from the Torrox population in 2003 and 2004

Year	Number of Bs	Males with		Total	Percent males with B-NOR activity	Percent cells showing B-NOR activity
		B-NOR inactive	B-NOR active			
2003	0	-	-	6	-	-
	1	6	3	9	33.33	22.54
	2	3	5	8	62.50	10.00
	3	1	2	3	66.67	60.00
	4	0	2	2	100.00	22.50
	Total	10	12	28	42.86	23.55
2004	0	-	-	12	-	-
	1	7	6	13	46.15	14.17
	2	6	5	11	45.45	13.11
	3	4	8	12	66.67	27.50
		Total	17	19	48	39.58

and was similar to that found in 1999 (3.34 ± 0.10 ; $F=0.57$, $df=2$, 88 , $P=0.57$). In 31 males from 2003 and 2004, where the B-NOR was active, those diplotene cells where the B-NOR was active showed a significantly higher NN (4.08 ± 0.28) than those lacking B-NOR activity (3.51 ± 0.12 ; $t=2.29$, $df=34$, $P=0.028$).

Nucleolar area per cell

To analyze temporal changes in nucleolar area (NA), we also used the 1999 sample analyzed previously (Teruel et al. 2007), in order to get a longer temporal scope. An ANCOVA with the number of B chromosomes (0-3) as a fixed factor, year as continuous variable, and total cell NA as a dependent variable, indicated that all B-carrying types of male showed nonsignificant lower NA values than the OB males ($F=1.09$, $df=3$, 83 , $P=0.36$), but there was a significant increase in NA across years ($F=21.24$, $df=1$, 83 , $P=0.000014$; Fig. 2).

Nucleolar area yielded by B chromosomes

The mean nucleolar area attached to B chromosomes (NA_B) was $6.31 \mu m^2$ ($SE=0.88$) in 12 males collected in 2003, and $7.97 \mu m^2$ ($SE=1.08$) in 19 males from 2004, but the difference was not significant ($t=1.08$, $df=29$, $P=0.288$). These figures were slightly higher than the $5.63 \mu m^2$ ($SE=0.78$) found in 1999 (Teruel et al. 2007), suggesting a tendency to increase for NA_B , but the result was not significant (one-way ANOVA: $F=0.96$, $df=2$, 32 , $P=0.39$).

The relative contribution of B chromosomes to total NA was 0.275 ($SE=0.041$) in 2003 and 0.264 ($SE=0.041$) in 2004, the difference lacking significance ($t=0.18$, $df=29$, $P=0.86$), these figures being remarkably similar to those observed in 1999 by Teruel et al. (2007; 0.283, $SE=0.030$; $F=0.03$, $df=2$, 32 , $P=0.97$). This indicates that, when the B

chromosome NOR is active, it contributes more than 25% of total NA in the cell.

B pairing

To investigate whether B-NOR activity was influenced by meiotic pairing between B chromosomes, we scored the frequency of B univalents and bivalents in a total of 379 diplotene cells from individuals with two B chromosomes from both years (Table 2). The frequency of B bivalent formation in 2004 (64.38%) was significantly higher than that in 2003 (43.13%) ($\chi^2=16.91$, $df=1$, $P<0.0001$), but the frequency of cells showing NOR activity in the B chromosome (6.25% in 2003 and 5.94% in 2004) did not differ between the 2 years ($\chi^2=0.02$, $df=1$, $P=0.899$). No association was found between B-NOR activity, and the formation of B-bivalents either in 2003 ($\chi^2=2.33$, $df=1$, $P=0.127$) or in 2004 ($\chi^2=0.14$, $df=1$, $P=0.707$).

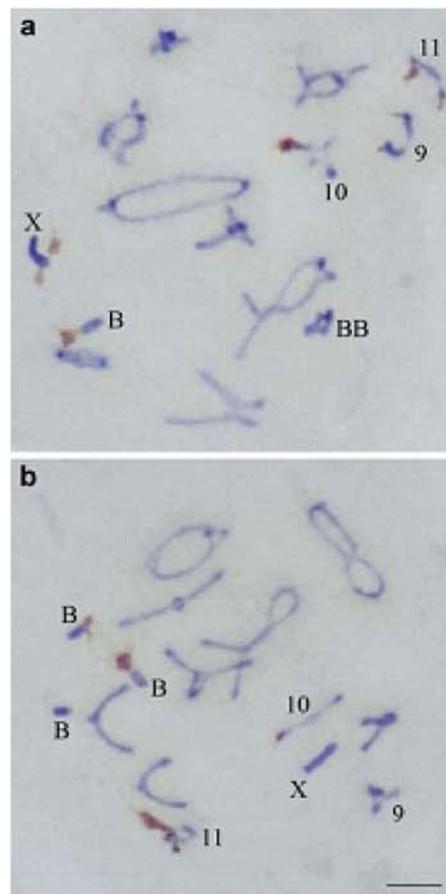


Fig. 1 Diplotene cells submitted to silver impregnation and Giemsa staining, showing chromosome material in blue and nucleoli in brown color. Note the presence of NOR-activity in one (a) or two (b) B chromosomes. Bar=5 μm

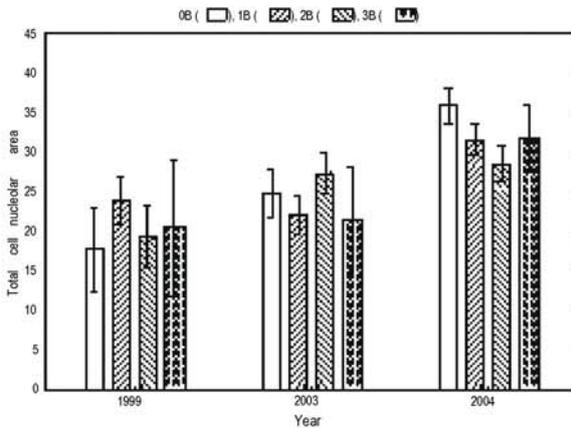


Fig. 2 Temporal variation of total cell nucleolar area (in μm^2) in diplotene cells of males with different numbers of B chromosomes. Bars indicate ± 1 SD

In diplotene cells from males with two or more Bs, the size of the nucleoli attached to B-univalents ($5.78 \mu\text{m}^2$, $SE=0.74$) and B-bivalents ($6.55 \mu\text{m}^2$, $SE=1.93$) did not differ significantly in 2003 ($t=0.44$, $df=41$, $P=0.66$) or 2004 (9.78 ± 1.18 when univalent and 7.37 ± 1.04 when bivalent; $t=1.42$, $df=55$, $P=0.16$) or both years together (8.01 ± 0.77 for B-univalents and 7.04 ± 0.98 for B-bivalents; $t=0.77$, $df=98$, $P=0.44$). This suggests that the activity of the B-NOR is not influenced by pairing between B chromosomes.

Changes in NA yielded by A chromosomes, associated with B-NOR activity

To analyze the influence of B-NOR activity on the activity of NORs on the A chromosomes (9-11 and X), we firstly compared the total cell NA between cells where the B-NOR was active and cells where it was inactive, in 12 males from 2003 and 19 males from 2004 showing B-NOR activity. In 2003, total cell NA did not differ significantly ($t=0.71$, $df=11$, $P=0.49$) between cells where the B-NOR was inactive ($mean=23.41 \mu\text{m}^2$, $SE=1.67$) and those where it was active ($mean=26.35 \mu\text{m}^2$, $SE=4.96$). The 2004 sample yielded the same result: $30.89 \mu\text{m}^2$ ($SE=2.18$) in cells where the B-NOR was inactive and $33.64 \mu\text{m}^2$ ($SE=2.45$) in cells where it was active ($t=1.41$, $df=18$, $P=0.18$). This suggests that the total cell NA is tightly regulated.

To analyze the effect of the activity of the B-NOR on the activity of each of the other NORs in the A chromosomes, we compared NA associated with each A chromosome (NA_9 , NA_{10} , NA_{11} , and NA_X) between cells where the B-NOR was inactive and cells showing activity in the B-NOR. As Table 3 shows, NA_9 and NA_{10} tended to decrease when the B-NOR was active, and this was apparent in both

years. Student's t test for dependent samples, however, showed that this decrease had borderline significance for NA_9 in 2003 and significance for NA_{10} in 2004, although these differences vanished with the sequential Bonferroni correction.

Temporal changes in NA produced from NORs in the A chromosomes

A MANOVA with NA_9 , NA_{10} , NA_{11} and NA_X as dependent variables, and year (1999, 2003, and 2004) as grouping variable, showed significant differences among years (Wilks test: $F=3.32$, $df=8$, 168 , $P=0.0015$). Univariate tests showed significant tendencies to temporal increase in NA of chromosomes 9 ($F=4.76$, $df=2,87$, $P=0.0109$), 10 ($F=8.12$, $df=2,87$, $P=0.00059$) and 11 ($F=5.29$, $df=2,87$, $P=0.0068$), but not X ($F=1.55$, $df=2,87$, $P=0.218$; Fig. 3).

B chromosome effects on chiasma frequency

A comparison of chiasma frequency in the same diplotene cells where NA was analyzed showed no significant differences between the 2003 ($mean=14.68$, $SE=0.18$) and 2004 ($mean=15.04$, $SE=0.15$) samples (Student's $t=1.47$, $df=74$, $P=0.146$). Significant effect of B chromosome number on mean cell chiasma frequency was found in both years (2003: $F=3.48$, $df=3$, 24 , $P=0.031$; 2004: $F=3.84$, $df=3$, 44 , $P=0.016$), but there was an odd-even pattern in 2003 and a dose-effect in 2004 (Fig. 4). Mean cell chiasma frequency in A chromosomes was not correlated with total NA in A chromosomes (2003: $r=0.156$, $P=0.427$; 2004: $r=0.157$, $P=0.286$). The net increase in chiasma frequency of 1B males with respect to 0B males was about 0.5 in both study years (see Fig. 4).

Interdependence among A and B chromosome NORs

To analyze whether NORs located in each of the four A chromosomes (9, 10, 11, and X) and that in the B

Table 2 B-NOR activity and B-bivalent formation in 2B males

Year	Meiotic B configuration	B inactive	B active	Total cells	Percent active
2003	B univalents	83	8	91	8.79
	B bivalent	67	2	69	2.90
	Total cells	150	10	160	6.25
	Percent bivalents	44.67	20.00	43.13	
2004	B univalents	74	4	78	5.13
	B bivalent	132	9	141	6.38
	Total cells	206	13	219	5.94
	Percent bivalents	64.08	69.23	64.38	

Table 3 Comparison of NA associated with each A chromosome carrying a NOR (9, 10, 11, X) between cells where the B-NOR was active or inactive, in 12 males from 2003 and 19 males from 2004 where the B-NOR showed activity

Year	Item	B-NOR	Mean	SE	t	df	P
2003	NA ₉	Inactive	4.17	0.79	2.15	11	0.055
		Active	2.80	0.63			
	NA ₁₀	Inactive	7.91	1.03	1.39	11	0.191
		Active	6.11	1.63			
	NA ₁₁	Inactive	6.04	0.97	-0.37	11	0.719
		Active	7.22	3.62			
	NA _X	Inactive	4.02	1.05	1.27	11	0.232
		Active	3.00	1.02			
NA _B	Active	6.31	0.88				
	2004	NA ₉	Inactive	5.46	0.76	1.50	18
Active			4.02	1.23			
NA ₁₀		Inactive	7.99	0.86	2.19	18	0.042
		Active	5.14	1.37			
NA ₁₁		Inactive	8.83	1.28	0.02	18	0.986
		Active	8.80	2.09			
NA _X		Inactive	6.57	0.94	0.62	18	0.541
		Active	5.99	1.36			
NA _B	Active	7.97	1.08				

NA associated with the B chromosome (NA_B) is also included
SE Standard error, t Student test for dependent samples

chromosome showed any kind of interaction regarding the size of the nucleolus with which they were associated, we performed a series of correlation analyses in the diplotene cells of OB males and B-carrying males. The results showed that, in the absence of B chromosomes, the NORs on A chromosomes behaved independently, i.e., the size of the NA for any of them was independent of the NA in the remaining A chromosomes (see the first set of analyses in Table 4).

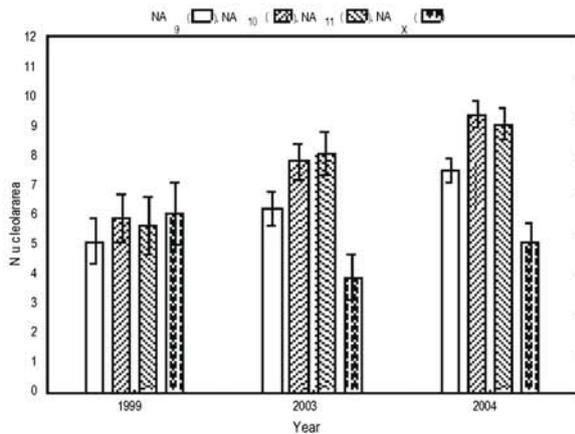


Fig. 3 Temporal variation of nucleolar area (in μm^2) attached to A (9, 10, 11, X) chromosomes. Bars indicate ± 1 SD

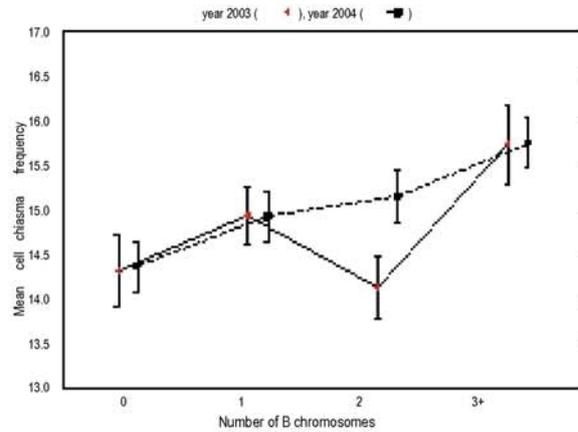


Fig. 4 Mean cell chiasma frequency in diplotene cells of males with different numbers of B chromosomes in 2003 and 2004 in the Torrox population. Bars indicate ± 1 SD

In the presence of B chromosomes, however, this independence was lost in some cases, i.e., NA₁₀ and NA₁₁ showed strong positive correlation in 2003, as well as NA₉ and NA₁₀ in 2004 (see the second set of analyses in Table 4). Since there were two types of B-carrying males, i.e., those carrying Bs being always inactive and those carrying Bs with B-NOR activity in part of the analyzed cells, we performed additional analyses in order to test the effect of B chromosome activity. When all B chromosomes in a male were inactive, no interdependence was found among A-chromosome NORs (see the third set of analyses in Table 4), as noted in the absence of Bs. However, in males where B-NOR activity was observed, the result of these correlation analyses depended on whether it had been performed on cells where the B was inactive or active. In the first case, highly significant correlations were observed, especially in 2004, and they were again positive among autosomes and negative between X and autosomes (see the fourth set of analyses in Table 4). In cells where the B-NOR was active, however, no significant correlation was detected among the size of the nucleoli attached to the different A-chromosome NORs, that of the B-NOR also being independent (see the fifth set of analyses in Table 4).

Discussion

B chromosomes in many species have been shown to harbor rRNA genes (for a review, see Camacho 2005). In most cases, these genes have been detected by silver impregnation, which reveals only active rRNA genes, but the growing use of the fluorescent in situ hybridization (FISH) is expected to uncover more cases of B chromo-



Chromosoma

Table 4 Correlation analysis on NA associated with each A chromosome NOR in diplotene cells

Type of male	Type of cells	NA associated with chromosome		Correlation (2003)					Correlation (2004)				
				r	t	P	Pb	N	r	t	P	Pb	N
0B	Lacking Bs	9	10	0.139	0.281	0.7930	6	0.349	1.178	0.2662	12		
		9	11	0.603	1.511	0.2054		0.016	0.051	0.9600			
		9	X	-0.325	-0.687	0.5297		-0.034	-0.108	0.9162			
		10	11	0.650	1.709	0.1627		0.302	1.001	0.3404			
		10	X	-0.548	-1.312	0.2599		-0.291	-0.962	0.3585			
		11	X	-0.060	-0.119	0.9108		-0.056	-0.179	0.8616			
+B	B active + B inactive	9	10	0.372	1.790	0.0886	22	0.579	4.144	0.0002	36		
		9	11	0.405	1.983	0.0612		0.282	1.714	0.0957			
		9	X	-0.151	-0.684	0.5020		-0.291	-1.774	0.0851			
		10	11	0.705	4.441	0.0003		0.0015	0.204	1.217		0.2321	
		10	X	-0.482	-2.461	0.0231		0.0923	-0.331	-2.043		0.0488	0.2442
		11	X	-0.519	-2.718	0.0132		0.0662	-0.304	-1.860		0.0715	
B inactive	B inactive	9	10	-0.249	-0.726	0.4883	10	0.586	2.804	0.0133	17		
		9	11	0.105	0.300	0.7720		0.122	0.478	0.6397			
		9	X	0.135	0.385	0.7104		-0.448	-1.938	0.0717			
		10	11	0.585	2.040	0.0757		0.043	0.168	0.8691			
		10	X	-0.478	-1.539	0.1623		-0.384	-1.610	0.1283			
		11	X	-0.509	-1.673	0.1330		-0.462	-2.015	0.0622			
B active	B inactive	9	10	0.090	0.287	0.7797	12	0.561	2.798	0.0124	19		
		9	11	0.156	0.500	0.6280		0.533	2.594	0.0189		0.0378	
		9	X	-0.254	-0.830	0.4260		-0.231	-0.978	0.3418			
		10	11	0.842	4.938	0.0006		0.0035	0.737	4.493		0.0003	0.0019
		10	X	-0.649	-2.697	0.0224		0.1121	-0.598	-3.073		0.0069	0.0276
		11	X	-0.550	-2.085	0.0637			-0.602	-3.110		0.0064	0.0318
B active	B active	9	10	0.390	1.337	0.2107	12	-0.024	-0.100	0.9215	19		
		9	11	0.611	2.439	0.0349		0.2791	0.074	0.306		0.7636	
		9	X	-0.194	-0.627	0.5448			-0.243	-1.032		0.3164	
		9	B	0.170	0.545	0.5977			-0.013	-0.053		0.9583	
		10	11	0.612	2.444	0.0346		0.3114	0.390	1.748		0.0985	
		10	X	-0.632	-2.577	0.0276		0.2755	-0.398	-1.789		0.0915	
		10	B	0.195	0.628	0.5441			-0.310	-1.346		0.1961	
		11	X	-0.333	-1.116	0.2906			-0.453	-2.097		0.0512	
		11	B	0.276	0.908	0.3854			-0.489	-2.310		0.0337	0.3370
		X	B	-0.157	-0.502	0.6265			0.244	1.038		0.3138	

Correlations being significant after applying the sequential Bonferroni method (Pb) are noted in bold type letter

somes carrying inactive rRNA genes (see also Cabrero and Camacho 2008).

In the grasshopper *E. plorans*, most A chromosomes carry rDNA (López-León et al. 1994), although the most active NORs are those located in chromosomes 9-11 and X (López-León et al. 1995b). In addition, the great majority of B chromosomes hitherto analyzed by FISH have been shown to carry rDNA in amounts higher in eastern (Daghestan, Armenia, Turkey, and Greece) than western (Spain and Morocco) populations (López-León et al. 2008). However, rDNA in *E. plorans* B chromosomes is inactive in most cases, with the exception of a male carrying the B₂ chromosome fused to the longest autosome (Cabrero et al. 1987), suggesting the importance of chromosome context for NOR activity (see Pikaard 2000), and the recurrent

activity of the B₂₄ NOR in the Torrox population (Teruel et al. 2007). Our present analysis indicates that the frequency of *E. plorans* males showing B-NOR activity increased from 31% to 53% between 1999 (Teruel et al. 2007) and 2003-2004 (this paper).

The total number of nucleoli per diplotene cell remained roughly constant during these years (3.3-3.5), whereas the nucleolus area (NA) per cell augmented 31% from 2003 to 2004. Therefore, in parallel to the increase in the frequency of B chromosomes contributing rRNA to the cell through B-NOR activity, there was an increase in NA that was attributable mainly to larger nucleoli attached to autosomes 9, 10, and 11 (see Fig. 3). The number of nucleoli per cell within males showing B-NOR activity, however, was significantly higher in cells with B-NOR activity than in

those with inactivity. In the case of activity, the relative contribution of B chromosomes to total cell NA was about 27%, a figure remaining rather constant from 1999 to 2004.

Repression of ribosome synthesis can come from stress of many kinds (see Rudra and Warner 2004), and this is manifested by a decrease in nucleolus size (see Olson 2004). B chromosomes may cause stress that is manifested by a decrease in some fitness-related traits. One of these is frequently fertility, which decreases with B-chromosome number. For instance, in *E. plorans*, B chromosomes and mite ectoparasites decrease egg fertility (Muñoz et al. 1998). In fact, the B chromosome variant showing the highest drive (B_{24} in the Torrox population in 1992) in this species was also the one producing the largest decrease in egg fertility (Zurita et al. 1998). In a previous work, we found that the Torrox population showed lower total NA per cell than two other populations (Salobreña in Spain and Smir in Morocco) carrying less parasitic B chromosomes, thus suggesting that parasitic Bs are associated with smaller nucleoli (Teruel et al. 2007).

A second symptom of the stress caused by B chromosomes is the increase in chiasma frequency. Our present results have shown that mean chiasma frequency was about 15 per diplotene cell in both years analyzed, a figure very close to that observed in the Torrox population in samples from 1992, 1997, and 1998 (Camacho et al. 2002). The significant increase in chiasma frequency observed in B-carrying males from both 2003 and 2004, with respect to 0B males, suggests that the B_{24} chromosome is still being perceived as a parasitic element in the Torrox population. However, the net chiasma increase with regard to 0B males was 1.4 in the samples from the 1990s (see Camacho et al. 2002) but only 0.5 in 2003 and 2004 (present results), a figure resembling that found in partially neutralized Bs in Moroccan populations (Camacho et al. 2002). This suggests a decline in the degree of parasitism of B_{24} in Torrox during recent years.

Another indication for B-chromosome neutralization in the Torrox population comes from the significant fall in the transmission rate of the B_{24} chromosome through females from 1992 (0.7) to 1998 (near 0.5) (Perfectti et al. 2004). Therefore, the B_{24} chromosome in Torrox appears to be currently less parasitic (lower chiasma increase per B), in coincidence with its absence of drive, and is causing less stress since NA has increased during the last years.

Ribosome biogenesis is the main energy consumer within cells since, in yeast, rDNA transcription by RNA Pol I represents about 60% of the total transcription, and ribonucleoprotein mRNA production represents about 50% of all transcription initiation events by RNA Pol II (Warner 1999). In mammals, nearly 50% of the transcriptional activity is dedicated to the synthesis of 45S rRNA, even though only about 50% of rRNA genes are transcribed (Moss and Stefanovsky 2002). This highlights the need for

a tight regulation of ribosome production (Rudra and Warner 2004). It is thus logical that the presence of extra (B) chromosomes composed of about 100×10^6 bp (as it is the case in *E. plorans*, Cabrero et al., unpublished), with a high proportion of rDNA (López-León et al. 2008), may distort rRNA gene-activity regulation, especially if B-rDNA genes are capable of contributing to rRNA production, as what occurs in the Torrox population. In this context, future research needs to be focused on the molecular analysis of rDNA transcripts from A and B chromosomes and their quantization in relation with B-NOR activity in Torrox and other populations.

Ribosomal chromatin can exist in three states, an inactive state similar to heterochromatin, a transcriptionally competent, but inactive, state, and a transcriptionally productive state (Huang et al. 2006). Pol I transcription factors are associated with transcriptionally silent mitotic NORs (Weisenberger and Scheer 1995; Roussel et al. 1996). Mitotic silencing is controlled primarily by post-translational modification of the transcription machinery (see Huang et al. 2006). Inactive NORs can thus sequester part of the transcription machinery and cause stress to cells. We suggest that the B chromosome NOR can also exist in three different states: silent, competent or active. In most populations hitherto analyzed, the B-NOR was silent, whereas in Torrox, from 1999 onwards, there were also some B chromosomes showing competent and active NORs, the two latter states occurring, for the same B, in different cells within the same male. The coexistence of competent and active NORs in the same chromosome is also a normal property of A chromosomes (9-11 and X) since all of them are active in only a proportion of diplotene cells per male, and the total NA yielded by them is of the same order of magnitude as that in the B_{24} chromosome (see Table 3). As shown in Table 1, the likelihood of showing a B chromosome with an active NOR grows with B number. The NOR neo-activity of B_{24} in Torrox could be explained by two hypotheses: (1) the appearance of a new B-variant escaping silencing, and/or (2) a mutation in an A chromosome gene regulating NOR activity (or B chromosome silencing in general).

It is not known how nucleolus size is regulated, but a possible molecule transmitting information from the surrounding environment to the nucleolus is nucleostemin (Tsai and McKay 2005; Tuma 2005). Intraindividual comparisons in *E. plorans* males showing B-NOR activity indicated the absence of significant difference in total NA between cells showing the B-NOR to be active and those showing it to be inactive. This suggests that total cell NA is tightly regulated to reach the demanded levels, irrespectively of how many chromosomes are contributing rRNA, most likely by means of a feedback mechanism balancing the number of active rRNA genes with the transcription rate

per gene to achieve homeostasis (Lawrence et al. 2004). In agreement with this statement, Grummt (2007) suggested the existence of an "integrative cooperativity and multiple interlocking feedback mechanisms between DNA methyltransferases, histone-modifying enzymes and nucleosome-remodeling activities that mediate the stable commitment of specific rDNA clusters to a particular state of activity." Our present analyses have shown that B-NOR activity is associated with decreases in the activity of the NORs in chromosomes 9 and 10 (about 30% decrease, averaging 2003 and 2004 data), so that the total cell NA did not significantly vary after B-NOR activation. As Table 3 shows, B chromosomes yielded NA amounts comparable to, and in some cases larger than, those in the A chromosomes. This suggests that, once activated, the behavior of the B-NOR is comparable to those in A chromosomes in terms of nucleolus size.

Preuss and Pikaard (2007) have remarked that "there is still much that we do not know and much to be learned about the chromosomal control of NORs and rRNA genes," and have suggested a large-scale mechanism for NOR-activity regulation dictated by unlinked loci. The identification of a gene in *Arabidopsis thaliana*, by QTL analysis, being unlinked to the NORs in this species but influencing their relative expression level (Lewis et al. 2004) is one of the few proofs for this assertion. Evidence on this subject remains elusive because of the difficulty in identifying rRNA transcripts from the different chromosomes within the same genome, although this limitation is being overcome in recent studies of nucleolar dominance in allopolyploids (for instance, see Earley et al. 2006). Silver staining of nucleoli attached to chromosome bivalents at diplotene cells can also help in this task. This technique has revealed, for instance, the activation of the NOR in the B₂ chromosome in *E. plorans* after its fusion with the longest autosome, which was explained by the possible existence of a NOR-regulating gene in this autosome (Cabrero et al. 1987), a finding consistent with changes in nucleolar dominance associated with chromosome rearrangements (for a review, see Lewis and Pikaard 2001).

Since increases in rDNA transcription result in an overall greater nucleolus size (Caperta et al. 2007), NA can be considered the phenotypic expression of rRNA genes. Our present analysis of NA yielded by each chromosome NOR, in diplotene cells, thus represents a very easy approach to evaluate relative expression level of rRNA genes on different chromosomes in the same genome. In *E. plorans*, our results have revealed noteworthy variation in NA, reflecting interdependence among NORs for expression, associated with B-chromosome NOR activity. B presence is not enough to change A-NOR relationships, since they behaved with similar independence in OB individuals and B-carrying individuals where no B-NOR activity was

detected (i.e., carrying a silent B-NOR). The situation changed in individuals showing B-NOR activity, although in this case, the cells where the A-chromosome NORs behaved independently were those showing B-NOR activity (i.e., carrying an active B-NOR), whereas strong A-NOR correlations appeared in cells where the B-NOR was not active (but it was competent). A possible explanation for these results is that competent B-NORs attract part of the cell transcriptional machinery to the detriment of A-chromosome NORs which have to compete for it, whereas an active B-NOR contributes to total cell rRNA production so that the amount demanded is reached with no competition of A-chromosome NORs. Silent B-NORs, however, would not promote competition among A chromosomes for transcriptional machinery.

As with A-chromosome NORs, B-NOR silencing might be related to epigenetic modifications of B chromosomes, i.e., DNA methylation and/or histone modifications. For instance, a decrease in the level of DNA methylation was observed in the distal third of the B₂ chromosome in *E. plorans* (where the B contains rDNA) when it was fused to the longest autosome, in parallel with the activation of the B-NOR (López-León et al. 1991). However, in the male showing this fusion, the NOR of the fused B showed low DNA-methylation levels irrespective of whether it was yielding a nucleolus or not (López-León et al. 1991), suggesting that it was in a competent state in all cells. Later studies indicated that DNA methylation did not appear to be the only cause for the usual inactivity of the B-NOR (López-León et al. 1995a). Recently, we have reported that B chromosomes in *E. plorans* show marked hypoacetylation for lysine 9 in the H3 histone (Cabrero et al. 2007), suggesting that histone modifications may also be involved in B-NOR silencing. Therefore, competent B-NORs in *Torrox* unveil A-chromosome NOR interdependence that is cooperative among autosomes (positive correlations) and antagonistic between autosomes and the X chromosome (negative correlations), these being the same kind of relationships as previously reported in the *Jete* population (see López-León et al. 1995b).

It has been suggested that a stochastic factor influences which rDNA loci are silenced (Matyasek et al. 2007). The independent expression pattern of the NORs in chromosomes 9-11 and X in OB males could be a manifestation of such a random silencing. However, when a B chromosome is contributing to rRNA production, the rules governing NOR expression are broken and significant changes occur.

Acknowledgements This study was supported by FEDER funds and grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2006-06307) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-1664). MT was supported by a fellowship (FPI) from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. We also thank David Nesbitt for English corrections.

References

- Bakkali M, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM (2001) Population differences in the expression of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Protoplasma* 217:185-190
- Cabrero J, Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16:595-607
- Cabrero J, Alché JD, Camacho JPM (1987) Effects of B chromosomes on the activity of Nucleolar Organizer Regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Activation of a latent Nucleolar Organizer Region on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29:116-121
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD (2003) Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 11:375-381
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jiménez R, Camacho JPM (2007) Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet Genome Res* 119:135-142
- Camacho JPM (2004) B chromosomes in the eukaryote genome. Karger, Basel
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR (ed) *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, pp 223-286
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Amer Nat* 149:1030-1050
- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A, Perfectti F (2002) Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc Roy Soc Lond B* 269:2173-2177
- Caperta AD, Neves N, Viegas W, Pikaard CS, Preuss S (2007) Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizers in *Secale cereale*. *Protoplasma* 232:55-59
- Caspersson T (1950) Cell growth and cell function, a cytochemical study. WW Norton, New York
- Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS (2006) Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* 20:1283-1293
- Grummt I (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17:1691-1702
- Grummt I (2007) Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R21-R27
- Hiscox JA (2007) RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5:119-127
- Huang S, Rothblum LI, Chen D (2006) Ribosomal chromatin organization. *Biochem Cell Biol* 84:444-449
- Hudson LA, Ciborowski JJH (1996) Teratogenic and genotoxic responses of larval *Chironomus salinaricus* group (Diptera: Chironimidae) to contaminated sediment. *Environ Toxicol Chem* 15:1375-1381
- Jones RN, Viegas W, Houben A (2008) A century of B chromosomes in plants: So what? *Annals of Botany* 101:767-775
- Karpen GH, Schaefer JE, Laird CD (1988) A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev* 2:1745-1763
- Laferte A, Favry E, Sentenac A, Riva M, Carles C, Chedin S (2006) The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* 20:2030-2040
- Langerstedt S (1949) Cytological studies on the protein metabolism of the liver in the rat. *Acta Anat Suppl* 9:1-140
- Lawrence RJ, Pikaard CS (2004) Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle* 3:880-883
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13:599-609
- Leach C, Houben A, Field B, Pistrick K, Demidov D, Timmis J (2005) Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171:269-278
- Lewis MS, Pikaard CS (2001) Restricted chromosomal silencing in nucleolar dominance. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14536-14540
- Lewis MS, Cheverud JM, Pikaard CS (2004) Evidence for nucleolar organizer regions as the units of regulation in nucleolar dominance in *Arabidopsis thaliana* interecotype hybrids. *Genetics* 167:931-939
- Li J, Santoro R, Koberna K, Grummt I (2005) The chromatin remodelling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J* 24:120-127
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (1991) A nucleolar Organizer Region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. *Chromosoma* 100:134-138
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (1995a) Changes in DNA methylation during development in the B chromosome NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 74:296-302
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (1995b) Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome* 38:68-74
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87-92
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Tshetsov NB, Camacho JPM (2008) Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res* 121:260-265
- Matyasek R, Tate JA, Lim YK, Srubarova H, Koh J, Leitch AR, Soltis DE, Soltis PS, Kovarik A (2007) Concerted evolution of rDNA in recently formed *Tragopogon* allotetraploids is typically associated with an inverse correlation between gene copy number and expression. *Genetics* 176:2509-2519
- Morais-Cecilio L, Delgado M, Jones R, Viegas W (2000) Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. *Chromosome Res* 8:341-351
- Mosgoeller W (2004) Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) *The Nucleolus*. Kluwer, New York, pp 10-20
- Moss T, Stefanovsky VY (2002) At the center of eukaryotic life. *Cell* 109:545-548
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM (1998) Parallel effects of a B chromosome and a mite that decrease female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc Roy Soc Lond B* 265:1903-1909
- Nakamoto K, Ito A, Watabe K, Koma Y, Asada H, Yoshikawa K, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Nojima H, Kitamura Y (2001) Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. *Am J Pathol* 159:1363-1374
- Nogi Y, Yano R, Nomura M (1991) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3962-3966
- Olson MOJ (2004) Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004:e10

- Pebusque MJ, Seite R (1981) Electron microscopic studies of silver-stained proteins in nucleolar organizer regions: location in nucleoli of rat sympathetic neurons during light and dark periods. *J Cell Sci* 51:85-94
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD, Camacho JPM (2004) Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet Genome Res* 106:338-343
- Pikaard CS (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet* 16:495-500
- Preuss S, Pikaard CS (2007) rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta* 1769:383-392
- Rasband WS (1997) ImageJ, volume <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 133:235-246
- Roussel P, Belenguer P, Amalric F, Hernandez-Verdun D (1992) Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp Cell Res* 203:259-269
- Roussel P, Hernandez-Verdun D (1994) Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 214:465-472
- Rudra D, Warner JR (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev* 18:2431-2436
- Rufas JS, Iturra P, de Souza W, Esponda P (1982) Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Arch Biol* 93:267-274
- Santoro R (2005) The silence of the ribosomal RNA genes. *Cell Mol Life Sci* 62:2067-2079
- Santoro R, Li J, Grummt I (2002) The nucleolar remodelling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32:393-396
- Sollner-Webb B, Tower J (1986) Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Annu Rev Genet* 55:801-830
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2007) Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 15:755-765
- Tsai RY, McKay RD (2005) A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168:179-184
- Tsang CK, Bertram PG, Ai W, Drenan R, Zheng XF (2003) Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *EMBO J* 22:6045-6056
- Tuma RS (2005) A GTP signal to the nucleolus. *J Cell Biol* 168:172
- Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24:437-440
- Weisenberger D, Scheer U (1995) A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol* 129:561-575
- Zhou Y, Santoro R, Grummt I (2002) The chromatin remodelling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 21:4632-4640
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52:274-277

4.4. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL NUCLEOLO EN INDIVIDUOS ADULTOS CON Y SIN CROMOSOMA B₂₄, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Introducción

El nucleolo es el compartimento nuclear donde se produce la transcripción del RNA ribosómico 45S (rRNA 45S) y la maduración de los pre-ribosomas que, finalmente, se ensamblan en el citoplasma. La mayoría de los estudios sobre la estructura del nucleolo se han realizado en células de mamíferos, especialmente en células humanas. En estas células, a microscopía electrónica de transmisión, se distinguen en el nucleolo tres compartimentos diferentes (Olson et al. 2000, Olson 2004, Derenzini et al. 2006): i) los centros fibrilares (FC, Fibrillar Center), donde se encuentran los genes ribosómicos, la RNA polimerasa I y determinados factores de transcripción; ii) el componente fibrilar denso (DFC, Dense Fibrillar Component), que es donde se localizan los transcritos de rRNA 45S; y iii) el componente granular (GC, Granular Component), que rodea al anterior y donde maduran los pre-ribosomas. Sin embargo, por microscopía óptica, sólo es posible identificar el FC y DFC, que se tiñen por impregnación argéntica, ya que en ellos existen proteínas sensibles al marcaje con plata (Derenzini & Trere 2001).

Durante las últimas tres décadas ha habido una gran controversia acerca del lugar exacto donde ocurre la transcripción de los genes ribosómicos en el nucleolo, habiéndose propuesto el DFC o los FC como lugares para la transcripción. Sin embargo, recientemente están apareciendo datos que están solventando la controversia al situar la transcripción del rDNA en el cortex de los FC y/o en la región intersticial que separan los FC del DFC (véase Kaska 2003, Derenzini et al. 2006).

Aunque en los nucleolos de la mayoría de los organismos analizados se han encontrado los tres mismos compartimentos que aparecen en las células de mamíferos, como, por ejemplo, en el nucleolo de los oocitos de *Locusta migratoria* (Scheer et al. 1997), sin embargo, en el nucleolo de levaduras sólo se reconocen dos componentes diferentes, una red fibrilar embebida dentro de un componente granular (véase Thiry & Lafontaine 2005). En principio sería lógico pensar que en todos los organismos el nucleolo presenta los mismos compartimentos, ya que esta estructura representa un proceso muy conservado evolutivamente, como es la biogénesis de los ribosomas. Sin embargo, Thiry & Lafontaine (2005), al revisar la composición molecular de los centros fibrilares del nucleolo en multitud de organismos, encontraron que la RNA polimerasa I y los factores de transcripción sólo están presentes en los centros fibrilares de las células de mamíferos. Estos autores sugieren la existencia de un nucleolo primitivo presente en la mayor parte los organismos, formado por un compartimento fibrilar embebido en un compartimento granular, semejante al descrito en levaduras. Durante la transición de los anamniotas a amniotas, el componente fibrilar se habría dividido en dos compartimentos especializados, los centros fibrilares y el componente fibrilar denso. Este proceso habría

coincido con un incremento en el tamaño del espaciador intergénico de los genes ribosómicos.

En las células de mamíferos se han descrito tres tipos diferentes de nucleolos (Schwarzacher & Wachtler 1993): i) Los nucleolos en anillo, que suelen ser pequeños, con un único y gran FC rodeado de DFC y GC y característicos de las células con bajo nivel de síntesis de ribosomas. ii) Los nucleolos compactos, que son grandes y están formados por múltiples FCs rodeados por un gran GC. iii) Los nucleolos reticulares, que se caracterizan por presentar el DFC muy desarrollado y con pocos y pequeños FCs y el GC casi inexistente. Estos dos últimos tipos corresponden a nucleolos muy activos, y las diferencias entre ellos se deben a diferencias en la actividad nucleolar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la reconstrucción exacta 3D del nucleolo se ha realizado en pocos tipos celulares y tal vez no sea correcto clasificar los nucleolos en base a su observación en una única dimensión (Schwarzacher & Wachtler 1993).

En este apartado presentamos la visualización a microscopía electrónica de transmisión de la estructura del nucleolo de varios tipos celulares, en el saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, con objeto de determinar si existen diferencias en la estructura del nucleolo asociadas a la presencia del cromosoma B₂₄.

Material y métodos

Hemos estudiado el nucleolo mediante microscopía electrónica de transmisión en dos tejidos diferentes, ganglio y gónada, de machos y hembras adultos de *E. plorans* con y sin cromosoma B₂₄ capturados en la población de Torrox. En el caso de los machos, constatamos la presencia de un único cromosoma B mediante bandeado C de preparaciones de folículos testiculares; mientras que, en las hembras, analizamos la presencia o ausencia de cromosomas B mediante bandeado C de preparaciones de hemolinfa, siguiendo la técnica descrita por Cabrero et al. (2006).

Los diferentes tejidos fueron fijados durante toda una noche a 4 °C en glutaraldehído al 2,5% más formaldehído al 1%, en tampón cacodilato 0,05 M a pH 7,4. Las muestras se prepararon siguiendo un protocolo convencional para microscopía electrónica (véase Material y Métodos). La preparación de las muestras y los cortes ultrafinos (50–70 nm) se han realizado en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La observación de las preparaciones las hemos realizado en un microscopio electrónico JEOL modelo JEM1011 acoplado a un sistema de captura de imágenes Megaview III (Soft Imaging Systems) del Grupo de Biología Reproductiva de Plantas del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC (Granada).

Resultados

Folículos testiculares

Cada uno de los dos testículos de los machos de *E. plorans* está formado por numerosos túbulos testiculares (también denominados folículos) en los que tiene lugar la espermatogénesis a lo largo de toda la fase adulta. Los folículos están organizados en cistos, que son grupos de células, incluyendo espermatogonias, espermátocitos y espermátidas, que desarrollan la espermatogénesis o la espermiogénesis de forma sincronizada. En la parte apical de los folículos se encuentran las espermatogonias, que se multiplican por mitosis para dar lugar a numerosas espermatogonias, que entran en meiosis convirtiéndose en espermátocitos primarios. En la región basal de los folículos, los espermátocitos maduros se sitúan ordenadamente en paquetes espermáticos, que desembocan en los conductos deferentes (véase Hewitt et al. 1987).

En los folículos testiculares hemos observado la presencia de nucleolos en los espermátocitos, durante la meiosis y en varias células foliculares que rodean los distintos cistos. Los espermátocitos tienen nucleolos pequeños, esféricos y compactos, donde es difícil identificar los diferentes componentes (véase Fig. 4.1a, b), características que indican que se trata de nucleolos activos. Este tipo de nucleolos aparece indistintamente en los espermátocitos de individuos con y sin cromosoma B. A veces es posible encontrar estos nucleolos asociados a la cromatina (Fig. 4.1c).

También hemos observado células en diacinesis o metafase I, donde es posible distinguir los cromosomas (véase Fig. 4.1d). Sin embargo, a microscopio electrónico, utilizando una técnica convencional, es imposible diferenciar el cromosoma B del resto de cromosomas y, al tratarse de cortes ultrafinos, es difícil además conseguir en un mismo campo los cromosomas y los nucleolos asociados a ellos¹. En los folículos testiculares, dependiendo de por dónde se realice el corte, es posible encontrar espermátocitos en paquitene o diplotene, donde los cromosomas ya son distinguibles, o cistos de espermátidas en distintos grados de maduración. Pero para poder estudiar el nucleolo asociado a los bivalentes en la meiosis sería necesaria una técnica específica e incluso utilizar una sonda específica del cromosoma B para poder así diferenciarlo del resto de cromosomas.

Hemos observado células foliculares que se caracterizan por presentar nucleolos grandes y compactos y, por tanto, activos, donde a veces es posible observar la cromatina asociada a ellos (Fig. 4.2a). Además, estas células muestran, a veces y con poca frecuencia nucleolos en anillo (Fig. 4.2b).

¹ En las muestras para microscopía electrónica es importante conocer previamente la zona de interés para poder realizar los cortes, porque al tratarse de cortes de entre 50 a 70 nm es difícil conseguir secciones de la zona de interés.

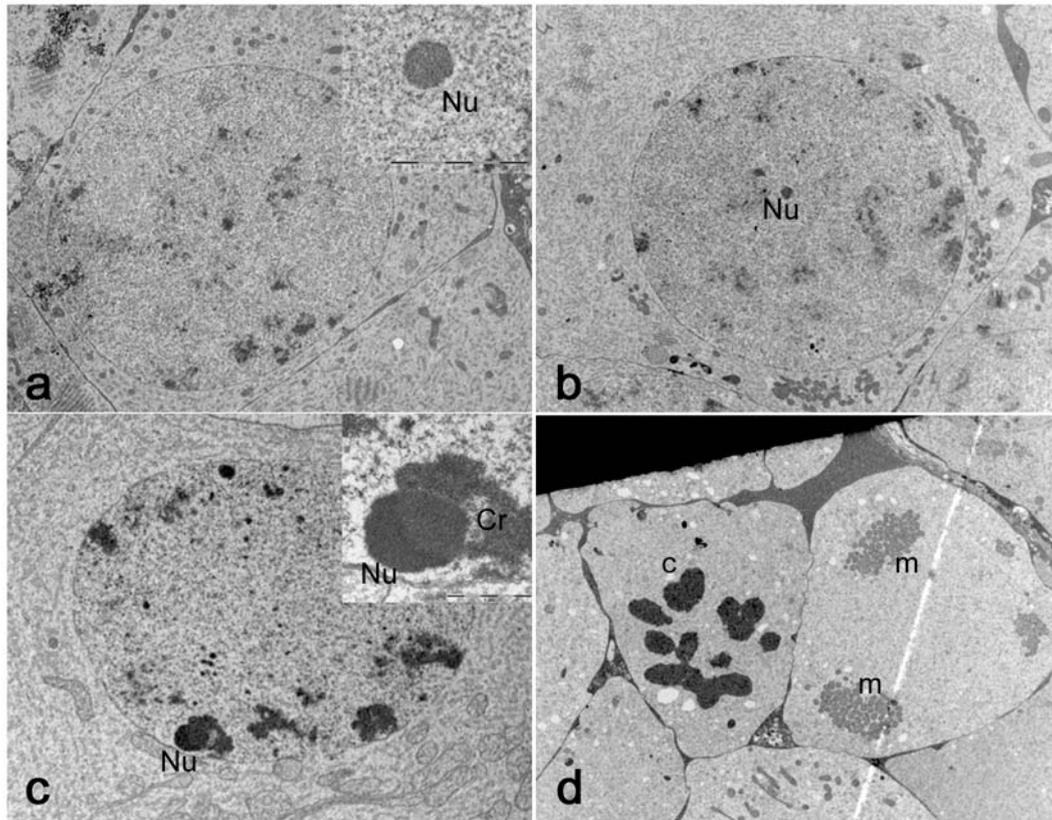


Figura 4.1. Imágenes de espermatocitos en distintas etapas de la meiosis. a) nucleolo pequeño y muy compacto, b) espermatocito en meiosis temprana donde es posible observar un nucleolo pequeño y compacto c) nucleolo compacto asociado a la cromatina. Ambos nucleolos pertenecen a un macho con 1B. d) espermatocitos en metafase I. (*Nu*, nucleolo; *Cr*, cromatina; *c*, cromosomas; *m*, mitocondrias) .

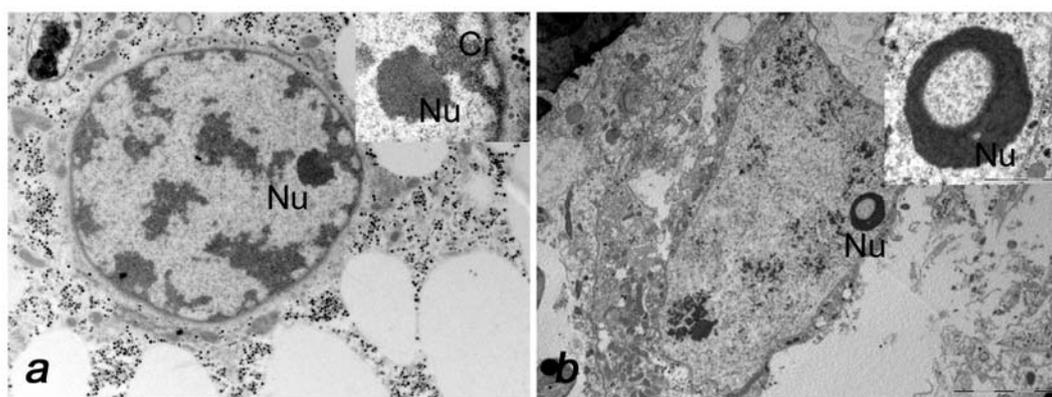


Figura 4.2. Células foliculares de testículo de machos. a) célula folicular donde se observa un nucleolo compacto asociado a la cromatina. b) célula folicular de un macho sin cromosoma B, donde se observa un nucleolo en anillo. (*Nu*, nucleolo; *Cr*, cromatina)

Ovariolas

Las hembras de saltamontes presentan dos ovarios formados cada uno de ellos por un cierto número de ovariolas, que suele ser característico de cada especie. Cada ovariola se subdivide en folículos que corresponden a estados sucesivos del desarrollo del huevo, ya que se trata de un proceso ordenado espacial y temporalmente que va desde el germario, situado en la parte apical de las ovariolas (donde las oogonias se dividen por mitosis para dar lugar al oocito), hasta la región basal, que desemboca en el oviducto, donde el huevo aparece ya formado y presenta la capa de vitelo rodeada del corion (Rothschild et al. 1986).

El ovario de saltamontes es de tipo panoístico, es decir, es un ovario primitivo que se caracteriza por no presentar células nutritivas especializadas. Cada folículo de la ovariola está formado por un único oocito rodeado de múltiples células foliculares, y separado de los folículos adyacentes por un tapón de células foliculares modificadas. Las células foliculares son las encargadas de nutrir al oocito y de sintetizar el vitelo y el corion. En el folículo basal, el oocito se encuentra en profase I hasta el momento en que se produce la fecundación de los huevos y la puesta, siendo reactivada la meiosis, en ese momento, encontrándose el oocito ya en metafase I (Henriques-Gil et al. 1987, Herrera et al. 1996).

En este caso, sólo hemos observado los nucleolos de las células foliculares, ya que en los cortes realizados no hemos localizado el oocito. Las células foliculares presentan nucleolos activos que pueden ser compactos o reticulares, esféricos o con una forma más irregular (Fig. 4.3). En algunos nucleolos encontrados en estas células, es posible distinguir un componente fibrilar menos denso rodeado por un componente granular más denso (Fig. 4.3a); mientras que otros nucleolos, en cambio, son más esféricos y compactos, no siendo posible distinguir los diferentes componentes (Fig. 4.3b). Ambos tipos de nucleolos son activos y, a veces, es posible encontrarlos asociados a la cromatina. Al igual que para el caso de los espermatozoides, en las ovariolas también se pueden observar, a baja frecuencia, nucleolos en anillo que implican baja actividad nucleolar. En la figura 4.3c se puede apreciar claramente un nucleolo en anillo que se detectó en una hembra portadora de un cromosoma B.

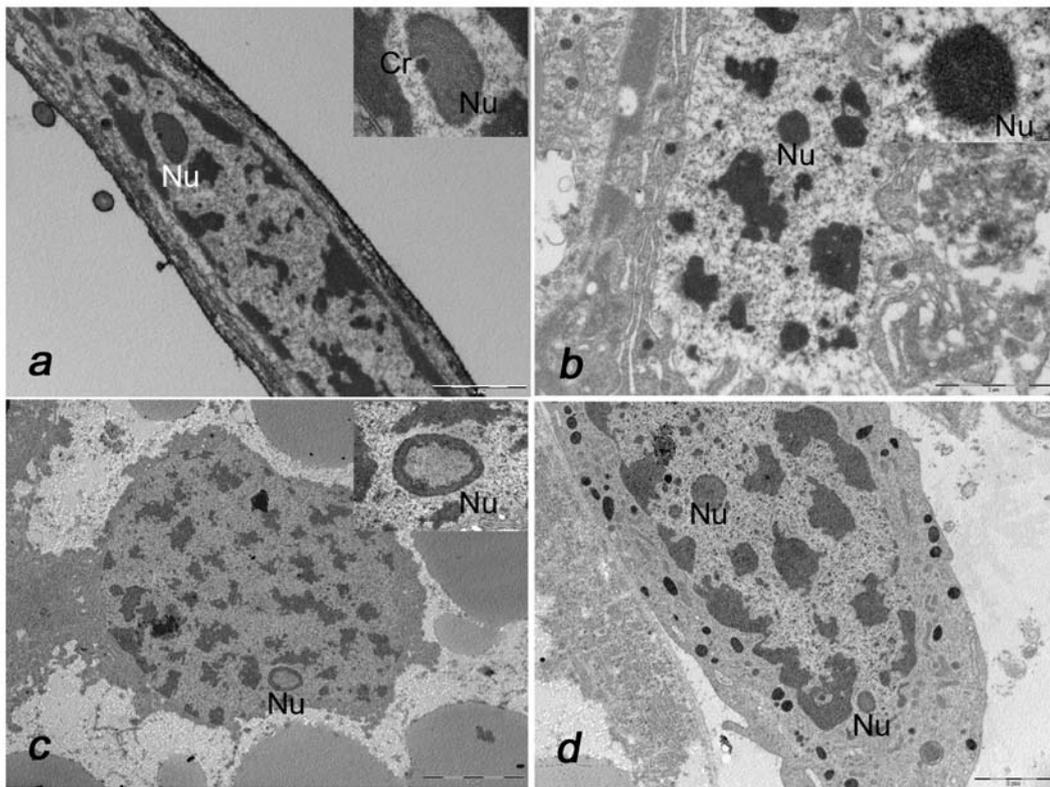


Figura 4.3. Células foliculares de ovariolas de una hembra sin cromosoma B (a y b) y de otra portadora de un cromosoma B₂₄ (c y d). *a*) Nucleolo formado por una región central fibrosa rodeada de una región granular más densa; también se observa una pequeña zona de cromatina; *b*) nucleolo esférico más compacto, *c*) nucleolo en anillo de una célula folicular de una hembra portadora de cromosoma B, *d*) célula folicular donde se observan varios nucleolos esféricos de diferente tamaño. (*Nu*, nucleolo; *Cr*, cromatina).

Ganglio de machos y hembras

El ganglio central o cerebral de los saltamontes está formado por células neuronales y gliales que se disponen en la periferia, mientras que la región central está ocupada, en su mayor parte, por el neuropilo, formado por las terminaciones nerviosas y elementos gliales. El ganglio está envuelto por el *perinerurim*, una capa de tejido conectivo encargado de segregar las fibras de colágeno que forman la *lamella neural* que protege toda la estructura (Rothschild et al. 1986).

En los cortes ultrafinos de ganglio es posible distinguir dos tipos celulares claramente diferentes, las neuronas, que son células con núcleos grandes; y las células gliales, con núcleos más pequeños (véase Fig. 4.4a). Ambos tipos celulares son metabólicamente muy activos, especialmente las neuronas, que presentan en su citoplasma gran cantidad de mitocondrias.

Tanto las neuronas como las células gliales se caracterizan por presentar nucleolos muy activos, con forma más o menos irregular, donde a veces es difícil distinguir los diferentes componentes e incluso la cromatina (Fig 4.4c, e). Sin embargo, también presentan nucleolos donde sí es posible distinguir los distintos compartimentos e incluso regiones semejantes a centros fibrilares (Fig. 4.4b, d, f). En este sentido, hay que considerar que las células nerviosas se caracterizan por presentar nucleolos compactos con un único y gran centro fibrilar (Schwarzacher & Wachtler 1993). También hemos observado nucleolos en anillo indicadores de nucleolos con baja actividad (Fig. 4.4g). No hemos observado diferencias entre sexos con respecto a la morfología de los nucleolos observados.

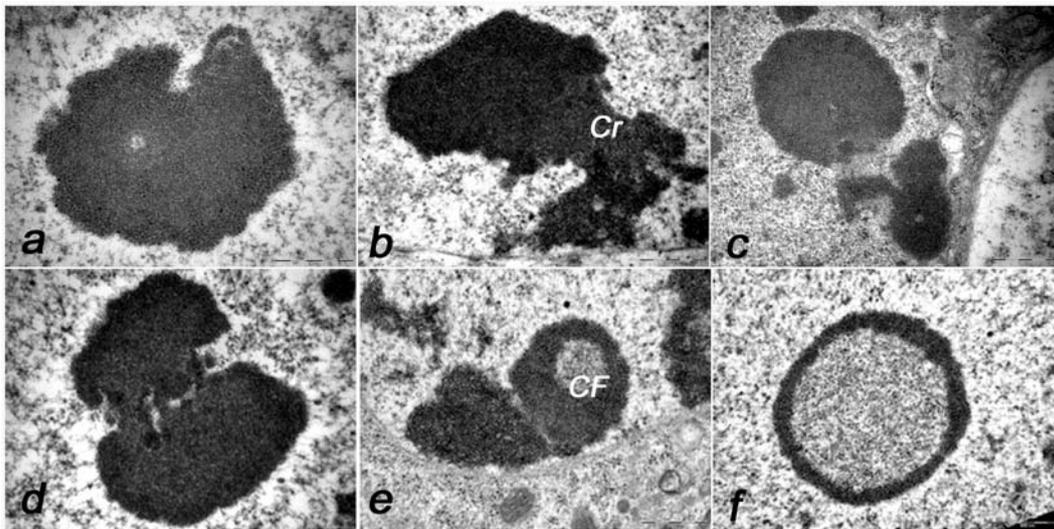


Figura 4.4. Las células nerviosas y gliales del ganglio central presentan nucleolos muy activos tanto en machos (a, b y c) como en hembras (d, e y f). *a*) Nucleolo que muestra una región semejante a un centro fibrilar, *b*) nucleolo compacto asociado a la cromatina, *c*) nucleolo donde se observan dos regiones, una externa más densa y una interna. *d*) nucleolo con forma irregular muy activo, *e*) los nucleolos de las neuronas se caracterizan por presentar un único y gran centro fibrilar y *f*) nucleolo en anillo. (*Cr*, cromatina; *CF*, Centro fibrilar).

Discusión

En la mayoría de las especies analizadas hasta ahora se han encontrado los tres mismos compartimentos nucleolares que aparecen en las células de mamíferos (centros fibrilares, el componente fibrilar denso y el componente granular) (Olson et al. 2000, Olson 2004, Derenzini et al. 2006), Este es el caso, por ejemplo, del nucleolo de los oocitos de *Locusta migratoria* (Scheer et al. 1997). También parece ser el caso de los nucleolos que hemos observado en *E. plorans*, donde hemos encontrado los tres compartimentos, aunque

únicamente en el caso de las células nerviosas. En estas células es posible observar la existencia de regiones semejantes a centros fibrilares, un componente fibrilar denso y un componente granular que lo rodea.

Por otra parte, los nucleolos encontrados en *E. plorans* pueden agruparse dentro de los distintos tipos nucleolares (nucleolos en anillo, compactos y reticulares) descritos en las células de mamíferos. En la mayoría de los casos, los nucleolos de *E. plorans* suelen ser compactos o reticulares, indicando que se trata de nucleolos muy activos.

La observación al microscopio electrónico de transmisión de los nucleolos de *E. plorans* no nos ha permitido establecer diferencias en la estructura del nucleolo que pudieran estar asociadas a la presencia de cromosomas B₂₄. En los tres tejidos y diferentes tipos celulares estudiados es posible observar nucleolos muy activos, activos o pocos activos. Los nucleolos en anillo, característicos de células con poca síntesis de ribosomas, se han observado en varios tipos celulares de machos y hembras con y sin cromosoma B. El número, tamaño y forma del nucleolo varía según el tipo celular y la etapa del ciclo celular (Derenzini 2000). En el saltamontes *E. plorans*, nosotros hemos observado que el número de nucleolos y el área nucleolar están influidos por la presencia de cromosomas B e incluso este cromosoma influye en la expresión de las NORs principales (véase apartado 4.3). Sin embargo, el presente análisis demuestra que la ultraestructura del nucleolo no parece verse afectada por la presencia de cromosomas B₂₄. Debido a la imposibilidad de identificar la cromatina del B en los cortes ultrafinos, no podemos demostrar si alguno de los nucleolos observados era o no perteneciente al cromosoma B, por lo que no podemos dar datos concretos de la estructura de los nucleolos producidos por B₂₄. Sin embargo, en todos los tejidos y células analizadas hemos encontrado nucleolos con semejante morfología, lo que nos permite descartar, a priori, un tipo de nucleolo diferente asociado al cromosoma B.

Bibliografía

- Cabrero J, Manrique-Poyato MI, Camacho JPM. 2006. Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research*, 114: 66-69.
- Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D and Thiry M. 2006. Structural and Functional Organization of Ribosomal Genes within the Mammalian Cell Nucleolus. *J Histochem. & Cytochem.* 54(2): 131-145.
- Derenzini M. and Trere D. 2001. Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *Pathologica* 93: 99-105.
- Derenzini M. 2000. The AgNORs. *Micron* 31: 117-120.
- Henriques-Gil N, Jones GH, Cano MI, Arana P and Santos JL. 1987. Female meiosis during oocyte maturation in *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera: Acrididae). *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 84-87.

- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW & Camacho JPM. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76: 633-639.
- Hewitt GM, East TM and Shaw MW. 1987. Sperm dysfunction produced by B chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 58: 59-68.
- Olson MOJ, Dunder M and Szébeni A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10: 189-196.
- Olson MOJ . 2004. The Nucleolus. Mark OJ. Olson (eds.) Landes Bioscience. Georgetown.
- Raska I. 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13: 517-525.
- Rothschild M, Schlein Y and Ito S. 1986. A colour atlas of insect tissues : via the flea. Wolfe Publishing. London.
- Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D. 1997. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Cromosoma* 105: 470-480.
- Schwarzacher HG & Wachtler F. 1993. The nucleolus. *Anat. Embryol.* 188: 515-536.
- Thiry M & Lafontaine DLJ. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* 15:194-199.

4.5. EFECTO DEL CROMOSOMA B₂₄ EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70

Introducción

El estrés producido por los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* sobre los individuos portadores se manifiesta por un efecto negativo en algunos rasgos relacionados con la eficacia biológica, principalmente la fertilidad de los huevos (Zurita et al. 1998, Muñoz et al. 1998).

La síntesis de ribosomas es muy sensible al estrés y se ha demostrado que diferentes tipos de estrés pueden inhibir la síntesis de ribosomas (Rudra & Warner 2004), lo que conlleva una disminución en el tamaño nucleolar (Olson 2004). En los machos de *E. plorans* de la población de Torrox se ha observado un tamaño nucleolar menor que en otras poblaciones, asociado a la presencia de un cromosoma B más parasítico (B₂₄) (Teruel et al. 2007).

Otro indicador del estrés que causan los cromosomas B es el incremento en la frecuencia de quiasmas, y por tanto, en la recombinación. Un estudio realizado en varias poblaciones de *E. plorans*, sugirió que el efecto del cromosoma B sobre la frecuencia de quiasmas depende del grado de parasitismo del B, de manera que los más parasíticos la incrementan en mayor medida (Camacho et al. 2002).

Las principales proteínas implicadas en la respuesta al estrés son las llamadas proteínas de choque térmico, (Hsp, Heat shock proteins). Estas proteínas se agrupan en diferentes familias de acuerdo con su peso molecular, de manera que existen 5 familias diferentes, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y unas familias de proteínas Hsp de pequeño tamaño. La presencia de las proteínas Hsp está relacionada con la adquisición de termotolerancia y la resistencia térmica, especialmente en el caso de la proteína Hsp70 (Morcillo et al. 1997).

La proteína Hsp70 es una chaperona de estrés térmico que ayuda a la estabilidad de las proteínas durante el plegamiento, pero también participa en otros aspectos de la homeostasis celular, como la regulación de la transcripción y el tráfico y degradación de proteínas. Cuando se activa esta proteína bajo condiciones de estrés térmico pasa de una localización citoplasmática y nuclear a localizarse preferentemente en el nucleolo (Pelhma 1984), evitando así el desensamblaje nucleolar causado por el incremento de temperatura, ya que este compartimiento nuclear, esencial para la viabilidad celular, es muy sensible a la temperatura (Pelhma 1984, Morcillo et al. 1997). No se conoce exactamente el nivel al que actúa la proteína Hsp70. Algunos autores relacionan esta proteína con el transporte de determinadas proteínas y riboproteínas (RNP) entre el nucleolo y el citoplasma (Pelhma 1984), mientras que otros autores creen que tiene una función importante en las primeras etapas de la biogénesis de los ribosomas (véase Morcillo et al. 1997).

El estrés térmico conlleva una sobreexpresión de Hsp70. Los altos niveles de Hsp70 también están asociados a otro tipo de estrés, como el causado por las radiaciones, los metales pesados, la salinidad o el parasitismo (véase Sørensen et al. 2003, Pedersen et al. 2005) e incluso el estrés genético (Wheeler et al. 1999, Krsitensen et al. 2002). Las proteínas Hsp70 también están relacionadas con el proceso de envejecimiento, la apoptosis e incluso se utilizan como un bioindicador de la contaminación ambiental (dePomerai 1996, Warchalowska-Sliwa et al. 2005).

En este apartado hemos medido los niveles de expresión de la proteína Hsp70, como un indicador del posible estrés genético causado por el cromosoma B₂₄, en machos y hembras del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* de la población de Torrox.

En el caso de los machos, hemos considerado dos enfoques diferentes. Por un lado, hemos comparado los niveles de expresión en machos con y sin cromosoma B de dos poblaciones diferentes, Salobreña y Torrox, en las que el cromosoma B muestra diferentes características de virulencia y transmisión. Por otro lado, y para los machos de la población de Torrox, hemos comparado los niveles de expresión de la Hsp70 en individuos con y sin cromosoma B expuestos a diferentes temperaturas. Este análisis nos permitió medir, de manera más directa, la posible relación entre los cromosomas B₂₄ y los niveles de Hsp70 en la población de Torrox y, en consecuencia, el posible efecto que los cromosomas B pudieran tener sobre los individuos portadores. Este trabajo se realizó en 2006 en el Departamento de Ecología y Genética del Instituto de Biología de la Universidad de Aarhus (Dinamarca) bajo la supervisión del profesor Dr. Volker Loeschcke.

Debido a los resultados obtenidos en los machos, para las hembras de la población de Torrox, sólo hemos estudiado el posible efecto del número de cromosomas B en los niveles de expresión de la proteína Hsp70, trabajo que hemos realizado en nuestro laboratorio.

Material y Métodos

Los machos del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* fueron capturados durante el mes de agosto de 2006 en dos poblaciones españolas (Salobreña, provincia de Granada, y Torrox, provincia de Málaga). Estos individuos fueron operados para extraerles varios folículos testiculares que se fijaron en etanol:acético (3:1). El número de cromosomas B que presentaba cada individuo se determinó a microscopia óptica en preparaciones de folículos testiculares con orceína acética al 2% (Tabla 4.1). La muestra de hembras fue capturada solamente en la población de Torrox en octubre del 2007. La presencia de cromosoma B en las hembras se determinó, en vivo, mediante bandeo C de preparaciones de hemolinfa, siguiendo el protocolo descrito en Cabrero et al. (2006). Para conocer el tipo y número exacto de cromosomas B de las hembras

portadoras, realizamos bandeó C en algunas ovariolas que habían sido sometidas a colchicina al 2% durante 6 horas, fijadas en etanol:acético (3:1), y conservadas a 4 °C (Tabla 4.1).

Los machos de la población de Torrox se dividieron en dos grupos para someterlos a tratamientos con diferente temperatura. Los experimentos se realizaron en un baño termostático de agua, donde se incubaron los individuos durante 1 hora en recipientes independientes y a dos temperaturas distintas: 25 °C y 42,2 °C. Los machos de la población de Salobreña únicamente fueron expuestos a 25 °C. Posteriormente, cada recipiente se dejó reposar durante 1 hora en una habitación a 25 °C para que se estabilizase la expresión de la proteína Hsp70. Finalmente, se diseccionaron los individuos extrayendo de cada uno el ganglio y los folículos testiculares, que fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C hasta su utilización.

La extracción de proteínas se hizo homogenizando cada tejido en PBS con una mezcla de antiproteasa (100 µg/ml pepstain A, 50 µg/ml leupeptin, 10 mM benzamidine, 10 mM sodium metabisulfite) y 200 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF). El homogenizado fue centrifugado a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante, donde se encuentran las proteínas, fue transferido a un vial nuevo. A continuación se determinó la cantidad de proteína total mediante el método BCA (BCA™ Protein Assay, Pierce). Este método se basa en la reacción de Biuret. Utiliza el ácido bicinónico que, al reaccionar con proteínas con cobre (Cu²⁺) en medio alcalino, forma un complejo púrpura intenso cuantificable mediante espectrofotometría. El material extraído y cuantificado se conservó a -80 °C hasta su utilización.

Tabla 4.1. Muestras analizadas mostrando el número de individuos con diferente número de cromosoma B de cada una de las poblaciones.

Población	Sexo	Temp. (°C)	Número de Cromosomas B					Total
			0B	1B	2B	3B	5B	
Salobreña	Machos	25	4	5	1	1	0	11
Torrox	Machos	25	4	5	5	1	0	15
		42,2	4	5	5	1	1	16
	Hembras	-	10	12	12	3	-	37

En el caso de las hembras, las ovariolas y el ganglio fueron directamente diseccionados, introducidos inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La extracción de las proteínas se realizó utilizando el mismo protocolo que para los machos, aunque en este caso el tampón de homogenizado estaba formado por RIPA Buffer (R 0278, Sigma), un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) y 10% de SDS (para más detalle véase Material y Métodos). La cuantificación de proteínas se realizó por el método BCA (QuantiProTM BCA Assay, Sigma).

Los niveles de proteína Hsp70 se determinaron mediante *Western blotting*. Para comparar entre individuos hemos empleado la misma cantidad de proteína total por individuo, de modo que para las muestras de testículo se han empleado 20 μg de proteína total por individuo, para las muestras de ovariolas se utilizaron 60 μg , y para las muestras de ganglio 8 μg de proteína total, tanto en machos como en hembras.

En el análisis de las muestras de los machos, las proteínas fueron separadas en geles de poliacridamida al 10% (PAGEr Duramide Precast Gel, Cambrex) y transferidas, mediante un sistema húmedo de transferencia, a membranas de PVDF (ImmobilomTM P Transfer Membranes, Millopor). En el caso de las muestras de hembras, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (NUPGE[®] 10% Bis-Tri Gel, invitrogen). La transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (Amersham HybondTM-P) se ha realizado utilizando el sistema de transferencia semihúmedo, (TRANS-BLOT[®] SR Semi-dry transfer cell, de BioRad).

Todas las membranas fueron incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una dilución 1:5000 del anticuerpo Hsp70 (ma3-006 3A3, Affinity BioReagents) durante 16 horas. Este anticuerpo reconoce una región de la proteína implicada en la localización nucleolar después de estrés. Se ha usado el anticuerpo secundario Ig-anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish-peroxidasa proteins) (Stabilized Goat anti-mouse HRP-conjugate, Pierce), diluido 1:1000 e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. La detección se ha llevado a cabo por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Pico, Chimioluminescent Substrate (Pierce) y el lector de imagen de geles Versa DOCTM Imagen System 1000 Model (BioRad). Los niveles de intensidad de la proteína Hsp70 se han medido con el software asociado a dicho lector de imagen, Quantity One 4.3.1. Las medidas, en el caso de las muestras de hembras, se realizaron en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC).

En el caso de las muestras de los machos normalizamos los datos para poder comparar entre geles. Para esta normalización, partimos de un gel al azar. Los datos de este gel se normalizaron a partir de los datos de otro gel que debía de compartir con él al menos tres muestras diferentes. A continuación, normalizamos los datos de este segundo gel eligiendo otro gel, que fuese diferente al primer gel, y que volviese a compartir tres muestras diferentes con él, y así sucesivamente. Mediante ANOVAs de 1 y 2 vías hemos estudiado la existencia de efectos poblacionales, de la temperatura y del número de

cromosomas B. Como variables dependientes se han usado los datos de intensidad (*Peak*) de quimioluminiscencia medidos a partir de las fotografías tomadas con el sistema de documentación de geles. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS®.

En las hembras medimos la intensidad de la proteína Hsp70 como intensidad de emisión por área coloreada, a partir de las fotografías tomadas con el analizador de geles. En cada gel se incluyó un control interno común, formado por una mezcla de todas las muestras que fueron procesadas. Cada gel se corrió en paralelo con una réplica, puesto que el sistema de electroforesis admite dos geles al mismo tiempo. En la réplica, las muestras se cargaron en orden inverso, quedando los geles como imágenes especulares, es decir, el orden de las muestras era el mismo pero invertido en uno de los geles con respecto al otro. Este hecho nos ha permitido observar la existencia de un error sistemático a lo largo de todo el proceso: la intensidad de la proteína Hsp70 disminuía siempre de izquierda a derecha en los dos tipos de geles, es decir, la intensidad de la proteína Hsp70 dependía de la calle en la que se cargaba la muestra en el gel, lo cual puede atribuirse al aparato de transferencia. La muestra del control interno nos han servido para calcular el error sistemático ocurrido a lo largo de toda la técnica en uno de los dos tipos de geles. Para ello, cargamos dos geles con la misma cantidad de muestra control en todas las calles. El resultado de estos geles control nos ha permitido calcular, mediante una regresión múltiple, la función $y' = \text{valor_actual} / (1 - 0,0735 * (\#calle - 1))$, que nos permite corregir este error sistemático. Posteriormente, considerando el control interno con valor 1, hemos normalizado los datos de cada gel para poder comparar entre muestras de distintos geles. Con el programa STATISTICA® se han realizado ANOVAs de una vía para determinar el efecto de los cromosomas B₂₄ sobre los niveles de la proteína Hsp70.

Resultados

Niveles de la proteína Hsp70 en testículo y ganglio de machos

Mediante un ANOVA de 2 vías, con población y número de cromosomas B como factores, detectamos que en testículos hay diferencias significativas entre las dos poblaciones con respecto a los niveles de proteína Hsp70, siendo éstos, en general, más altos en Salobreña que en Torrox (véase Tabla 4.2 y Fig. 4.5a). Sin embargo, el mismo análisis realizado para las muestras de ganglio, no indicó diferencias entre estas poblacionales (véase Tabla 4.2 y Fig. 4.6b). Este resultado sugiere que los niveles de Hsp70 en testículo son mayores en Salobreña que en Torrox, no observándose diferencia en ganglio.

Pero los ANOVAs de la Tabla 4.2 demostraron, además, la existencia de un efecto asociado al número de cromosomas B en los dos tejidos analizados. Sin embargo, al estudiar las poblaciones por separado, mediante ANOVAs de una vía, el efecto del número de Bs sólo se mantuvo en Torrox y para el testículo

pero no para el ganglio (Tabla 4.3). Como se observa en la Figura 4.5, los niveles de Hsp70 disminuyen conforme aumenta el número de cromosomas B₂₄ en Torrox.

Tabla 4.2. ANOVA de 2 vías para analizar posibles efectos poblacionales y de los cromosomas B sobre los niveles de Hsp70 en los machos

Tejido	Factor	df	F	p
Testículo	Número de cromosomas B	1,39	12,19	0,001
	Población	1,39	14,45	<0,0001
Ganglio	Número de cromosomas B	1,27	4,93	0,033
	Población	1,27	0,03	0,861

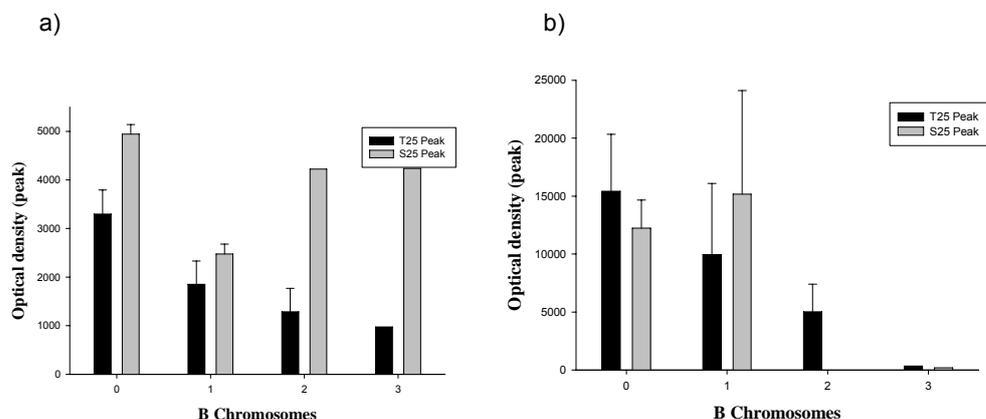


Figura 4.5. Diferencias entre las poblaciones de Salobreña (con B₂) y la de Torrox (con B₂₄) con respecto a los niveles de expresión de la proteína Hsp70 en los machos. *a)* Para los folículos testiculares se han encontrado que existen diferencias significativas entre ambas poblaciones, presentando la población de Salobreña mayores niveles de expresión. *b)* En el caso del ganglio no existen diferencias significativas entre poblaciones. T25= Torrox, S25= Salobreña.

Tabla 4.4. ANOVAs de 2 vías para determinar el efecto de la temperatura en los niveles de Hsp70 en la muestra de machos adultos recogida de la población de Torrox.

Tejido	Factor	<i>df</i>	F	p
Testículo	Número de cromosomas B	1,28	10,98	0,003
	Temperatura	1,28	0,35	0,56
Ganglio	Número de cromosomas B	1,27	3,92	0,058
	Temperatura	1,27	0,43	0,52

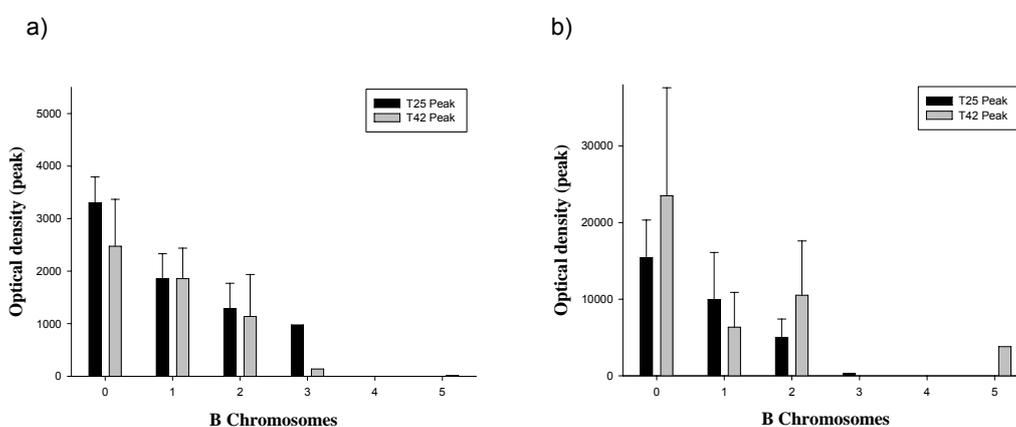


Figura 4.6. Diferencias en los niveles de expresión de la proteína Hsp70 en los machos de la población de Torrox (B_{24}) a diferentes temperaturas. En general, se observa que no existen diferencias en el nivel de expresión de Hsp70 con respecto a la temperatura. También se observa que en folículos testiculares (a) los niveles de esta proteína disminuyen conforme aumenta el número de cromosomas B, mientras que en ganglio (b) parece haber un efecto similar aunque más débil, no alcanzando la significación. T25= Torrox a 25 °C, T42= Torrox a 42.2 °C.

Para analizar el efecto de los cromosomas B a las dos temperaturas experimentales utilizadas para la muestra de Torrox (25 °C y 42,2 °C) realizamos un ANOVA de doble vía. En testículo, observamos la ausencia de efectos asociados a la temperatura pero, de nuevo, eran patentes las diferencias debidas al número de cromosomas B (Tabla 4.4). En ganglio, sin embargo, no había diferencias significativas asociadas a la temperatura o al número de cromosomas B (Tabla 4.4), aunque en este último caso se insinúa un patrón decreciente recordando al observado para testículo (véase Fig. 4.6b).

El efecto de los cromosomas B sobre los niveles de proteína Hsp70, en Torrox, mostró un patrón dependiente de la dosis, es decir, los niveles de Hsp70 fueron menores conforme aumentaba el número de cromosomas B (véase Fig. 4.6). Este patrón aparecía en las muestras de ambos tejidos, siendo altamente significativo para testículo y marginalmente significativo para el ganglio (ver Tabla 4.4).

Niveles de la proteína Hsp70 en hembras de la población de Torrox

Puesto que en los machos de *E. plorans* de la población de Torrox no encontramos efecto de la temperatura sobre los niveles de expresión de la proteína Hsp70, para el análisis realizado en hembras no hemos considerado este parámetro. Para analizar la muestra de hembras, hemos realizado, tanto en las muestras de ovariolas como de ganglio, un ANOVA de 1 vía considerando como variable dependiente la cantidad relativa de proteína Hsp70 y el número de cromosomas B como factor. Al igual que en el caso de los machos, observamos un efecto negativo y significativo del número de cromosomas B sobre los niveles de la proteína Hsp70 (Tabla 4.4), y este efecto era patente en ovariolas pero no en ganglio. Por tanto, los niveles de Hsp70 en ovario decrecen conforme aumenta el número de cromosomas B (Fig. 4.7a). En ganglio, sin embargo, aunque se insinúa un patrón similar (Fig. 4.7b), las diferencias no alcanzaron la significación (véase Tabla 4.4).

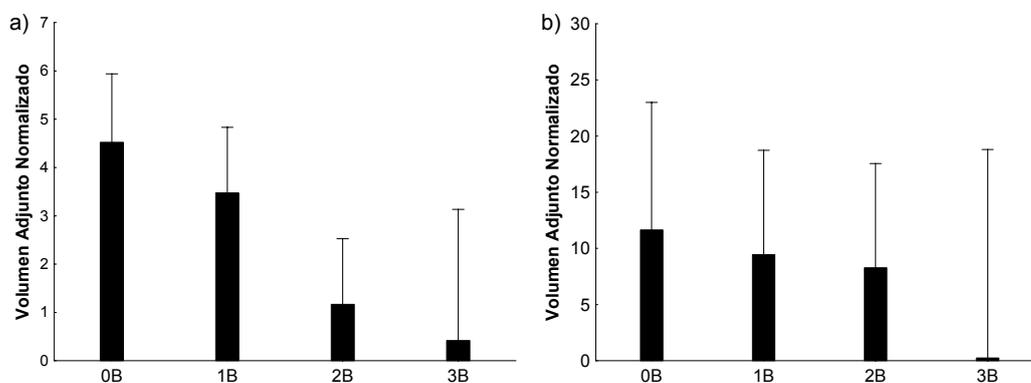


Figura 4.7. Diferencias en los niveles de expresión de la proteína Hsp70 en hembras de la población de Torrox en ovariolas (a) y ganglio (b). Para ambos tejidos se observó un patrón decreciente en los niveles de Hsp70 relacionado con el número de cromosomas B, aunque este efecto sólo es significativo en las ovariolas.

Discusión

El choque térmico altera drásticamente la estructura del nucleolo y produce cambios en la expresión de determinados genes y en la localización de determinadas proteínas en las células (Liu et al. 1996, Pelhma 1984, Morcillo et al. 1997). La proteína Hsp70 es la principal proteína de choque térmico implicada en la respuesta a las condiciones de estrés. Existen dos formas para esta proteína, la proteína Hsc70, que se expresa constitutivamente y la proteína inducible Hsp70, cuya expresión se induce bajo condiciones de estrés (Qui et al. 2002, Morcillo et al. 1997). También se ha demostrado que bajo condiciones de estrés térmico, la proteína Hsp70 presente en la célula pasa de localizarse en el citoplasma o en el núcleo de la célula a concentrarse preferentemente en el nucleolo (Pelhma 1984). La función que esta proteína tiene en el nucleolo está relacionada con el ensamblaje y mantenimiento del nucleolo en condiciones adversas, ya que se conoce que este compartimento nuclear es muy sensible al estrés térmico (Pelhma 1984, Morcillo et al. 1997).

En el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* de la población de Torrox no hemos detectado diferencias en los niveles de Hsp70 asociados a incrementos de temperatura. Los individuos de esta población pueden estar sometidos, en las poblaciones naturales, a temperaturas más altas que los 42,2 °C del tratamiento experimental. Esta es una característica general de los saltamontes, sobre todo cuando se quedan parados al sol, una práctica muy habitual que utilizan para incrementar su temperatura corporal y favorecer algunos procesos metabólicos que incrementan la fecundidad, tales como la producción de huevos o de espermatozoides. En general, los saltamontes son insectos termotolerantes y muchas de la especies están acostumbradas a vivir en ambientes expuestos a altas temperaturas. Así, por ejemplo, la langosta *Locusta migratoria* está expuesta a más de 50 °C en su hábitat natural (Qin et al. 2003). En los saltamontes se ha constatado que la inducción de la proteína Hsp70, en condiciones de estrés térmico, ocurre a 45 °C (Qin et al. 2003, Singh & Lakhotia 2000), por lo que la exposición a 42,2 °C durante 1 hora puede que no haya sido suficiente para inducir cambios en la expresión de la proteína Hsp70. Además, el anticuerpo primario utilizado en este estudio reconoce una región de la proteína Hsp70 implicada en la localización nucleolar inducida bajo condiciones de estrés. Sin embargo, este epítipo está presente en varias proteínas de la familia Hsp70, por lo que el anticuerpo reconoce tanto la proteína constitutiva, Hsc70, como la proteína inducible Hsp70. Esto puede implicar una mayor dificultad para detectar cambios en los patrones de expresión de Hsp70. Para diferenciar entre ambos tipos de proteínas sería necesario realizar una electroforesis bidimensional.

En testículo, los niveles de la proteína Hsp70 fueron mayores en la población de Salobreña que en la de Torrox, no observándose diferencia significativa en ganglio. En Torrox, además, el cromosoma B₂₄, que es la variante más parasítica de las encontradas hasta ahora en *E. plorans*, está asociada con disminuciones en los niveles de Hsp70 proporcionales al número de Bs. Esta situación fue sorprendente, pues a priori justamente esperábamos lo contrario.

Una explicación alternativa sería considerar que los niveles detectados de esta proteína están poniendo de manifiesto un efecto negativo del B que implica una disminución de la capacidad de respuesta al estrés. Este efecto se manifestaría tanto a nivel poblacional (en Salobreña se observan mayores niveles de Hsp70 asociados a una variante cromosómica menos virulenta) y a nivel individual en Torrox (con individuos portadores de mayor número de cromosomas B_{24} presentando muy bajos niveles de Hsp70). Evidencias del mayor grado de virulencia de B_{24} han sido aportadas por nuestro grupo en estudios anteriores (Zurita et al. 1998, Camacho et al. 2002, Teruel et al. 2007). El hecho de que el efecto del B consiste en disminuir los niveles de Hsp70 es compatible con la observación de que, en poblaciones naturales sujetas a factores estresantes durante largos periodos, se observan niveles muy bajos de esta proteína (véase Sørensen et al. 2003). En experimentos realizados en laboratorio, los individuos y células sometidos a estrés térmico muestran un incremento en la expresión de la proteína inducible Hsp70. En cambio, los análisis realizados en poblaciones naturales de *Drosophila* muestran una disminución en los niveles de Hsp70 inducible cuando estas poblaciones están sometidas a un estrés constante (Sørensen et al. 1999, 2003). También se ha observado una disminución de los niveles de Hsp72 en una población del saltamontes *Tetrix tenuicornis* expuesta a metales pesados (Warchalowska-Sliwa et al. 2005). Es posible que en las poblaciones naturales frecuentemente expuestas a estrés, el costo de la expresión de Hsp70 sea mayor que el beneficio producido, por lo que las poblaciones se adaptan por otros medios al estrés al que están sometidas (Sørensen et al. 2003).

La disminución de los niveles de Hsp70 en presencia del cromosoma B_{24} podría ser una consecuencia colateral de la disminución del área nucleolar asociada a la presencia de este cromosoma en la población de Torrox (Teruel et al. 2007), dado que una de las funciones de esta proteína tiene relación con el ensamblaje y mantenimiento del nucleolo en condiciones adversas (Pelhma 1984, Morcillo et al. 1997), y nucleolos de menor tamaño lógicamente requieren menores cantidades de Hsp70 para su mantenimiento. Esto explicaría por qué en la población de Salobreña, donde el cromosoma B predominante (B_2) se encuentra neutralizado por el genoma hospedador (Camacho et al. 1997), y es menos parasítico que B_{24} (Camacho et al. 2002), tanto el tamaño nucleolar como los niveles de Hsp70 sean significativamente superiores a los observados en la población de Torrox (Teruel et al. 2007).

Es interesante resaltar el hecho de que el cromosoma B_{24} disminuye los niveles de la proteína Hsp70 en el tejido gonadal, tanto de machos como de hembras. Estos efectos, sin embargo, no se apreciaron en los machos analizados de la población de Salobreña (donde el B más frecuente es B_2). Puesto que B_{24} se originó a partir de B_2 , B_{24} es indudablemente más joven que B_2 . Teniendo en cuenta, además, que los cromosomas B en *E. plorans* siguen una dinámica evolutiva caracterizada por un comienzo parasítico, merced al cual realizan una rápida invasión de nuevas poblaciones, seguido por la neutralización de su exceso de transmisión y la amortiguación de algunos de sus efectos deletéreos sobre los individuos portadores (Camacho et al. 1997), es

lógico pensar que la situación en Salobreña y Torrox son un fiel reflejo del estado evolutivo en que se encuentran los cromosomas B que hay en cada población: más neutralizado para el B más antiguo (B_2) y más parasítico para el B más joven (B_{24}).

En el ratón *Apodemus flavicollis*, se ha descrito que los individuos portadores de cromosoma B presentan altos niveles de expresión de varias proteínas, entre las que destaca la chaperona que contiene TCP1 (Chaperonin containing TPC-1, subunit 6b (zeta), CCT6B) (Tanic et al. 2005). Esta proteína funciona ayudando al plegamiento de otras proteínas recién sintetizadas en el citosol de los eucariotas, entre las que destaca la tubulina (Kubota et al. 1995, Wilson & Horwich 1996, Lewis et al. 1996) La importancia de la tubulina, como componente mayoritario de los microtúbulos, durante la formación del huso acromático en las divisiones celulares, hace a esta chaperona una buena aliada de los cromosomas B, ya que es de esperar que éstos encuentren un ambiente más favorable para la transmisión si hay abundancia de tubulina. Tanic et al. (2005) interpretaron la mayor expresión del gen para TCP1 como un estado adquirido por la presencia de los cromosomas B que, además de beneficiar al B beneficiaría a los individuos portadores al permitirles una mayor rapidez de respuesta y eficiencia frente al estrés. Sería interesante analizar la expresión de esta proteína en *E. plorans*, especialmente porque se trata de un efecto potencialmente diferente al observado para la Hsp70, al actuar TCP1 en el citosol mientras que Hsp70 tiene un comportamiento paralelo al del tamaño nucleolar, por lo que suponemos que el efecto que hemos detectado se circunscribe a nivel de este orgánulo.

Los resultados negativos observados para el ganglio pueden deberse al hecho de que se trata de un tejido somático, que normalmente suele ser menos sensible a factores estresantes que el tejido gonadal. De hecho, en *E. plorans*, Martín-Alganza et al. (1997) no observaron efectos significativos de los cromosomas B_2 sobre una serie de caracteres somáticos a los niveles morfológico y fisiológico, estando éstos más bien circunscritos a la fertilidad de los huevos (Zurita et al. 1998, Muñoz et al. 1998) y a la frecuencia de quiasmas (Camacho et al. 2002). La ausencia de efectos sobre los niveles de Hsp70 en ganglio, por tanto, es congruente con la ausencia de efectos sobre otros caracteres somáticos, siendo ésta una estrategia esperada de un parásito genómico, que debería ejercer pocos efectos deletéreos al nivel somático y los que fuesen necesarios al nivel germinal, dado que es en éste último donde se juegan su transmisión y, por tanto, su destino evolutivo (Camacho 2005). Además, se ha demostrado que la expresión de las proteínas del choque térmico suele variar entre tejidos (Singh & Lakhota, 2000, Lakhota et al. 2002). Concretamente, se ha demostrado que el nivel de expresión de *hsp70*, en el saltamontes *Spathosternum prasiniferum*, es mayor en ovariolas que en testículo, donde la principal proteína implicada en el choque térmico es Hsp64, que parece estar relacionada con la adquisición de termotolerancia en este tejido (Singh & Lakhota 2000).

Aunque el número de cromosomas B₂₄ está asociado con menores niveles de expresión de la proteína Hsp70 en la población de Torrox, son necesarias evidencias más directas para establecer la causalidad de esta asociación con el posible estrés genético que este cromosoma B puede ejercer en la población de Torrox. No hay que olvidar que estos saltamontes son abundantes en zonas de cultivo, por lo que se encuentran expuestos también a varios factores ambientales estresantes, como por ejemplo, los pesticidas. También sería interesante confirmar si los niveles de expresión de otras proteínas, tales como TCP1, Hsp64, y otras chaperonas, están alterados.

Bibliografía

- Cabrero J, Manrique-Poyato MI, Camacho JPM. 2006. Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 114: 66-69.
- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A, Perfectti F. 2002. Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 269: 2173-2177.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. 2000. B chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 163-178.
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD, Shaw MW. 1997. Evolution of a near-neutral B chromosome. pp 301-318. In: *Chromosomes Today* (eds. Henriques-Gil N, Parker JS & Puertas MJ), Chapman and Hall, London, 12.
- dePomerai D. 1996. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human & Experimental Toxicology* 15(4): 279-285.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76: 633-639.
- Jones RN & Rees H. 1982 B chromosome. New York: Academic Press.
- Kristensen TN, Dahlgard J, Loeschcke V. 2002. Inbreeding affects HSP70 expression in two species of *Drosophila* even at benign temperature. *Evol. Ecol. Res.* 4: 1209-1216.
- Kubota H, Hynes G, Willison K. 1995. The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1): multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* 230: 492-498.
- Lakhota SC, Srivastava P, Prasanyh K. 2002. Regulation of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp64, in heat-shocked Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress & Chaperones* 7 (4): 347-356.
- Lewis SA, Tian G, Vainberg IE and Cowan NJ. 1996. Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* 132: 1-4.

- Liu Y, Liang S, Tartakoff AM. 1996 Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear proteins import and poly(A)⁺ RNA export. *The EMBO J.* 15(23): 6750-6757.
- Morcillo G, Gorab E, Tanguay RM, Díez JL. 1997. Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in paquitene cells. *Experimental cell Research* 236: 361-370.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1998. Parallel effect of a B chromosome and a mite decreasing female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 265: 1903-1909.
- Olson MOJ. 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004: e10
- Pedersen KS, Kristensen TN, Loeschke V. 2005. Effects of inbreeding and rate of inbreeding in *Drosophila melanogaster*- Hsp70 expression and fitness. *J. Evol. Biol.* 18: 756-762
- Pelham 1984. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3(13): 3095-3100.
- Qin W, Tyshenko MG., Wu BS, Walter VK, Robertson RM. 2003. Cloning and characterization of a member of the hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress & Chaperones* 8: 144-152.
- Rudra D, Warner JR. 2004. What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev* 18: 2431-2436.
- Singh AK, Lakhota SC. 2000. Tissue-specific variations in the induction of Hsp70 and Hsp64 by heat shock in insect. *Cell Stress & Chaperones* 5 (2): 90-97.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschke V , 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6: 1025-1037.
- Sørensen JG, Michalak P, Justesen J, Loeschke V. 1999. Expression of heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal reistence. *Hereditas* 131: 155-164.
- Tanic N, Vujosevic M, Dedovic-Tanic N, Dimitrijevic B. 2005 Differential gene expression in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) with and without B chromosomes. *Chromosoma* 113(8): 418-427.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2007 Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* 15 (6): 755-765.
- Warchalowslca-Śliwa E, Niklińska M, Görlich A, Michailova P, Pyza E. 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic change in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental Pollution* 133: 373-381.
- Wilson K and Horwich AL. 1996. Structure and function of chaperonins i archebacteria and eukariotic cytosol. pp 107-136. In Ellis RJ (ed). *The chaperonins*. Academic Press, San Diego.

Wheeler, JC, King, V, Tower, J. 1999. Sequence requirements for upregulating expression of drosophila hsp70 trasgenes during aging. *Neurobiol. Aging* 20: 545-553.

Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274-277.

4.6. ANALISIS DE LOS EFECTOS CITOLÓGICOS DERIVADOS DE LA PRESENCIA DEL CROMOSOMA B₂₄

Introducción

La mayoría de los efectos de los cromosomas B₂₄ detectados hasta el momento han sido sobre rasgos relacionados con la fertilidad de las hembras (Zurita et al. 1998), pero también sobre rasgos intracelulares como el área nucleolar (Teruel et al. 2007, Teruel et al. 2008) o la frecuencia de quiasmas (Camacho et al. 2002). Puesto que los cromosomas B son parásitos intragenómicos, cabría esperar encontrar mayores efectos a nivel celular que a niveles superiores de organización, puesto que estos últimos podrían quedar amortiguados por la regulación fisiológica individual.

La presencia de cromosomas B en los individuos portadores implica un incremento en la cantidad de DNA de las células, que suele ir acompañado, generalmente, por un aumento del tamaño celular (véase Camacho 2005). Además, las células que portan varios cromosomas B tienen más cantidad de DNA que replicar y reparar, por lo que en ellas el ciclo celular debe requerir más tiempo. Esto se ha constatado, por ejemplo, en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus*, donde el efecto de los cromosomas B a nivel celular se manifiesta a nivel individual en un desarrollo más lento de los portadores (véase Camacho 2005).

El cromosoma B₂₄ tiene un tamaño de 781×10^6 pb (Cabrero et al. datos no publicados), lo que supone un incremento de aproximadamente el 10% en la cantidad de DNA de las células portadoras con respecto al genoma 0B (7900×10^6 pb). Este incremento, que lógicamente es proporcionalmente mayor en los individuos portadores de varios cromosomas B, podría influir tanto en el tamaño celular como en la duración del ciclo celular. Otra posibilidad es que la presencia del cromosoma B pueda causar cierto grado de estrés genético que desencadene la respuesta apoptótica, o que al menos eleve la tasa de apoptosis celular.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite el recuento rápido de partículas o células en un fluido en suspensión al pasar a través de un haz de láser focalizado, al mismo tiempo que mide varias características celulares (Shapiro 1988). El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores, que las convierten en señales electrónicas que posteriormente son digitalizadas, para permitir la medida simultánea de varios parámetros de una misma célula (para más información véase Ormerod 1994). Los parámetros habituales generados por el citómetro son cinco: dos de dispersión y tres de fluorescencia. Las señales de dispersión se basan en la dispersión del haz de luz al pasar la célula a través de él, por lo que miden características morfológicas de las células. Así, la dispersión de la luz en un ángulo cónico pequeño ($0-10^\circ$) da una medida del tamaño relativo de las células (FSC, Foward Scatter); mientras que la luz dispersada en ángulo

recto (90°) mide la granularidad relativa o complejidad interna de las células (SSC, Side Scatter). Los datos de fluorescencia son señales basadas en el uso de sustancias fluorescentes o en el de anticuerpos monoclonales unidos a moléculas fluorescentes, por lo que miden características antigénicas, biofísicas y/o bioquímicas de las células. Los parámetros de fluorescencia permiten específicamente diferenciar entre subpoblaciones celulares. La principal ventaja de esta tecnología es que permite medir en poca cantidad de tiempo un número estadísticamente significativo de células (100.000 células/minuto) con alta sensibilidad y objetividad (Ormerod 1994).

El estudio del ciclo celular, de los niveles de ploidía y cantidad de DNA, y el recuento de células o partículas de una determinada muestra, son varias de las aplicaciones que tiene el uso del citómetro de flujo (Ormerod 1994).

Esta técnica también es muy utilizada en investigación biomédica y en medicina clínica para el estudio y el diagnóstico de determinadas enfermedades tumorales, aunque también se utiliza en otras áreas de la investigación como en biología molecular, proteómica o en ecología.

La mayoría de las aplicaciones parten de cultivos celulares, que se caracterizan por ser homogéneos al estar formados por un único tipo celular y estar todas las células sincronizadas en la misma fase del ciclo celular. Sin embargo, estos protocolos se pueden adaptar para otros tipos de tejidos.

En este apartado presentamos el estudio por citometría de flujo de células con y sin cromosoma B, para detectar los posibles efectos que el cromosoma B₂₄ pudiera tener sobre la morfología celular y las tasas de división celular y apoptosis.

Material y Métodos

El estudio del efecto de los cromosomas B₂₄ a nivel citológico se llevó a cabo en dos muestras del saltamontes *E. plorans* obtenidas en años diferentes. La primera muestra estaba constituida por machos y hembras de *E. plorans* capturados en la población de Torrox 4 en 2003, a los que se les diseccionó el ganglio cerebral para realizar los análisis por citometría de flujo de parámetros morfométricos de tamaño, complejidad interna celular y ciclo celular. Sin embargo, los estudios realizados con citometría de flujo son más fiables cuando las muestras son homogéneas y los individuos se encuentran en la misma fase del ciclo biológico (Ormerod 1994), especialmente para los experimentos del ciclo celular y de apoptosis. Por ello, la segunda muestra utilizada estuvo formada por individuos adultos, nacidos en el laboratorio a partir de puestas de hembras capturadas en la población de Torrox 4 en 2005. Así se consiguió que los individuos analizados tuviesen la misma edad y constituyeran una muestra más homogénea. Esta muestra estuvo formada por 11 machos y 12 hembras. En los machos se diseccionó el ganglio y los folículos testiculares, y en las

hembras solamente las ovariolas. En estos tres tejidos se estudió la apoptosis y los parámetros morfométricos de tamaño y complejidad interna. En los folículos testiculares se estudió, además, el ciclo celular.

Uno de los requisitos para el análisis celular por citometría de flujo es que las partículas, células, núcleos o cromosomas se encuentren en suspensión. Cuando se trabaja con tejidos se debe proceder a la disgregación de estos. Esta suspensión celular debe contener el mínimo posible de restos y agregados celulares para minimizar los errores de cuantificación (Ormerod 1994). Los diferentes tejidos diseccionados (ganglio, folículos testiculares y ovariolas) fueron depositados en un pocillo de vidrio con 0,5 ml de solución salina, para limpiarlos de restos no deseados como grasa u otros tejidos adyacentes. La suspensión celular se obtuvo con una primera disgregación mecánica, machacando y pipeteando varias veces el tejido, seguida de una digestión enzimática con tripsina al 0,25%. Para minimizar la presencia de agregados celulares, la suspensión celular obtenida se filtró con una membrana de nylon con poros de 50 μm de diámetro (para más detalle véase Material y Métodos).

Para el análisis del ciclo celular, la suspensión de células se fijó previamente en etanol frío al 70% durante 30 minutos. Las células fijadas pueden guardarse durante meses en PBS a 4 °C en oscuridad. Antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo, las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, con 500 ml RNAsa a 1 mg/ml y 100 ml de ioduro de propidio (IP) a 400 mg/ml. El IP es una molécula fluorescente que se une estequiométricamente al DNA, lo que permite cuantificar la cantidad de DNA y clasificar las células en diferentes poblaciones según su contenido de DNA. Las células con 2C cantidad de DNA corresponden a células en la fase G1-G0; las células con 4C de DNA, estarían en la fase G2-M; mientras que las células con valores intermedios de cantidad de DNA estarían en fase S. El coeficiente de variación (CV) mide la resolución de la técnica durante el proceso de cuantificación.

Para medir la tasa de apoptosis, las suspensiones celulares no se deben fijar ya que para este tipo de experimentos se necesita que las células se encuentren vivas. Las células en suspensión en PBS pueden mantenerse vivas durante 4 o 6 horas. Existen varios métodos para estudiar la apoptosis por citometría de flujo basados en una serie de cambios que ocurren durante el proceso de apoptosis. En nuestro caso, hemos utilizado el kit Conventional Annexin V Binding (de ACC), que se basa en la detección de cambios en la superficie de las células durante la apoptosis. Concretamente utiliza la proteína Anexina V conjugada con FITC (fluoresceína-5-isotiocianato). Esta proteína tiene la propiedad de unirse a la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido que se localiza en la monocapa interna de la membrana plasmática. Tras la cascada de señales que intervienen en la regulación de la apoptosis, la PS es transportada a la superficie externa de la membrana plasmática donde actúa de señal identificativa de los cuerpos apoptóticos, siendo ésta la señal que reconocen los fagocitos. El conjugado Anexina V-FITC se utiliza conjuntamente con IP, para poder discriminar entre tres tipos de subpoblaciones celulares: 1) células no apoptóticas (viables), que no se marcan ni con la Anexina V-FITC ni con el IP;

2) células apoptóticas tempranas, que se marcan solamente con la Anexina V-FITC y 3) células apoptóticas tardías o necróticas, a las que se les une tanto la Anexina V-FITC como el IP. Para la realización de los experimentos de apoptosis es necesario realizar tres tipos de controles: el control 1, en el que no se le añade a la muestra ninguno de los fluorocromos; el control 2, donde a la muestra se le añade solamente la Anexina V-FITC, y el control 3, en el que a la suspensión celular se le añade sólo ioduro de propidio. El primer control sirve para detectar la autofluorescencia de las células y los otros dos controles, para definir los límites de fluorescencia en cada población y evitar el solapamiento entre los dos canales (FITC e IP).

Los parámetros morfométricos de tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC) se obtienen directamente del citómetro de flujo a partir de las suspensiones utilizadas para los diferentes experimentos. De manera, que en el caso de la población de Torrox 2003 los parámetros morfométricos se han obtenido a partir de las suspensiones celulares utilizadas también en los experimentos del ciclo celular, mientras que para la población del 2005 se han obtenido a partir de las muestras celulares utilizadas a su vez para detectar las células en apoptosis.

Los experimentos se han llevado a cabo en el citómetro BECTON DICKINSON FACS Vantage con láser COHERENT Enterprise 621 (488 nm y 351-364 nm (UV)) del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los análisis se han realizado separadamente para poblaciones, sexos y tejidos. El efecto de los cromosomas B se ha analizado mediante ANOVAs de 1 vía y test de Student utilizando el programa STATISTICA®.

Resultados

Muestra de la población de Torrox (2003)

En la muestra de Torrox de 2003 se midieron con el citómetro de flujo 20 000 células por individuo. Las células fueron separadas en tres poblaciones celulares dependiendo de su contenido de DNA. Los análisis realizados para ambos sexos muestran que los cromosomas B no influyen en el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular (Tabla 4.5). En el caso de las células de machos, el coeficiente de variación (CV) fue, en la mayoría de los casos, superior al 10%, valor que se supone crítico para obtener buena capacidad de discriminación entre poblaciones celulares, implicando una menor potencia estadística para detectar el efecto del cromosoma B. Sin embargo, para las células de las hembras el CV obtenido fue menor al 10% en todos los casos, indicando una menor variación en los datos obtenidos y, por tanto, un resultado más robusto.

El cromosoma B tampoco parece afectar a la morfología celular, ya que tanto en los machos como en las hembras los cromosomas B no tienen ningún efecto significativo ni en el tamaño (FSC) ni en la complejidad interna de las células (SSC) (Tabla 4.6). Para ambos parámetros hemos observado una gran variación interindividual, obteniéndose para los distintos grupos de individuos con diferente número de cromosomas B una gran variación en los datos de tamaño y de complejidad que reducen la potencia estadística.

A pesar de que en ambos sexos se ha utilizado el mismo tejido, debido a condicionantes externos, no podemos comparar entre sexos ya que en cada uno de ellos los datos de morfología se han tomado utilizando escalas diferentes (véase Tabla 4.6 y 4.7).

Tabla 4.5. Resultados de un ANOVA de 1 vía para analizar el efecto del número de cromosomas B en la proporción de células con diferente valor C (df= 4, 23 en la muestra de machos 2003, df= 2, 18 en la muestra de hembras de 2003, df= 2, 11 en muestra de machos de 2005).

Año	Sexo	Tejidos	Cantidad de DNA	Número de cromosomas B					F	p
				0B	1B	2B	3B	4B		
2003	Machos	Ganglio	2C	90,37	86,57	85,86	94,44	89,03	0,65	0,631
			4C	6,66	6,75	7,31	4,16	3,99	0,25	0,906
			2C-4C	2,97	6,69	6,82	1,40	6,97	1,64	0,198
	Hembras	Ganglio	2C	70,44	67,55	66,43	-	-	0,16	0,851
			4C	15,56	21,46	24,16	-	-	0,83	0,451
			2C-4C	14,00	10,98	9,41	-	-	1,70	0,211
2005	Machos	Gónadas	2C	70,56	65,72	67,58	-	-	0,31	0,739
			4C	20,47	24,31	24,24	-	-	0,27	0,771
			2C-4C	8,97	9,97	8,17	-	-	0,72	0,517

F1 de la población de Torrox 4 (2005)

La muestra utilizada estuvo formada por individuos adultos de la misma edad, nacidos en el laboratorio a partir de hembras capturadas en 2005 en la población de Torrox 4. En esta muestra, más homogénea que en la recogida en el apartado anterior, analizamos el ciclo celular, la morfología celular y los niveles de apoptosis.

Para analizar el ciclo celular hemos estudiado una muestra de células testiculares en suspensión, sin encontrar diferencias significativas en el porcentaje de células con diferente contenido de DNA asociadas al número de cromosomas B (Tabla 4.5). El coeficiente de variación en este caso fue superior

al 10%, lo que puede reducir la potencia estadística. Ello puede deberse a que las gónadas masculinas son muy heterogéneas al estar formadas por varias poblaciones celulares –que incluyen células somáticas foliculares (posiblemente con distinto grado de ploidía), espermatogonias en mitosis, espermatocitos en las distintas etapas de la meiosis, espermatidas en diferentes estados de madurez y espermatozoides maduros– que el citómetro no discrimina adecuadamente. Por ejemplo, no lo hace entre espermatogonias que se están dividiendo por mitosis y células germinales que se encuentran en meiosis.

Por otro lado, en los machos no se detectaron efectos asociados a la presencia del cromosoma B sobre la morfología de las células en ninguno de los tres tejidos (Tabla 4.6). En el caso de las hembras de esta población, al no conocerse el número exacto de cromosomas B que portaban, hemos analizado el posible efecto asociado a la presencia de cromosoma B mediante una t-Student. El resultado muestra que no existen diferencias significativas entre hembras con y sin cromosoma B en relación a la morfología celular (t-Student: 0B= 162,1, +B= 150,5), el tamaño celular medio (t-Student= 0,34, df= 13, p= 0,738) y la complejidad celular media (t-Student: 0B= 52,1, +B= 45,9, t-Student= 0,84, df= 13, p= 0,413). Al igual que para la muestra de 2003, en este caso también hemos observado una gran variación entre grupos para los parámetros analizados en los tres tejidos.

En los machos de esta población estudiamos los niveles de apoptosis tanto en el ganglio como en los folículos testiculares, mientras que en las hembras analizamos exclusivamente las ovariolas. En los tres tejidos se contabilizaron 5000 células por individuo.

En los tres tejidos estudiamos el posible efecto del número de cromosomas B sobre la proporción de células viables, de células en apoptosis temprana y de células en apoptosis tardía o necróticas (véase Tabla 4.7). En los tres casos, se observó una disminución de células apoptóticas asociada al aumento del número de cromosomas B, pero estas diferencias no fueron significativas. En cuanto al número de células en apoptosis tardía o necróticas, tampoco se observó ningún efecto del cromosoma B ni en el ganglio ni en los tejidos gonadales, a pesar de que, en el caso de los machos, los valores medios observados para cada grupo son bastante diferentes entre los distintos grupos. Sin embargo, la elevada variación existente dentro de cada grupo pudo enmascarar las posibles diferencias que pudiese haber entre los distintos grupos.

Tabla 4.6. Resultado del ANOVA de 1 vía para analizar el efecto del número de cromosomas B en el tamaño celular medio (FSC) y en la complejidad celular media (SSC) en los diferentes tejidos analizados de la población muestreada en 2003 (df= 4, 23 en los machos y df= 2, 18 en las hembras) y en los machos de la población muestreada en 2005 (df= 2, 11).

Año	Sexo	Tejido	Variabes	Escala	F	p
2003	Machos	Ganglio	FSC-H	log	0,53	0,715
			SSC-H	lineal	0,76	0,561
	Hembras	Ganglio	FSC	log	0,93	0,414
			SSC	log	1,07	0,365
2005	Machos	Ganglio	FSC	lineal	0,19	0,832
			SSC	lineal	0,15	0,859
		Gónadas	FSC	lineal	0,54	0,599
			SSC	lineal	0,34	0,721

Tabla 4.7. Resultado de un ANOVA de 1 vía para analizar el efecto del cromosoma B₂₄ en la proporción de células viables, células apoptóticas tempranas y células apoptóticas tardías o necróticas, en los individuos nacidos en el laboratorio de hembras capturadas en la población de Torrox 4 en 2005. (df= 2, 28 en los machos y df= 12 en las hembras).

Sexo	Tejido	Tipo de células	Número de cromosomas B			F	p
			0B	1B	2B		
Machos	Ganglio	Células viables	88,84	89,84	90,29	0,16	0,852
		Células apoptóticas	6,72	5,56	4,66	0,46	0,648
		Células necróticas	0,33	0,51	0,93	0,47	0,641
	Gónadas	Células viables	81,96	79,96	86,62	0,61	0,566
		Células apoptóticas	11,59	10,85	8,33	0,28	0,762
		Células necróticas	3,58	6,31	2,17	1,87	0,216
Hembras ^a	Gónadas	Células viables	85,25	89,24	–	0,77	0,396
		Células apoptóticas	12,35	8,31	–	1,30	0,277
		Células necróticas	2,41	2,45	–	0,00	0,974

a) Los datos de las hembras 1B corresponden a hembras +B, ya que se desconoce el número exacto de cromosomas B que porta cada una de ellas.

Discusión

El incremento de aproximadamente el 10% en cantidad de DNA que supone la presencia de un cromosoma B_{24} en los individuos portadores (datos no publicados) parece no tener ningún efecto a estos niveles en los individuos. No hemos encontrado efecto asociado al cromosoma B_{24} ni en características morfológicas de tamaño y complejidad celular, ni en la tasa de apoptosis, ni en la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular.

Aunque la ausencia de efectos del cromosoma B sobre los parámetros medidos puede ser fiable, la heterogeneidad encontrada ha podido contribuir a reducir la potencia estadística y ocultar el efecto de los B. Varias causas han podido contribuir a ello y las podemos agrupar en factores que aumentan la heterogeneidad y factores que afectan al tamaño muestral.

En primer lugar, una causa puede haber sido la utilización de suspensiones celulares obtenidas a partir de tejidos en lugar de cultivos celulares. Ello implica un paso adicional de disgregación que puede ocasionar restos y agregados celulares que aumentan los errores de cuantificación (Ormerod 1994).

En segundo lugar, hay que considerar que los tejidos son un agregado de diferentes tipos celulares. Esta heterogeneidad celular en las suspensiones celulares también puede afectar a la variación detectada entre individuos. El ganglio es un tejido diploide formado por varios tipos celulares: las neuronas y las células gliales. En las ovariolas, normalmente encontramos células foliculares, y unos pocos oocitos en meiosis en cada ovariola. Pero, en el caso de los folículos testiculares, la heterogeneidad celular de las muestras es mucho mayor, ya que en él encontramos multitud de tipos celulares en distintas fases del ciclo celular y de la meiosis y, por tanto, con distinto grado de ploidía (para más detalle véase apartado 4.4). Este tipo de heterogeneidad es consustancial al uso de este tipo de muestras biológicas procedentes de individuos adultos y no de cultivos celulares.

Además, el análisis del ciclo celular utilizando exclusivamente el yoduro de propidio para teñir el DNA no permite diferenciar entre distintas poblaciones celulares. Por ejemplo, no diferencia entre células que se encuentran en fase G2 o en mitosis, por lo que sólo proporciona información acerca del porcentaje de células que se encuentran en 2C o 4C.

Por otro lado, al tener que considerar los valores medios por individuo, el tamaño muestral resultó bajo, especialmente en el caso de la muestra de la población de Torrox 2005, formada por 11 machos (4 machos 0B, 5 machos 1B y 3 machos 2B) y por 12 hembras (3 hembras 0B y el resto con cromosoma B). Dificultades operativas en la captura de los valores reales de cada una de las células procesadas por el citómetro de flujo no nos ha permitido disponer de datos individualizados por célula que incrementaran el tamaño muestral.

Aunque los cromosomas B son parásitos intragenómicos y, por tanto, cabría esperar que sus efectos fuesen mayores a nivel celular que a nivel individual (porque la propia fisiología del individuo podría amortiguar tales efectos) cabe concluir que con los datos disponibles, el cromosoma B₂₄ no afecta a los parámetros celulares descritos.

Bibliografía

- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A, Perfectti F. 2002. Host recombination is dependent on the degree of parasitism Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 269: 2173-2177.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. The evolution of the genome (Gregory TR, ed.): 223-286.
- Ormerod MG. 1994. Flow Cytometry. A practical approach. 2nd edn. (Serie Editors: Rickwood D and Hames BD).
- Shapiro HM. 1988. Practical flow cytometry. 2nd edn. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2008 Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosoma (DOI 10.1007/s00412-008-0197-x).
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2007 Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosome Res. 15 (6): 755-765.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. Evolution 52: 274-277.

4.7. EFECTOS DE LOS CROMOSOMAS B₂₄ DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

Introducción

La acumulación de los cromosomas B está generalmente asociada a su comportamiento durante las mitosis y meiosis previas a la formación de los gametos. Por ejemplo, la no-disyunción mitótica que desarrollan los cromosomas B de centeno durante la maduración del grano de polen, es un ejemplo paradigmático de un fenómeno que se da en muchos cromosomas B de plantas (Jones 1991). En los saltamontes, los cromosomas B mitóticamente inestables se acumulan durante el desarrollo al quedar los polos mitóticos con más Bs destinados preferentemente a formar parte de la línea germinal en los machos (Nur 1969, Pardo y col. 1995). Pero el comportamiento meiótico también determina la posible acumulación o eliminación de los cromosomas B de la línea germinal. Por ejemplo, en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus*, los cromosomas B se acumulan durante la oogénesis y se eliminan durante la espermatogénesis, (Hewitt et al. 1973). La acumulación se produce porque los cromosomas B migran preferentemente al oocito secundario, escapando así a la eliminación con el corpúsculo polar (Hewitt 1976). La eliminación en machos se produce porque los cromosomas B muestran un comportamiento meiótico irregular que induce la formación de micro- y macroespermátidas (Hewitt et al. 1987, Camacho et al. 2004).

El cromosoma B₂₄ de *Eyprepocnemis plorans* presenta acumulación a través de las hembras (Herrera et al. 1996, Zurita et al. 1998), pero no a través de los machos, que transmiten los cromosomas B con tasas semejantes a las mendelianas, sugiriendo que no tiene ningún efecto en la producción y formación de los gametos masculinos. Por estudios realizados por Suja et al. (1989), sabemos que la variante neutralizada B₂ de *E. plorans*, que se transmite con tasas semejantes a las mendelianas, tanto en machos como en hembras, produce en los machos un aumento de espermátidas anormales, especialmente de macroespermátidas. Sin embargo, este particular no ha sido previamente analizado para el cromosoma B₂₄, que es el cromosoma más parasítico encontrado hasta el momento (Zurita et al. 1998, Camacho et al. 2002). De igual forma, tampoco se ha analizado nunca la morfología de las espermátidas y espermatozoides de *E. plorans*, asociada a la presencia de cromosomas B₂₄.

Por tanto, en el presente apartado analizamos los posibles efectos que los cromosomas B₂₄ pudieran tener en la espermatogénesis, proceso que hemos analizado tanto a microscopía óptica como electrónica.

Material y métodos

Hemos realizado un recuento de espermátidas en una muestra de 50 machos de la población de Torrox 4 capturados en 2004, a partir de las preparaciones de impregnación argéntica utilizadas en el estudio del efecto del cromosoma B₂₄

sobre la expresión nucleolar (véase apartado 4.3). Para los análisis a microscopía óptica analizamos, en cada macho, 500 espermátidas, clasificándolas, por su tamaño y número de adjuntos centriolares, en espermátidas normales (con un adjunto centriolar), macroespermátidas (con más de un adjunto centriolar) y microespermátidas (mucho más pequeñas de lo normal).

Para completar este estudio decidimos analizar la estructura de las macroespermátidas de machos sin cromosoma B (OB) y machos con un cromosoma B (1B) mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, varios folículos testiculares fueron depositados directamente en fijador glutaraldehído al 2,5% más formaldehído al 1%, en tampón cacodilato 0,05 M a pH 7,4 (véase Material y Métodos). La preparación de las muestras para microscopía electrónica, así como los cortes ultrafinos, se han realizado en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La observación de las preparaciones se realizó en un microscopio electrónico JEOL modelo JEM1011 acoplado a un sistema de capturas de imágenes Megaview III (Soft Imaging Systems) del Grupo de Biología Reproductiva de Plantas del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

Los test estadísticos utilizados fueron el test de Student y ANOVA de una vía, realizados ambos con el programa STATISTICA®.

Resultados

Las espermátidas normales se pueden diferenciar, a microscopía óptica, de las espermátidas defectuosas en base a su tamaño (véase Fig. 4.8) y al número de adjuntos centriolares. Las macroespermátidas poseen mayor grado de ploidía, son de mayor tamaño que las espermátidas normales y poseen más de un adjunto centriolar; mientras que las microespermátidas son de menor tamaño que las normales. La Tabla 4.8 recoge la proporción de espermátidas normales, macroespermátidas y microespermátidas obtenida para los machos sin cromosoma B y con diferente número de cromosomas B.

La presencia de cromosomas B parece afectar a la meiosis masculina incrementando la proporción de productos defectivos (Fig. 4.9, Tabla 4.8), tanto de macroespermátidas como de microespermátidas. De hecho, los individuos portadores de cromosoma B mostraron más macroespermátidas ($t= 2,91$, $df= 48$, $p= 0,005$) y más microespermátidas ($t= 2,14$, $df= 48$, $p= 0,037$) que los individuos sin cromosoma B.

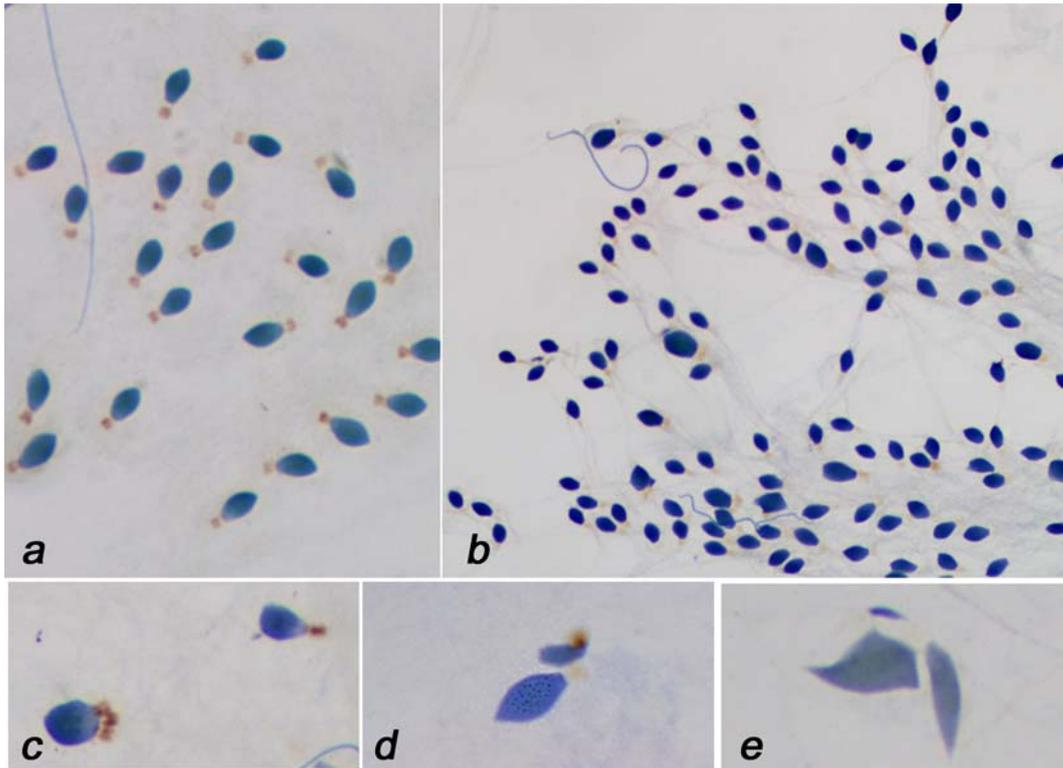


Figura 4.8. Microscopía óptica de espermátidas obtenidas a partir de folículos testiculares de machos de *E. plorans* teñidos mediante impregnación argéntica y Giemsa. *a)* se observan espermátidas normales. *b)* se pueden observar varias espermátidas normales junto a varias macroespermátidas. *c)* se muestra una espermátida normal, con un único adjunto centriolar, junto a una macroespermátida triploide donde se observan tres adjuntos centriolares. *d)* muestra una microespermátida junto a una espermátida normal. En la figura *e* se observa una espermátida normal, una macroespermátida y una microespermátida.

Tabla 4.8. Proporción de espermátidas normales (C), de macroespermátidas ($>C$) y microespermátidas ($<C$) en los machos de *E. plorans* con diferente número de cromosomas B.

Tipos de individuos según el número de cromosoma B ₂₄	N	Tipo de Espermátidas		
		Normales (C)	Macro ($>C$)	Micro ($<C$)
Individuos sin B ₂₄ (0B)	13	99,18	0,54 ± 0,12	0,22 ± 0,10
Individuos con 1 B ₂₄ (1B)	13	97,04	2,69 ± 0,66	0,58 ± 0,12
Individuos con 2 B ₂₄ (2B)	12	98,46	1,06 ± 0,31	0,32 ± 0,06
Individuos con 3 B ₂₄ (3B)	12	96,46	2,60 ± 0,52	1,34 ± 0,35

N, número de individuos

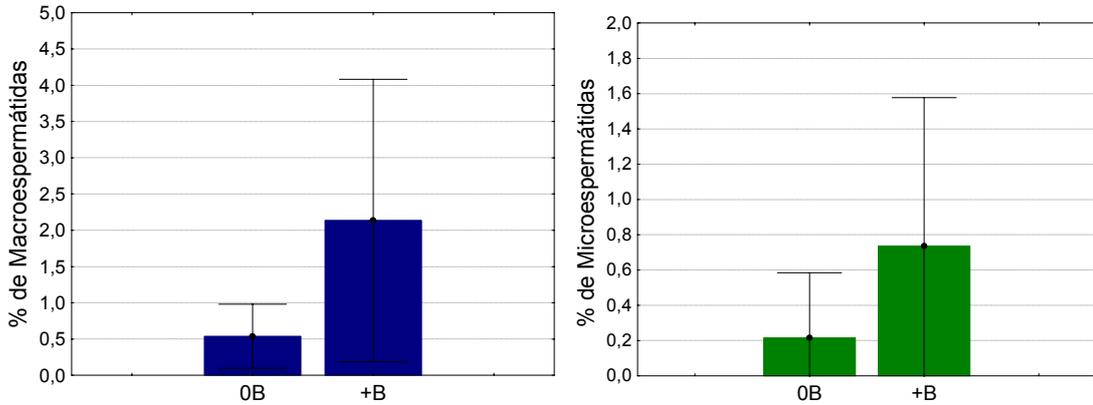


Figura 4.9. Los individuos portadores de cromosoma B₂₄ presentan un mayor número de macroespermátidas y de microespermátidas que los individuos sin este cromosoma, y por tanto, un menor número de espermátidas normales.

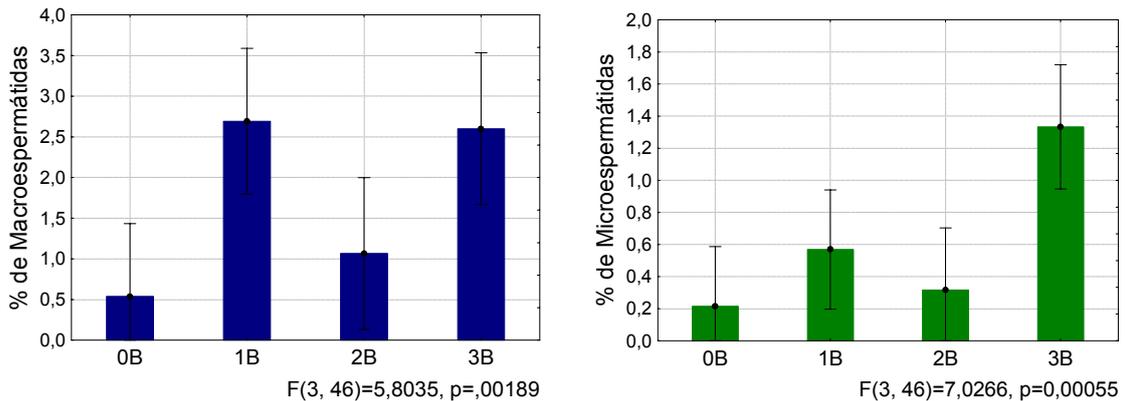


Figura 4.10. Efecto par-impar de los cromosomas B₂₄ en la producción de macroespermátidas y microespermátidas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Cuando se tiene en cuenta el número de cromosomas B, se observa un efecto par-impar de los cromosomas B en la proporción de macro y microespermátidas, de modo que los individuos con número impar de cromosoma B₂₄ presentaron una mayor proporción de espermátidas anómalas, tanto de macroespermátidas como de microespermátidas, que los individuos sin cromosoma B o con número par de ellos (ANOVA de 1 vía: macroespermátidas, 0B=0,54, 1B=2,69, 2B=1,06, 3B=2,60, F=5,80, df=,3, 46, p=0,002; microespermátidas, 0B= 0,22, 1B= 0,58, 2B= 0,32, 3B= 1,34, F= 7,03; df= 3, 46, p<0,001) (véase Fig. 4.10).

Al comparar la proporción de espermátidas anómalas entre los individuos 2B y aquellos portadores de 1 y 3B se confirmaron diferencias significativas entre ellos. Los individuos con número par de cromosomas B, es decir, los individuos con 2B, presentan una proporción de macro y microespermátidas significativamente menor que los individuos con número impar de Bs (macroespermátidas, par= 1,02, impar= 2,65, $t = -2,92$, $df = 39$, $p = 0,006$; microespermátidas, par = 0,37, impar = 0,94, $t = -2,26$, $df = 39$, $p = 0,030$).

Sin embargo, al realizar el análisis considerando los individuos con número impar de B por separado no se encontró diferencia significativa en la proporción de macroespermátidas entre los individuos (ANOVA 1 vía: 1B= 2,69, 2B= 1,06, 3B=2,60, $F = 2,97$; $df = 2, 34$, $p = 0,064$), aunque los individuos con número impar de cromosomas B presentaron valores ligeramente más altos que los individuos 2B. En cambio, para las microespermátidas sí se observaron diferencias significativas entre los individuos con diferente número de cromosoma B, ya que los individuos 2B, presentaron una menor proporción de microespermátidas que los individuos con uno o tres cromosomas B (ANOVA 1 vía: 1B= 0,58, 2B= 0,32, 3B= 1,34, $F = 6,12$, $df = 2, 34$, $p = 0,005$).

La observación de los folículos testiculares al microscopio electrónico mostró que tanto en los individuos 0B como en los individuos 1B existen paquetes de espermátidas normales y, presumiblemente funcionales, caracterizadas en su mayor parte por disponerse de forma ordenada dentro de los paquetes espermáticos (Fig. 4.11a y 4.12a). Sin embargo, también es frecuente encontrar, en ambos casos, espermátidas anómalas, especialmente macroespermátidas, que se disponen en los laterales de los folículos testiculares y que suelen ser eliminadas de los paquetes espermáticos (Fig. 4.11b, 4.12b) (Hewitt et al. 1987).

Las macroespermátidas, a microscopía electrónica, pueden identificarse por la presencia de varios axonemas, dependiendo del grado de ploidía que presenten (Fig. 4.13). Al realizar un recuento del número de macroespermátidas diploides, triploide y tetraploides, según presenten dos, tres o cuatro axonemas, observamos que en los individuos sin cromosomas B fueron más frecuentes las macroespermátidas diploides mientras que en los individuos con un cromosoma B abundan más las macroespermátidas tetraploides y, con menor frecuencia, las triploides, que no fueron detectadas en los individuos 0B analizados (Tabla 4.9, diferencias significativas $\chi^2 = 29,40$, $p < 0,0001$ basada en un análisis de contingencia por aproximación de MonteCarlo con 10000 permutaciones). En las muestras analizadas, no observamos macroespermátidas con más de 4 axonemas, como fue descrito en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* por Hewitt et al. (1987). Las macroespermátidas diploides se originan probablemente por fallo en una de las divisiones meióticas, mientras que las tetraploides resultan de fallos en las dos divisiones formándose, en ambos casos, núcleos de restitución (Nur 1969, Camacho et al. 2004). El hecho de que no hayamos encontrado espermátidas con grado de ploidía superior a

tetraploide descartaría, en principio, la posibilidad de que las macroespermátidas se originen mediante fusión celular. Sin embargo, la existencia de macroespermátidas triploides pone en duda esta conclusión porque las ploidías en número impar no se explican fácilmente mediante formación de núcleos de restitución, por lo que podrían más bien ser el producto de fusiones celulares.

Otra diferencia destacable observada gracias a la microscopía electrónica es la existencia en individuos con un cromosoma B de espermátidas desintegradas, que no se han observado en ninguna de las preparaciones realizadas de folículos testiculares de individuos sin cromosoma B (Fig. 4.14). La desintegración de espermátidas es un fenómeno comúnmente observado relacionado con la eliminación de espermátidas como consecuencia de la propia fisiología del individuo (Dr. Manuel Tierno de Figueroa, comunicación personal). El hecho de que no se hayan observado espermátidas desintegradas en los individuos sin cromosomas B analizados sugiere la posibilidad de que la presencia del cromosoma B_{24} pudiera estar asociada con una mayor tasa de desintegración de las espermátidas, aunque esta observación es muy preliminar y sería necesario un estudio diseñado para ese fin.

Tabla 4.9. Proporción de macroespermátidas diploides, triploides y tetraploides en machos de *E. plorans* sin cromosoma B y con un cromosoma B obtenidos de recuento de espermátidas a microscopio electrónico.

Tipos de individuos según el número de cromosoma B_{24}	N	Macroespermátidas		
		$2C$	$3C$	$4C$
Individuos sin B_{24} (0B)	2	0,83	0,02	0,15
Individuos con 1 B_{24} (1B)	2	0,33	0,11	0,56

N, número de individuos

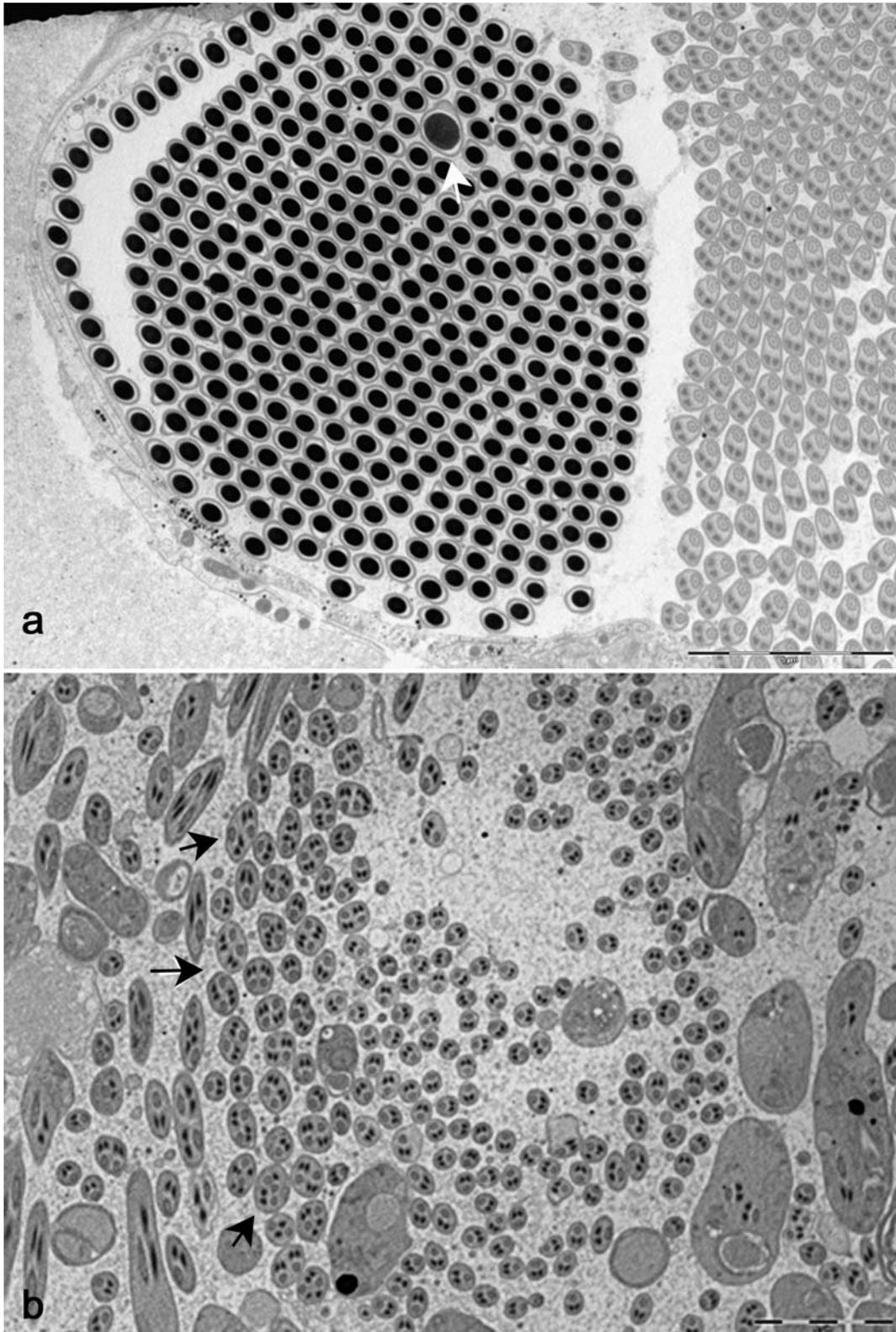


Figura 4.11. Cistos con espermátidas normales y anormales (indicadas con flechas) en machos sin cromosomas B (0B) observados a microscopía electrónica de transmisión.

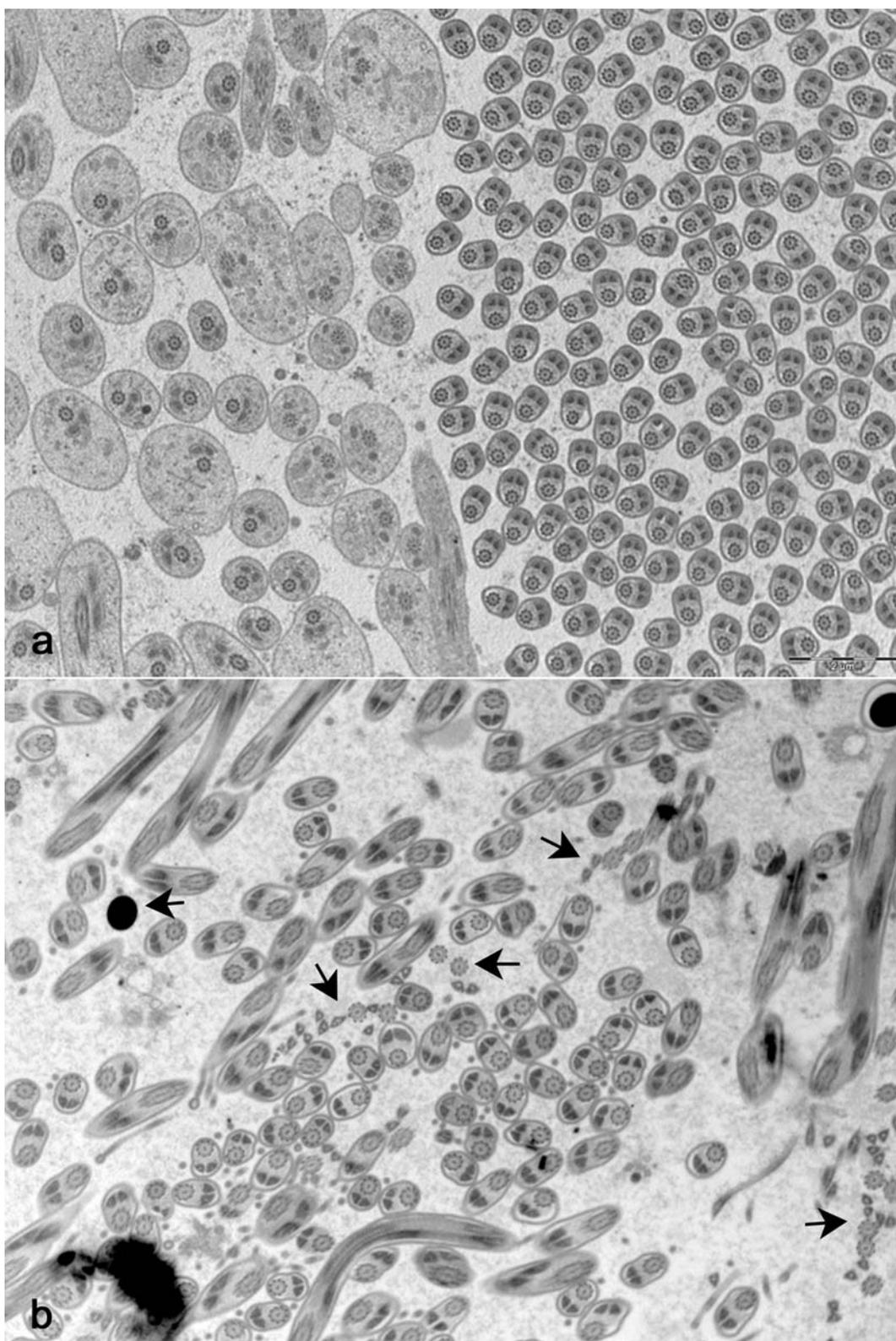


Figura 4.12. Cistos con espermátidas normales y desintegradas en machos con un cromosoma B ($1B_{24}$) observados a microscopía electrónica de transmisión.

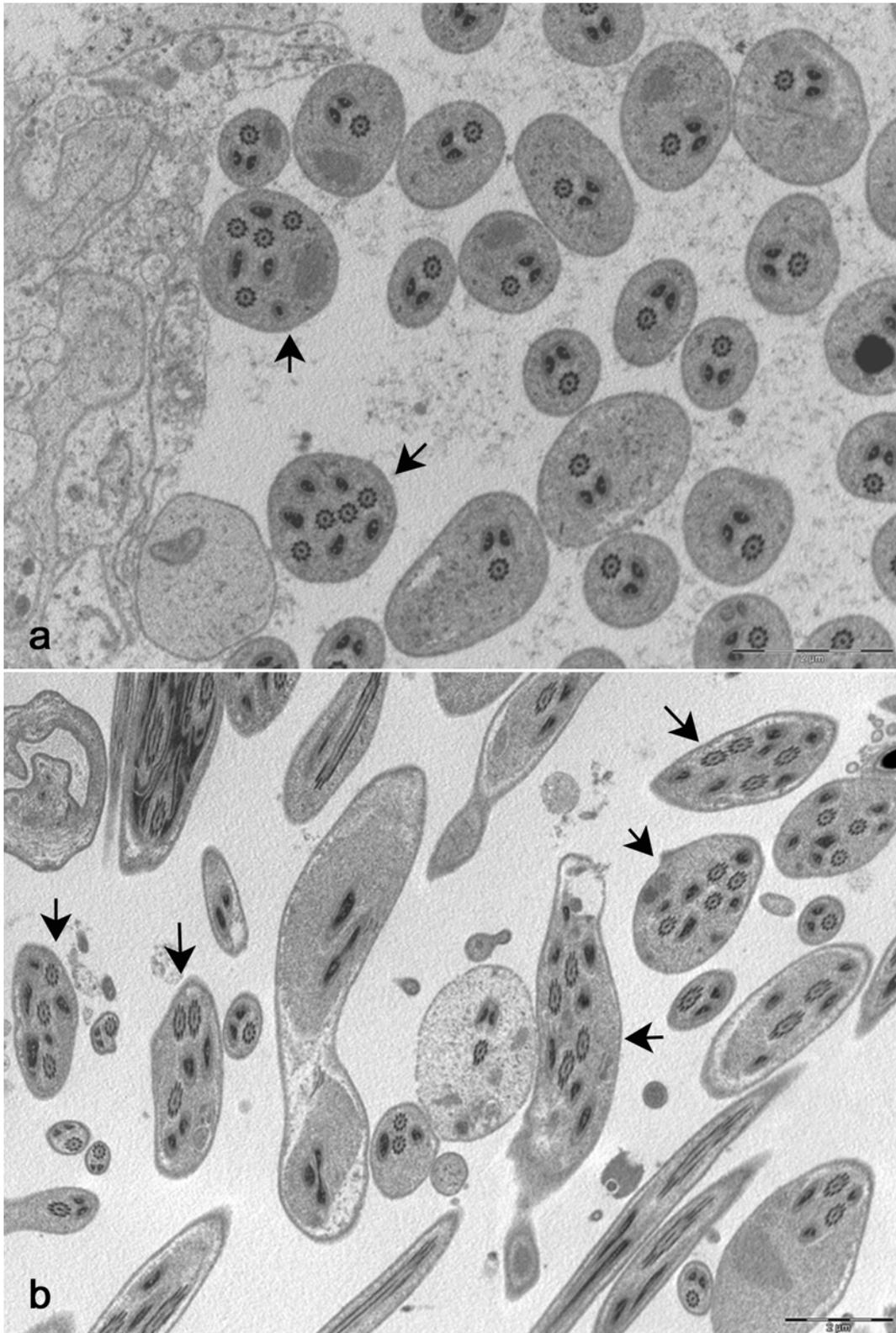


Figura 4.13. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de un macho de *E. plorans* con un cromosoma B₂₄ donde puede observarse la presencia de macroespermátidas diploides, triploides y tetraploides.

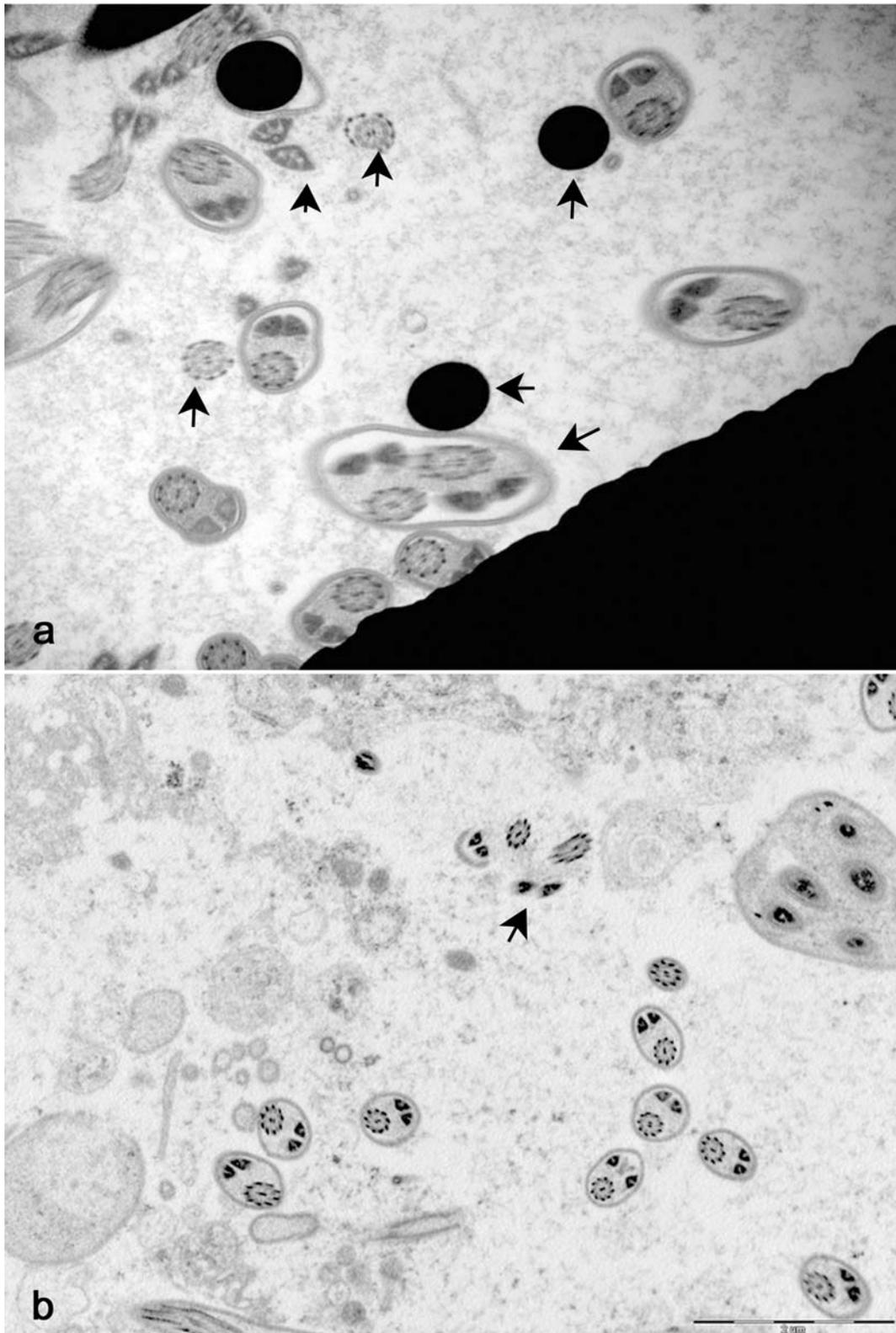


Figura 4.15. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de un macho de *E. plorans* con un cromosoma B₂₄ donde puede observarse la presencia de espermátidas desintegradas.

Discusión

La presencia de cromosomas B influye negativamente en el proceso de espermatogénesis de los machos portadores, aumentando significativamente el número de espermátidas anómalas, tanto de macroespermátidas como de microespermátidas, aunque el incremento de macroespermátidas fue mucho mayor que el de microespermátidas. Esta proporción de espermátidas anómalas ocasiona una reducción del esperma total producido, aunque el efecto que esto puede tener sobre la fertilidad de los machos no ha sido evaluado. Este mismo incremento de espermátidas anómalas también se ha detectado en otras especies de saltamontes, asociado tanto a cromosomas B mitóticamente inestables (Camacho et al. 2004), como a cromosomas B mitóticamente estables (Hewitt et al. 1987), e incluso en *E. plorans* se ha observado un incremento de macroespermátidas asociado al cromosoma B₂ frecuente en las poblaciones de Salobreña (Granada) (Suja et al. 1989)

El efecto par-impar de los cromosomas B sobre la producción de espermátidas anómalas sugiere que éstos provocan cierta inestabilidad en el núcleo de las espermátidas durante el proceso de formación de los gametos. Además, pone de manifiesto la idea de que los cromosomas B, en número impar, son más perjudiciales para los individuos portadores que en número par (Jones & Rees, 1982), tal vez por la presencia de estos cromosomas en forma univalente (Camacho et al. 2004). El efecto par-impar de los cromosomas B se ha descrito en multitud de especies de plantas y animales, para multitud de características tales como la frecuencia de quiasmas, número de nucleolos, número de espermátidas anómalas, etc. (para más detalle véase Camacho 2005).

Las macroespermátidas son espermátidas con mayor grado de ploidía que la haploidía de las espermátidas normales. La frecuencia de macroespermátidas es superior en los individuos con número impar de cromosomas B. Nur (1969), a partir de sus estudios sobre el cromosoma B mitóticamente inestable del saltamonte *Camnula pellucida*, propuso varias hipótesis para explicar el incremento de macroespermátidas en los individuos portadores de cromosoma B: i) el retraso de los cromosomas B durante la primera división meiótica inhibiría la citocinesis y se formarían núcleos de restitución, de donde se esperaría que la mayoría de las macroespermátidas fuesen diploides o tetraploides; ii) los cromosomas B pueden promover la fusión nuclear o celular, pudiendo aparecer macroespermátidas con niveles de ploidía superiores a la tetraploidía; iii) que las macroespermátidas procedan de espermatogonias poliploides. En cuanto a las microespermátidas, su origen se debería a la pérdida de univalentes extras. Camacho et al. (2004) proponen que la presencia de cromosomas B en forma univalente produce mayor inestabilidad en el núcleo favoreciendo la formación de macroespermátidas. Estos autores sugieren que el cromosoma B en forma univalente puede quedar retardado en anafase I y provocar la restitución del núcleo y, por tanto, la formación de macroespermátidas. En individuos con número par de cromosomas B, estos cromosomas pueden formar bivalentes, evitándose así su presencia en forma de univalente, y por tanto su retardo en anafase I, la restitución del núcleo y la

formación de macroespermátidas. La microscopía electrónica ha mostrado que el proceso de formación de las espermátidas falla principalmente en el proceso de la meiosis, ya que fue frecuente encontrar macroespermátidas tetraploides. La restitución del núcleo como mecanismo para explicar la formación de macroespermátidas se ha propuesto para los saltamontes *Sphingonatus coeruleans* (Gosálvez et al. 1985) y *Metalaptea brevicornis* (Bidau 1986). Sin embargo, para los saltamontes *Aiolopus strepens* (Suja et al. 1987) y *M. maculatus* (Hewitt et al. 1987), se han encontrado macroespermátidas con hasta 10 y 6 adjuntos centriolares, respectivamente, indicando que también se pueden originar por fusión nuclear o celular dando lugar a macroespermátidas con grados de ploidía mayor a 4C (Nur 1969). La existencia de macroespermátidas triploides en *E. plorans* sugiere que en esta especie también se produce cierto nivel de fusión celular que da lugar a la formación de estas macroespermátidas poliploides en número impar.

El número de microespermátidas también aumentó en presencia de cromosomas B, manifestándose más intensamente en los individuos con número impar de cromosomas B. Por tanto, las microespermátidas podrían originarse por la expulsión de los cromosomas B univalentes (Nur 1969). Recientemente, se ha demostrado, utilizando sondas específicas de los cromosomas A y del cromosoma B, que, en el maíz, las microespermátidas incluyen tanto cromosomas A como B (Chiavarino et al. 2000). Es concebible que una proporción de las microespermátidas observadas en saltamontes se deban a la pérdida de algún cromosoma A, obteniéndose espermátidas aparentemente normales pero que serían aneuploides para ese cromosoma (Camacho et al. 2004). Sin embargo, la baja proporción de microespermátidas observados en los individuos sin cromosoma B (0,22) en relación con los individuos con cromosoma B (0,73) apoyan la idea de que las microespermátidas se corresponden principalmente a la expulsión de cromosomas B.

En el caso de *E. plorans* se ha constatado, mediante cruzamientos controlados, que los cromosomas B no muestran acumulación a través de los machos, sino a través de las hembras (Herrera et al. 1996, Zurita et al. 1998). Por ello, sería también interesante estudiar el efecto de estos cromosomas en la oogénesis. Sin embargo, estudiar la oogénesis presenta múltiples dificultades comparado con la espermatogénesis, ya que mientras los machos producen un número alto de gametos, las hembras producen un único óvulo fecundable por huevo, lo cual dificulta el estudio de los cromosomas B a través de la hembra tanto a nivel de posibles efectos como para aclarar los mecanismos por los que el cromosoma B se acumula.

No hay que olvidar, por otro lado, que la espermatogénesis y la oogénesis son procesos que están influenciados tanto por factores genéticos como por factores ambientales, tales como la edad del individuo y la temperatura ambiental. Por ejemplo, en los machos del saltamonte *M. maculatus* de más edad es frecuente encontrar mayor número de espermátidas anómalas (Hewitt et al. 1987). Estos autores confirmaron la existencia de una relación entre la presencia de cromosomas B, la edad de los individuos, y el incremento en

espermátidas anómalas, de manera que el número de espermátidas defectuosas aumentaban un 5 por ciento en los machos con cromosoma B de más edad.

En los machos, hemos demostrado que los cromosomas B producen una reducción de la proporción de espermátidas normales. Sin embargo, no tenemos datos directos que indiquen que las espermátidas afectadas son aquellas que portan cromosomas B, especialmente en las microespermátidas que supuestamente corresponderían a la pérdida del cromosoma extra, favoreciéndose de esta manera una mayor producción de gametos masculinos sin el cromosoma B. Si esto fuese así el cromosoma B se estaría eliminando a través de los machos. Sin embargo, esta eliminación no ha sido observada experimentalmente. Con cruces controlados se ha comprobado que los machos transmiten los cromosomas B, incluyendo B₂₄, a tasas semejantes a las mendelianas (Herrera et al. 1996; Zurita et al. 1998; Manrique et al. 2006). La utilización de una sonda específica para los cromosomas B nos permitiría conocer la proporción relativa de espermátidas normales con y sin cromosomas B y nos ayudaría a aclarar la implicación que esto puede tener en la producción del esperma total. Además, es difícil determinar el efecto que la reducción global del número de espermátidas podría tener sobre la fertilidad de los machos, ya que, en una única cópula los machos depositan en las hembras varios paquetes espermáticos que llevan espermatozoides suficientes para fecundar todos los huevos de una puesta (Hewitt et al. 1987), e incluso todos los huevos que pone una hembra durante su vida (López-León et al. 1994). Hay que tener en cuenta, además, que las hembras de saltamontes son polígamas, de manera que, como también sugieren Hewitt et al. (1987), habría que considerar el efecto que los cromosomas B puedan tener sobre la competición de esperma. En *E. plorans*, López-León et al. (1993) realizaron cruzamientos múltiples entre una hembra y dos machos, uno con B y otro si B, y concluyeron que el orden de cópula es el principal factor determinante del éxito copulador, existiendo precedencia para el último macho, pero no observaron efecto alguno asociado a la presencia de cromosomas B.

Bibliografía

- Bidau C. 1986. Effects on cytokinesis and sperm formation of a B-isochromosome in *Metaleptea brevicornis adpersa* (Acridinae, Acrididae). *Caryologia* 39: 165-177.
- Camacho JPM, Perfectti F, Teruel M, López-León MD, Cabrero J. 2004 The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenet Genome Res.* 106: 325-331.
- Chiavarino AM, Rosato M, Manzanero S, Jiménez G, González-Sánchez M, Puertas MJ. 2000. Chromosome nondisjunction and instabilities in tapetal cells are affected by B chromosomes in Maite. *Genetics* 155: 889-897.
- Gosálvez J., de la Vega CG, Rufas JS, López-Fernández C. 1985. Instable B-chromosome producing abnormal spermatid nuclei in *Sphingonotus coeruleans* (Orthoptera). *Aech Biol* 96: 15-22.

- Jones, R. N. & Rees, H. 1982 B chromosome. New York: Academic Press.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76: 633-639.
- Hewitt GM, East TM and Shaw MW. 1987. Sperm dysfunction produced by B chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 58: 59-68.
- Hewitt, GM. 1976. Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 35: 375-387.
- Hewitt GM. 1973. Variable transmission rates of a B-chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) (Acrididae: Orthoptera). *Chromosoma* 40: 83-106.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J, Camacho JPM. 1992. Random mating and absence of sexual selection for B chromosomes in two natural populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* *Heredity* 69: 558-561.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J Camacho JPM. 1994: Dynamics of sperm storage in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Physiol. Entomol.* 19: 46-50.
- López-León MD, Cabrero J, Pardo MC, Viseras E, Camacho JPM. 1993. Paternity displacement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* *Heredity* 71: 539-545.
- Manrique-Poyato MI, Muñoz-Pajares AJ, Loreto V, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 2006. Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 14: 693-700.
- Martín S, Arana P, Henríque-Gil N. 1996. The effect of B chromosomes on mating success of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica* 97: 197-203.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1998. Parallel effect of a B chromosome and a mite decreasing female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 265: 1903-1909.
- Nur U. 1969. Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 27: 1-19.
- Pardo MC, López-León MD, Viseras E, Cabrero J, Camacho JPM. 1995. Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. *Heredity* 74: 164-169.
- Suja JA, de la Vega CG, Rufas JS. 1987. Meiotic stability of B chromosomes and production of macrospermatids in *Aiolopus strepens* (Orthoptera, Acrididae). *Genome* 29: 5-10.
- Suja JA & Rufas JS. 1989. Mechanisms promoting the appearance of abnormal spermatids in B-carrier individuals of *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera). *Genome* 32: 64-71.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274-277.

4.8. EFECTOS DE LOS CROMOSOMAS B_{24} SOBRE EL TAMAÑO CORPORAL DE *E. PLORANS*

Introducción

El efecto de los cromosomas B raramente se pone de manifiesto en caracteres fenotípicos externos, aunque existen algunas excepciones como, por ejemplo, en la planta *Haplopappus gracilis* donde la presencia del cromosoma B cambia el color del fruto (Jackson & Newmark 1960), en el maíz, donde los individuos portadores de cromosomas extras presentan las hojas rayadas (Staub 1987), los minicromosomas B de *Poecilia formosa* que producen pigmentación en mosaico (Schartl et al. 1995) o el neoB de *Nasonia vitripennis* que producía el cambio de color de los ojos (Perfectti & Werren 2001).

En el caso del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, la mayoría de los estudios realizados se han centrado en estudiar el efecto de los cromosomas B_2 . Así, se ha demostrado que la presencia del cromosoma B_2 influye principalmente en la expresión de las NORs (Regiones Organizadoras Nucleolares) y en la frecuencia de quiasmas, aunque en ambos casos, el efecto depende de la población analizada. Por ejemplo, se ha constatado que en la población de Salobreña el cromosoma B_2 afecta a la expresión de las NORs de los cromosomas A (Cabrero et al. 1987), de manera que la actividad de las NORs es más alta en los individuos 1B que en los individuos 0B, sin embargo en la población de Jete no se observa este efecto (López-León et al. 1995). Tampoco se han observado diferencias asociadas a la presencia de B en varios rasgos morfológicos tales como el peso, longitud y anchura del tórax, longitud del fémur o el número de segmentos en las antenas (Martín-Alganza et al. 1997). En cuanto a los rasgos relacionados con la eficacia biológica, solamente se ha observado una disminución en el número de huevos fecundados de hembras portadoras de un número alto de cromosomas B (Muñoz et al. 1998). La ausencia de efectos en la mayoría de los rasgos analizados y de mecanismos de acumulación de este cromosoma (López-León et al. 1992) sugiere que se encuentra neutralizado por el genoma hospedador (Camacho et al. 1997).

Recientemente hemos observado una disminución del área nucleolar asociada a la presencia de B_{24} en la población de Torrox. Esta disminución nucleolar puede implicar, además, una menor tasa metabólica que se manifieste en algún rasgo morfológico externo. Por otra parte, el incremento que supone la expresión de la NOR del cromosoma B_{24} en esta población (Teruel et al. 2008), podría tener algún efecto en caracteres fenotípicos externos. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos analizar, desde una dimensión espacio-temporal, el posible efecto que el cromosoma B_{24} pudiera tener sobre el tamaño de algunos rasgos morfológicos externos, de los individuos portadores de B de la población de Torrox y una comparación con individuos de la población de Salobreña, en la que está presente el B_2 , un cromosoma B neutralizado.

Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en machos del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* capturados en 2006 y 2007 en dos poblaciones naturales cercanas a Torrox (Málaga): Torrox 0 (T0) y Torrox 2 (T2). Las dos poblaciones se encuentran en campos de cultivo, muy cercanas pero a ambas orillas del río Torrox, estando Torrox 2 a mayor altitud (véase la Fig. 2.1 de Material y Métodos). En 2006 se capturaron también machos adultos de una población de Salobreña (Granada) y en 2007 hembras adultas de las poblaciones de Torrox. La Tabla 4.10 recoge la frecuencia de cromosomas B en cada una de las muestras.

A cada uno de los individuos capturados se le midieron una serie de rasgos morfológicos, antes de que fuesen fijados y utilizados para otros estudios. Las medidas se tomaron con los individuos en decúbito lateral derecho y, en esta posición, se midió la longitud del pronoto, la longitud del fémur izquierdo y la longitud de la cabeza. Las medidas fueron realizadas con un calibre digital (Comecta) en mm.

La determinación del número exacto de cromosomas B de cada individuo, la realizamos mediante bandeo C, en preparaciones de folículos testiculares, en el caso de los machos, y en preparaciones de hemolinfa y ovariolas, para las hembras. Para ello, los folículos testiculares de los machos se fijaron en etanol:acético (3:1), mientras que varias ovariolas de las hembras fueron diseccionadas y depositadas en un vidrio de reloj con 1 ml de colchicina al 2% durante 6 horas, antes de ser fijadas en etanol:acético (3:1).

Hemos realizado separadamente los análisis estadísticos para machos y hembras ya que los saltamontes presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos.

Las diferentes comparaciones las hemos llevado a cabo mediante tests de Student y ANOVAs de 1 y 2 vías con el programa STATISTICA®.

Tabla 4.10. Frecuencia de cromosomas B en las poblaciones muestreadas.

Población	B	Año	Sexo	N	Número de cromosomas B					
					0B	1B	2B	3B	4B	5B
Salobreña	B ₂	2006	Machos	33	8	13	9	2	1	-
Torrox 0	B ₂₄	2006	Machos	51	12	20	12	4	2	1
			2007	Machos	22	4	9	7	2	-
			Hembras	27	8	5	14	-	-	-
Torrox 2		2006	Machos	54	7	25	17	4	1	-
	2007		Machos	20	2	9	6	2	1	-
		Hembras	40	10	18	11	1			

Resultados

Diferencias morfológicas entre los individuos pertenecientes a las dos poblaciones de Torrox

No hemos detectado diferencias significativas entre años para la longitud del pronoto y del fémur, pero sí en la longitud de la cabeza (2006= $6,28 \pm 0,03$ mm, 2007= $5,94 \pm 0,05$ mm) (ANOVA de 2 vías, Tabla 4.11). En cuanto a las diferencias poblacionales, sólo se obtuvieron valores significativos para la longitud del fémur, siendo mayor en los machos de la población de Torrox 2 (T0= $12,48 \pm 0,10$, T2= $12,76 \pm 0,08$). Sin embargo, en todos los casos la interacción (año x población) fue significativa mostrando que existe una relación entre las medidas tomadas cada año para las dos poblaciones. Por ello, comparamos ambas poblaciones considerando cada año por separado. En este caso, observamos que las diferencias en la longitud del fémur entre las poblaciones T0 y T2 sólo se mantienen en la muestra obtenida en 2006 pero no en la de 2007 (véase Tabla 4.12). En 2006, los machos de la población de T2 presentaron una mayor longitud de fémur que los machos de la población de T0. Para la longitud del pronoto y de la cabeza no se observaron diferencias significativas entre las dos poblaciones en ninguno de los dos años muestreados.

En el caso de las hembras capturadas en 2007, se observa que existen diferencias entre las dos poblaciones para las tres variables analizadas. En general, las hembras de la población T2 fueron significativamente más grandes que las hembras de T0 (Tabla 4.12).

Tabla 4.11. ANOVA de 2 vías para comprobar la existencia de diferencias morfológicas en los machos de varias poblaciones de Torrox muestreadas en dos años consecutivos, 2006 y 2007 ($df = 1, 144$).

Rasgo corporal (mm)	Factor	F	p
Pronoto	Población	0,04	0,848
	Año	1,90	0,170
	Población x año	51968,76	<0.0001
Fémur	Población	4,76	0,031
	Año	0,27	0,605
	Población x año	30584,07	<0.0001
Cabeza	Población	3,46	0,065
	Año	32,26	<0.0001
	Población x año	40600,59	<0.0001

Diferencia poblacional: Torrox vs Salobreña

En el año 2006 se capturaron individuos de una población de Salobreña (Granada), situada a 44 Km de Torrox, donde es frecuente la variante B₂.

Al comparar las dos poblaciones de Torrox con la muestra recogida ese mismo año de la población de Salobreña, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los tres parámetros medidos (Tabla 4.13).

Tabla 4.12. Valores medios de los rasgos morfológicos analizados en las diferentes muestras de Torrox en un mismo año analizado. Entre paréntesis se muestran los valores del error estándar.

Sexo	Año	Rasgo corporal (mm)	Población		t-Student	df	p
			Torrox 0	Torrox 2			
Machos	2006	Pronoto	5,55 (0,21)	5,56 (0,29)	-0,10	103	0,918
		Fémur	12,43 (0,83)	13,23 (2,08)	-2,54	103	0,012
		Cabeza	6,33 (0,30)	6,58 (1,59)	-1,05	100	0,294
	2007	Pronoto	5,48 (0,18)	5,50 (0,35)	0,19	40	0,851
		Fémur	12,60 (0,59)	12,75 (0,88)	0,63	40	0,534
		Cabeza	5,88 (0,30)	5,99 (0,38)	1,02	40	0,314
Hembras	2007	Pronoto	7,15 (0,40)	7,53 (0,34)	-4,04	64	<0,001
		Fémur	17,46 (1,55)	18,50 (0,77)	-3,63	64	<0,001
		Cabeza	8,52 (0,42)	8,85 (0,31)	-3,27	64	<0,001

Tabla 4.13. Resultado de los ANOVAs de 1 vía realizados para comprobar la existencia de diferencias entre las poblaciones de Salobreña y Torrox, muestreadas en 2006. Entre paréntesis se muestran los valores del error estándar de cada medida.

Rasgo corporal (mm)	Torrox0	Torrox2	Salobreña	df	F	p
Pronoto	5,55 (0,03)	5,56 (0,04)	5,59 (0,05)	2, 135	0,18	0,838
Fémur	12,43 (0,11)	12,77 (0,11)	12,63 (0,13)	2, 134	2,46	0,089
Cabeza	6,33 (0,04)	6,42 (0,05)	6,33 (0,05)	2, 132	1,54	0,218

Efecto de los cromosomas B en los individuos de las poblaciones de Torrox

El efecto asociado a la presencia de cromosomas B lo hemos analizado de forma separada para cada muestra, ya que hemos observado diferencias significativas entre poblaciones y año de muestreo. Sin embargo, en ninguno de los sexos, ni en ninguna de las tres poblaciones analizadas: Salobreña, Torrox 0 y Torrox 2 (Tabla 4.14) hemos encontrado diferencias significativas para ninguno de los tres parámetros medidos.

Tabla 4.13. Análisis mediante t-Student del efecto de la presencia de cromosomas B en las diferentes muestras. (n.s. = no significativo)

Año	Sexo	Población	Rasgo corporal (mm)		t-Student	df	p	p _{Bonfe}		
			0B	B						
2006	Macho	Salobreña	Pronoto	5,45 (0,19)	5,63 (0,33)	-1,50	31	0,143	n.s.	
			Fémur	12,42 (0,63)	12,69 (0,75)	-0,87	30	0,390	n.s.	
			Cabeza	6,10 (0,35)	6,41 (0,26)	-2,65	31	0,012	0,06	
		Torrox 2	Pronoto	5,23 (0,26)	5,56 (0,30)	-0,30	52	0,764	n.s.	
			Fémur	12,82 (0,71)	13,29 (2,22)	-0,55	52	0,586	n.s.	
			Cabeza	6,39 (0,26)	6,61 (1,70)	-0,34	52	0,734	n.s.	
		Torrox 0	Pronoto	5,58 (0,23)	5,54 (0,22)	0,51	49	0,613	n.s.	
			Fémur	12,35 (0,98)	12,46 (0,79)	-0,36	49	0,720	n.s.	
			Cabeza	6,34 (0,33)	6,33 (0,30)	0,08	49	0,937	n.s.	
	2007	Macho	Torrox 2	Pronoto	5,47 (0,25)	5,50 (0,18)	-0,19	18	0,847	n.s.
				Fémur	12,70 (0,42)	12,75 (0,62)	-0,11	18	0,916	n.s.
				Cabeza	6,07 (0,07)	5,86 (0,31)	0,89	18	0,382	n.s.
Torrox 0			Pronoto	5,35 (0,31)	5,51 (0,35)	-0,82	20	0,419	n.s.	
			Fémur	12,22 (0,47)	12,68 (0,94)	-0,94	20	0,357	n.s.	
			Cabeza	6,04 (0,23)	5,99 (0,41)	0,23	20	0,819	n.s.	
Hembras		Torrox 2	Pronoto	7,64 (0,37)	7,45 (0,74)	1,97	38	0,055	0,11	
			Fémur	18,69 (0,71)	18,43 (0,79)	0,94	38	0,351	n.s.	
			Cabeza	8,97 (0,34)	8,78 (0,30)	1,7	38	0,097	n.s.	
		Torrox 0	Pronoto	7,08 (0,30)	7,18 (0,45)	0,59	24	0,59	n.s.	
			Fémur	16,83 (2,05)	17,73 (1,24)	-1,39	24	0,17	n.s.	
			Cabeza	8,00 (0,28)	8,50 (0,48)	0,53	24	0,582	n.s.	

p_{Bonfe}, corrección realizada aplicando el método secuencial de Bonferroni.

Discusión

De las tres medidas que hemos utilizado en este análisis, la longitud del pronoto es la más fácil de medir al estar este esclerito dorsal claramente delimitado, minimizándose así los errores en la toma de medidas y obteniéndose una menor variación. Martín-Alganza et al. (1997) midieron una serie de rasgos morfológicos externos tales como, la longitud y anchura del tórax y la longitud de las tegminas, del fémur y de la tibia, en machos y hembras de *Eyprepocnemis plorans* en la población de Salobreña. Estos autores concluyeron que la longitud del tórax era un buen indicador del tamaño corporal de los saltamontes y debería ser considerada como un índice del tamaño corporal, ya que esta medida explicaba, en un análisis de componentes principales, el 80% de la varianza observada entre individuos.

Los resultados obtenidos muestran que hay diferencias en el tamaño de los individuos de las dos poblaciones de Torrox muestreadas, especialmente en el caso de las hembras, con diferencias mucho más patentes que para los machos. En general, las hembras de Torrox 2 fueron de mayor tamaño que las hembras de Torrox 0. Posiblemente estas variaciones poblacionales se deban tanto a factores genéticos como a factores ambientales, como la temperatura o la vegetación en cada una de las poblaciones. Ambas poblaciones se encuentran en campos de cultivo y separadas aproximadamente por 1 Km de distancia, aunque Torrox 2 se encuentra a mayor altitud. Es lógico pensar que los eventos de migración entre ambas poblaciones sean frecuentes, ya que los saltamontes son especies migratorias con elevado poder de dispersión. Tampoco hay que descartar que procesos de deriva estén también afectando a la estructura genética de estas poblaciones. Por ejemplo, el movimiento de las tierras de cultivo durante el arado puede ocasionar la pérdida de puestas de saltamontes que son depositadas bajo tierra, e incluso, el uso de insecticidas y de fertilizantes puede afectar también al tamaño efectivo de la población.

Raramente el efecto de los cromosomas B se pone de manifiesto sobre caracteres fenotípicos externos, aunque, como hemos mencionado en la introducción de este apartado, existen algunas excepciones. Recientemente se ha constatado que los machos de varias poblaciones del saltamontes *Dichroplus elongatus*, portadores de un cromosoma B mitóticamente inestable, son más pequeños y seleccionados negativamente en comparación con los machos que carecen de este cromosoma. Sin embargo, en las hembras de esta especie la presencia de Bs no afecta al tamaño corporal (Rossetti et al. 2007). Este cromosoma B presenta mecanismos de acumulación a través de los machos y son las hembras las que toleran mejor su presencia, mostrando una frecuencia de cromosomas B significativamente mayor que la de los machos.

En *E. plorans*, los cromosomas B presentan mecanismos de acumulación a través de las hembras (Herrera et al. 1996, Zurita et al. 1998) y disminuyen la fertilidad de las hembras, al menos en el caso de B₂₄ (Zurita et al. 1998). Además, en las poblaciones de Torrox, las hembras parecen ser menos tolerantes a números altos de cromosomas B que las machos, (véase

distribución de frecuencias en Fig. 1.6) Curiosamente esta situación es similar al caso *D. elongatus*, pero en hembras. Sin embargo, en nuestro caso, los resultados presentados en este trabajo muestran que la presencia de B₂₄, al igual que B₂ (Martín-Alganza et al. 1997), no afecta al tamaño corporal de los individuos portadores de este cromosoma. La ausencia de efectos sobre caracteres somáticos puede ser la estrategia esperada de un parásito genómico, que se transmite y acumula en la línea germinal.

Bibliografía

- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. The evolution of the genome (Gregory TR, ed.): 223-286
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD & Shaw MW. 1997. Evolution of a near-neutral B chromosome. In: *Chromosomes Today* (eds. Henriques-Gil N, Parker JS & Puertas MJ), Chapman and Hall, London, 12, 301-318
- Cabrero J, Alché JD & Camacho JPM. 1987. Effects of B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29: 116-121.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW, Camacho JPM. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76: 633-639
- Jackson RC & Newmark KP. 1960. Effect of supernumerary chromosome on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 132: 1316-1317.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 1995. Changes in NOR activity pattern in presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome* 38: 68-74.
- Martín-Alganza A, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 1997a. Supernumerary heterochromatin does not affect several morphological and physiological traits in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Hereditas* 126: 187-189.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1998. Parallel effect of a B chromosome and a mite decreasing female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 265: 1903-1909.
- Perfectti F & Werren JH. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* 55: 1069-1073.
- Rosetti N, Vilardi JC, Remis MI. Effect of B chromosome and supernumerary segments on morphometric traits and adult fitness components in the grasshopper, *Dichroplus elongatus* (Acrididae). 2007. *The authors* 20: 249-259.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M & Parzefall J. 1995. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373: 68-71.

- Staub RW. 1987. Leaf striping correlated with presence of B chromosome in maize. *J. Hered.* 78: 71-74.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2008 Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma*.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52, 274-277.



Discusión

En este capítulo final hacemos una síntesis global acerca del origen, expresión y efectos del cromosoma B₂₄, teniendo en cuenta todos los resultados anteriormente expuestos, que fueron discutidos en mayor profundidad, pero de forma separada, en cada uno de las secciones anteriores.

El principal objetivo de la presente memoria de Tesis Doctoral es continuar ampliando el conocimiento de los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*, especialmente del cromosoma B₂₄ presente en Torrox (Málaga). Para ello, nos planteamos poner a prueba la hipótesis del origen intraespecífico a partir del cromosoma X (López-León et al. en 1994), así como determinar si el cromosoma B₂₄ se expresa y si tiene efectos a niveles génico, celular o individual.

Origen de los cromosomas B de *E. plorans*

Uno de los objetivos generales que nos planteamos, fue dar respuesta a la siguiente cuestión,

¿Realmente los cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*, presentes en las poblaciones españolas, se han originado a partir del cromosoma X como sugieren los estudios realizados por López-León et al. en 1994? Si no fuese así, ¿existen otros posibles cromosomas A que pudieran ser los antecesores de los Bs?

En cuanto al origen de los B de *Eyprepocnemis plorans*, los datos obtenidos hasta el momento sugerían un origen intraespecífico de estos cromosomas a partir del cromosoma X. El brazo largo del cromosoma B₂ de *E. plorans* contiene una secuencia de DNA repetitivo de 180 pb (satDNA) y un bloque de genes ribosómicos (rDNA) 45S, localizado distalmente. Puesto que la ordenación de estas dos secuencias respecto al centrómero sólo coincidía con la del cromosoma X, López-León et al. (1994) sugirieron que, en esta especie, los cromosomas B podrían haber derivado de la región paracentromérica del cromosoma sexual, con posterior amplificación de estos dos tipos de secuencias repetitivas. Por otra parte, Bakkali (2001) propuso que el cromosoma S₁₁ también podría ser candidato como cromosoma A ancestral del B, basándose en que este autosoma, en las poblaciones marroquíes, presenta la misma ordenación del DNA repetitivo y el ribosómico que los cromosomas X y B. Esta disposición también ha sido observada en otras poblaciones españolas (Cabrero et al. 2003a) y del Cáucaso (Cabrero et al. 2003b). Sin embargo, el cromosoma S₁₁ posee en la región paracentromérica un cluster de rDNA 5S en todas las poblaciones analizadas, que no aparece en el cromosoma B de las poblaciones españolas (Cabrero et al. 2003b). Por ello, nuestra hipótesis de partida fue la propuesta por López-León et al. (1994) de un origen a partir del X (véase Fig. 5.1).

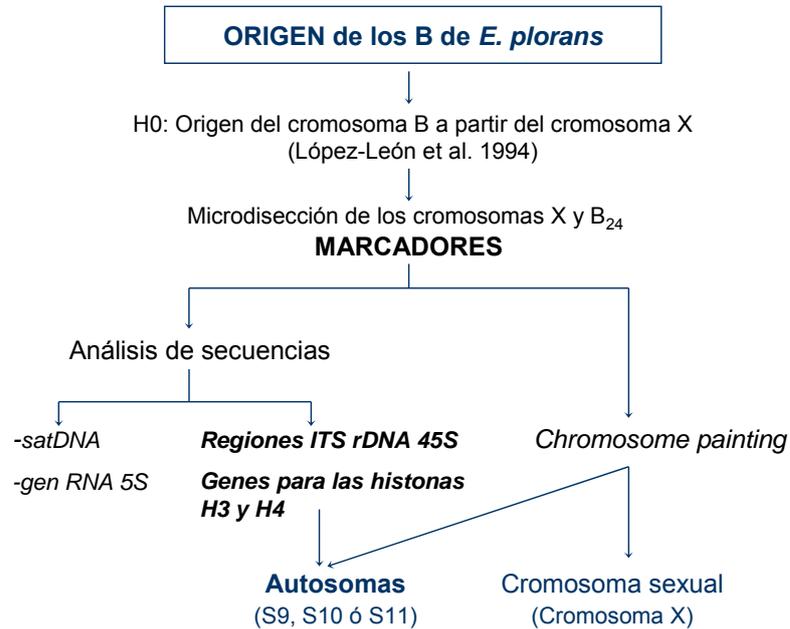


Figura 5.1. Esquema-resumen de los resultados obtenidos acerca del origen de los cromosomas B de *E. plorans*.

Los resultados que hemos obtenido por *chromosome painting*, a partir de los microdisseccionados, confirman que el cromosoma X y el cromosoma B₂₄ de *Eyprepocnemis plorans* comparten secuencias de DNA entre ellos y con la mayoría de los autosomas, principalmente satDNA y rDNA, en concordancia con los resultados obtenidos mediante FISH (López-León et al. 1994, Cabrero et al. 1999, 2003b). La existencia de secuencias compartidas entre los cromosomas A y B de esta especie apoya la hipótesis del origen intraespecífico de los cromosomas B de *E. plorans*. Sin embargo, estos datos no refutan la hipótesis del origen a partir del X (López-León et al. 1994), ni descartan la posibilidad de que el B se hubiera originado a partir de algún autosoma.

Como se ha demostrado en los apartados 3.2 y 3.4, el DNA satélite y el rDNA 5S no aportan pruebas concluyentes acerca del origen del B. El satDNA de *E. plorans* es muy homogéneo, como muestran los datos de diversidad nucleotídica y divergencia, posiblemente debido a que los mecanismos de homogenización de las secuencias resultan muy efectivos, tanto a nivel intra- como intercromosómico, por lo que no es muy informativo acerca del origen del B. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque existe variación poblacional para la localización de estas secuencias en las poblaciones españolas analizadas, el satDNA nunca está presente en el cromosoma S₁₀, descartándose este

cromosoma, a priori, como posible candidato para explicar el origen del cromosoma B que, en la mayoría de sus variantes, está constituido por grandes bloques de satDNA de 180 pb.

Por otra parte, la secuencia y localización de los genes para el RNA 5S no contribuye tampoco a esclarecer de forma taxativa el origen del B. La presencia en el B de copias funcionales, y su ausencia en el X, podrían sugerir el origen autosómico de éste. Sin embargo, la presencia de copias degeneradas, portadoras de la misma delección, compartidas por el X y el B, sería compatible con el origen del B a partir del X, siempre que se hubiese producido un movimiento posterior de las secuencias funcionales rDNA 5S desde los autosomas hacia el cromosoma B. Sin embargo, el hecho de que los genes para rRNA 5S puedan moverse por eventos de retrotransposición por todo el genoma (Selker et al. 1981, Drouin & Moniz de Sá 1995, Drouin 2000), impide descartar que se haya producido el movimiento independiente de estas secuencias al cromosoma B, o incluso que hubieran pasado del B al X. En cuanto a su localización, los genes ribosómicos 5S se sitúan, en *E. plorans*, en pequeños *clusters* en los cromosomas M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, S₉ y S₁₁, pero existe variación interpoblacional en la localización de estas secuencias (Cabrero et al. 2003b), aunque en ningún caso se han observado, mediante FISH, en los cromosomas X y B de las poblaciones españolas.

En cambio, los resultados obtenidos del análisis de las secuencias de las regiones ITS de los genes ribosómicos 45S y los genes para las histonas H3 y H4 (apartados 3.3 y 3.5) sí aportan datos decisivos sobre el origen del cromosoma B de *E. plorans*. Ambos grupos de secuencias descartan el origen del B a partir del cromosoma X (López-León et al. 1994), y apuntan a un origen autosómico.

En la mayoría de las poblaciones españolas los genes ribosómicos se localizan en la región paracentromérica de todos los cromosomas del complemento (López-León 1994, Cabrero et al. 1999), aunque los mayores bloques, las llamadas NORs primarias, que son las que se encuentran habitualmente activas, se localizan en los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y en el cromosoma X (Cabrero et al. 1987). Nosotros hemos demostrado que las regiones ITS presentan un alto grado de homogenización intracromosómica, que es mucho menor al nivel intercromosómico, por lo que detectamos variaciones en las secuencias ITS-1 de rDNA específicas de cromosoma, tal como es el caso de las obtenidas a partir de los cromosomas X y B₂₄ y otras secuencias que probablemente provienen de algún autosoma (véase Fig. 3.15 en el apartado 3.3). El árbol filogenético construido con estas secuencias también muestra claramente que las secuencias propias del cromosoma B₂₄ se parecen más a algunas secuencias derivadas de gDNA que a las secuencias derivadas del cromosoma X, lo que refuta la hipótesis de que los cromosomas B de *E. plorans* derivaron del cromosoma X (López-León et al. 1994). Además, el árbol filogenético sugiere la posibilidad del origen del B a partir de alguno de los tres autosomas pequeños (S₉, S₁₀ y S₁₁), que son los que portan los mayores clusters de rDNA 45S. Por ello, recientemente hemos realizado la microdissección de uno

de estos cromosomas, concretamente del S₁₁, que fue propuesto por Bakkali (2001) como el autosoma candidato del que se originase el cromosoma B, obteniendo datos preliminares (secuencias ITS del rDNA) que descartarían a este autosoma como posible candidato a ser el cromosoma del que deriva el B de *E. plorans*.

Por otro lado, el análisis de las secuencias para las histonas H3 y H4 también apoya la idea anteriormente expuesta de que es improbable que el B hubiera derivado del cromosoma X. Al igual que para las regiones ITS, las secuencias del cromosoma X son las más divergentes, tanto para los genes de la histona H3 como para las secuencias de los genes de la histona H4-181 pb, mostrando las secuencias del cromosoma B₂₄ más similitud con las secuencias autosómicas que con las del cromosoma X (véase la Fig. 3.23 y 3.25 en el apartado 3.5). Puesto que existen *clusters* para los genes de las histonas en los cromosomas L₂ y M₈, cabe la posibilidad de considerar a estos cromosomas como posibles candidatos originarios del B. No obstante, esas regiones autosómicas no contienen el satDNA de 180 pb ni el rDNA de 45S, que son los dos componentes mayoritarios del B. Además, la escasez de copias de H3 y H4 en el B (no detectable por FISH) no apoya tampoco la hipótesis anterior, puesto que sería esperable que el B hubiese conservado un mayor número de copias de los genes H3 y H4 si se hubiese originado a partir de estos cromosomas. Por último, los datos de secuencias sugieren que las copias presentes en el cromosoma B pueden tratarse de *orfonas*, es decir, secuencias de familias génicas dispersas por el genoma (Hentschel & Birnstiel 1981, Erín-López et al 2002). Una explicación simple sería que el autosoma del que derivó el B también llevase algunas copias de H3 y H4, aspecto que investigaremos próximamente mediante microdissección y amplificación de estos genes. La presencia de secuencias H3 y H4 en el B podría explicarse también por recombinación ectópica, bien con los autosomas L₂ y/o M₈ o bien, con otros autosomas del complemento, incluyendo el que putativamente dio origen al B, en los que haya copias de H3 y H4 en bajo número, un hecho que aclararemos en futuras investigaciones.

Por todo lo anterior, con los datos obtenidos de la localización y del análisis de las secuencias satDNA, rDNA 5S y 45S y los genes de las histonas H3 y H4, el cromosoma candidato más probable a ser origen del B, dada la información obtenida en esta Tesis Doctoral, sería S₉, puesto que posee el mismo tipo de secuencias que el cromosoma B, y no es descartado por ninguna de las informaciones disponibles. En un futuro próximo, esta hipótesis será puesta a prueba mediante la microdissección de dicho cromosoma y el análisis de sus secuencias.

Expresión y Efectos

Como hemos expuesto anteriormente, en el presente proyecto de Tesis Doctoral, también nos propusimos dar respuesta a otros dos objetivos

generales, relacionados con la posible expresión de B_{24} y los posibles efectos de este cromosoma en los individuos portadores (véase Fig. 5.2). Concretamente los objetivos eran:

¿Existen genes codificadores con capacidad de expresión en los cromosomas B de *E. plorans*? Y si existen, ¿se expresan?

¿Tienen los cromosomas B de *E. plorans* efecto sobre los individuos portadores? Si es así, ¿se produce ese efecto a los niveles génico, celular o individual?

En este sentido, la mayoría de los estudios realizados en el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* se han centrado en la variante B_2 . Uno de los primeros efectos de B_2 descritos en la literatura es el incremento en la frecuencia de quiasmas (Camacho et al. 1980). La presencia de este cromosoma influye, además, en la expresión de las NORs (Regiones Organizadoras Nucleolares) de los cromosomas A. Así, por ejemplo, se ha constatado que B_2 , en la población de Salobreña, puede influir en la expresión de las NORs de los cromosomas A (Cabrero et al. 1987), de manera que el número de NORs activas es mayor en los individuos 1B que en los individuos 0B. Sin embargo, en la población de Jete no se observa este efecto (López-León et al. 1995). Por otro lado, tampoco se han observado diferencias entre los individuos con y sin cromosoma B para varios rasgos morfológicos analizados, tales como el peso, longitud del tórax y del fémur o en el número de segmentos en las antenas (Martín-Alganza et al. 1997). Y en cuanto a los rasgos relacionados con la eficacia biológica, solamente se ha observado una disminución en la fertilidad de las hembras portadoras de número alto de cromosomas B (Muñoz et al. 1998). En referencia a la posible expresión de genes presentes en el cromosoma B_2 , solo se ha detectado expresión nucleolar asociada a él para un único macho de la población de Salobreña portador de una translocación entre este cromosoma y el cromosoma L_1 (Cabrero et al. 1987). En este individuo, los genes ribosómicos presentes en la región distal del cromosoma B_2 se encontraban activos en el 41% de las células analizadas. La inactivación del rDNA de B_2 podría estar relacionada con sus niveles de metilación (López-León et al. 1991).

Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre el posible efecto del cromosoma B_{24} de la población de Torrox. Se ha demostrado que este cromosoma disminuye la fertilidad de las hembras (Zurita et al. 1998) e incrementa la frecuencia de quiasmas (Camacho et al. 2002). Ambas características, parecen que están asociadas al carácter parasítico de este cromosoma.

En la presente Tesis Doctoral hemos analizado los patrones de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 y la actividad nucleolar, como indicadores de expresión asociada al cromosoma B_{24} .

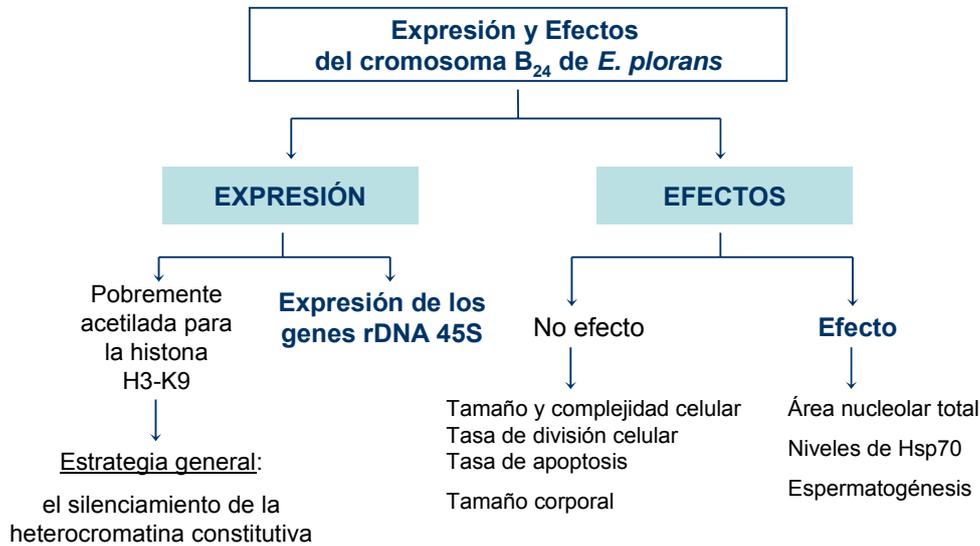


Figura 5.2. Esquema-resumen de los resultados obtenidos sobre la posible expresión y efectos del cromosoma B₂₄ de *E. plorans*.

Los patrones de acetilación de la lisina-9 de la histona H3 (H3-K9) muestran que el cromosoma X, que aparece heterocromatinizado durante la meiosis masculina, está hipoacetilado a lo largo de toda la espermatogénesis, incluso antes de que se produzcan los eventos de recombinación y sinapsis, pero no ocurre así en células somáticas. En cuanto al cromosoma B₂₄, la H3 se encuentra también hipoacetilada, en ese mismo aminoácido, a lo largo de toda la meiosis masculina y de la espermiogénesis. Este mismo patrón se observa en células somáticas, tanto de adultos como de embriones, indicando que posiblemente se trata de un mecanismo general para la represión génica de este cromosoma, y sugiriendo que su inactividad a nivel de expresión se produce tempranamente en el desarrollo.

En esta memoria también presentamos evidencias de que el cromosoma B₂₄, que presenta el mayor cluster de genes rDNA 45S del genoma de *E. plorans*, expresa su NOR recurrentemente en la población de Torrox (apartados 4.2 y 4.3). De hecho, hemos encontrado actividad nucleolar en más del 50% de los individuos en la última muestra analizada, observándose un incremento de esta proporción a lo largo del periodo muestreado, de forma que la frecuencia de machos que expresan la NOR del B en la población de Torrox se ha duplicado en los últimos 4 años.

En machos con B-NOR activas, la actividad nucleolar del cromosoma B₂₄ se observa, aproximadamente, en el 20% de las diplotenes. Esto implica que la

NOR del cromosoma B₂₄ puede aparecer en tres estados: 1) inactivo, cuando no se observa su actividad en ninguna de las diplotenes analizadas, 2) competente, el que muestran las células sin actividad NOR del B en los machos donde, en otras células, la NOR del B está activa, y 3) activo, el estado de la NOR de los Bs que muestran un nucleolo asociado a ellas. Cuando la NOR del B se encuentra en estado competente, se observan significativas interdependencias entre las NORs de los cromosomas A para su expresión, siendo positivas entre autosomas y negativas entre éstos y el cromosoma X. Sin embargo, cuando los Bs están inactivos o activos, estas interdependencias no se producen. Una posible explicación para estos resultados es que, cuando es competente, la NOR del B detrae parte de la maquinaria transcripcional de la célula sin producir rRNA, teniendo las NORs de los cromosomas A que competir por dicha maquinaria, mientras que, cuando la NOR del B está activa, contribuye a la producción de rRNA total celular y eso evita que las NORs de los As tengan que llegar a competir. Finalmente, si la NOR del B está inactiva no afecta a la maquinaria transcripcional de las NORs.

El cambio entre estos tres estados de la NOR del cromosoma B podría depender de modificaciones epigenéticas, por ejemplo cambios en los patrones de metilación y/o acetilación de las histonas. La inactividad presente en la mayoría de las variantes de cromosomas B de *E. plorans* es consistente con la metilación del rDNA (López-León et al. 1991) y la hipoacetilación de la H3-K9 (Cabrero et al. 2007). En especies de plantas, por ejemplo, se ha confirmado que tanto la eucromatina como la heterocromatina de los cromosomas B está sujeta a la metilación de la histona H3 (Houben et al. 2003). El que la NOR del cromosoma B esté ocasionalmente activa podría ser contradictorio con el patrón de hipoacetilación de la H3 en este cromosoma. Sin embargo, el hecho de que las NORs de los cromosomas A también se encuentren hipoacetiladas, puede indicar que la expresión de los genes ribosómicos, incluyendo la NOR del B, escapen a este mecanismo de silenciamiento, y sean otros mecanismos los implicados en la regulación de la expresión de los genes ribosómicos. También es posible que procesos estocásticos (Blake et al. 2003, Becskei et al. 2005) dentro de la célula influyan en qué NORs aparezcan en forma inactiva, competente o activa (Matyasek et al. 2007). Los patrones de expresión independiente de las NORs de los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y X en machos OB pueden ser una manifestación de tal silenciamiento aleatorio. Sin embargo, cuando los cromosomas B llevan NORs competentes, el control de la expresión de las NORs es alterado significativamente.

El estudio del área nucleolar y número de nucleolos también mostró que no hay efectos asociados al número de cromosomas B (excepto para el área nucleolar en Smir). Sin embargo, sí hemos encontrado efectos significativos en la población de Torrox cuando analizamos estos parámetros en relación al patrón par-impar en las células en leptotene, de forma que los individuos con número impar de cromosomas B tienen menor área nucleolar que los individuos con cromosoma B. Es conocido desde hace tiempo (Darlington y Upcott 1941) que ciertos cromosomas B producen mayores efectos cuando están en número impar. Es el llamado efecto par-impar, que postula que números impares de

cromosomas B son más deletéreos que cuando aparecen en número par (Jones & Rees 1982). Sin embargo, no se conoce la razón última de este patrón, más allá de que la presencia de univalentes B afecte al normal desarrollo de los procesos celulares, especialmente en el caso de caracteres relacionados con la meiosis (Camacho et al. 2004, Camacho 2005). Esta hipótesis explicaría por qué el efecto par-impar se manifiesta en leptotene-cigotene, pero no en diplotene de los mismos machos de Torrox (Teruel et al. 2007), ya que en leptotene-cigotene los cromosomas A inician su apareamiento (excepto el X que, en leptotene, suele quedar en la periferia del núcleo, casi expulsado del mismo), pero la existencia de Bs que no se aparean puede alterar el normal desarrollo del proceso de sinapsis y tener consecuencias sobre muchos de los caracteres endofenotípicos en los que se ha descrito el efecto par-impar, tales como el tamaño nucleolar (Teruel et al. 2007) o la frecuencia de quiasmas (Teruel et al. 2008).

Si los univalentes B en meiosis estuvieran implicados en el efecto par-impar, cabría esperar que este patrón se manifestase con mayor probabilidad cuando la proporción de univalentes fuese mayor. Esto podemos someterlo a prueba con los datos del cromosoma B₂₄ en individuos con 2B de Torrox, donde la frecuencia de univalentes B en diplotene disminuyó desde el 56.87% en 2003 hasta el 35.62% en 2004. Con respecto a la frecuencia de quiasmas, los individuos de 2003, que mostraban más univalentes B, manifestaron el efecto par-impar, mientras que los de 2004, con menor frecuencia de univalentes, mostraron un efecto de dosis. Esto sugiere que, efectivamente, la manifestación del efecto par-impar, en caracteres relacionados con la meiosis, depende de la proporción de univalentes B existentes en los espermatozoides.

Hemos encontrado interesantes diferencias poblacionales en relación al área nucleolar, habiendo observado que las poblaciones con cromosomas B menos parasíticos (Smir) y neutralizados (Salobreña) presentan áreas nucleolares totales por célula mayores a las observadas en la población de Torrox, con la variante de B más parasítica (apartado 4.2). B₂₄ aparece así como un factor que puede haber estado asociado a la disminución del área nucleolar en Torrox. Es notable, sin embargo, que el área nucleolar total celular, en la población de Torrox, ha ido aumentando a lo largo de los últimos años concomitantemente con el nivel de expresión nucleolar del B, acercándose a los niveles encontrados en los individuos de las poblaciones de Smir y Salobreña. Esto sugiere que el B₂₄ puede estar siendo objeto de un proceso de neutralización, y coincide con las evidencias, en el mismo sentido, encontradas para la tasa de transmisión del B en Torrox (Perfectti et al. 2004) y Algarrobo, una población cercana (Manrique-Poyato et al. 2006).

El efecto más deletéreo de los cromosomas B de *E. plorans* sobre la eficacia biológica de los individuos portadores es la disminución de la fertilidad de las hembras, tal y como observaron Muñoz et al. (1998) al estudiar los efectos paralelos del cromosoma B₂ y de los ácaros del género *Podapolipus*, y como encontraron Zurita et al. (1998) para el cromosoma B₂₄ en Torrox. Sin embargo, en los últimos años este cromosoma ha reducido su virulencia (medida como su

efecto negativo en la fertilidad de las hembras) (Perfectti et al. 2004). Otros datos que también apuntan en esta misma dirección son los referentes a la frecuencia de quiasmas, parámetro que ha sido previamente relacionado con el estado evolutivo de este polimorfismo (Camacho et al 2002). En muestras de los años '90, se observaban mayores incrementos en la frecuencia de quiasmas por célula, asociados a la presencia de B_{24} , que en muestras más recientes analizadas en la presente tesis. Todo ello nos hace pensar que este cromosoma B, el más parasítico descrito hasta el momento en *E. plorans*, está siendo neutralizado, mostrando algunas características típicas de un parásito en proceso de atenuación de sus efectos. Existe también la posibilidad de que llegue a interactuar con el genoma A de forma mutualista, especialmente si contribuyese a la producción de rRNA de una forma regular.

El análisis de la estructura de los nucleolos de *E. plorans* al microscopio electrónico de transmisión, no arrojó evidencias de que el cromosoma B_{24} afecte a la ultraestructura nucleolar, ya que en todos los tejidos y células analizadas hemos encontrado nucleolos con morfología semejante. Puesto que no hemos podido distinguir si los nucleolos analizados estaban asociados a cromosomas A o B, no es posible concluir nada respecto a si los nucleolos producidos por los Bs son iguales o diferentes a los de los As.

Por otra parte, hemos observado que los individuos de ambos sexos, capturados en Torrox, muestran niveles de la proteína de choque térmico, Hsp70, en sus gónadas, que son menores cuantos más cromosomas B tienen. Este efecto podría tener que ver con la disminución del área nucleolar asociada a la presencia de este cromosoma en esta misma población (Teruel et al. 2007). La principal función de la proteína Hsp70 está relacionada con el ensamblaje y el mantenimiento del nucleolo en condiciones adversas (Pelhma 1984, Morcillo et al. 1997), por tanto, es de suponer que nucleolos de menor tamaño requieran menores cantidades de Hsp70 para su mantenimiento. Esto explicaría por qué en la población de Salobreña, donde el cromosoma B predominante (B_2) se encuentra neutralizado por el genoma hospedador (Camacho et al. 1997), tanto el tamaño nucleolar (apartado 4.2) como los niveles de Hsp70 (apartado 4.5) sean significativamente superiores a los observados en Torrox.

La disminución de los niveles de Hsp70 en individuos con B de Torrox parece ilógica, ya que esta proteína actúa precisamente en situaciones de estrés y, es de suponer, que la presencia de cromosomas B produce estrés sobre las células y órganos de los individuos portadores. Existen dos explicaciones posibles para justificar el patrón observado. Por un lado, los niveles de Hsp70 detectados representan un efecto negativo del B que implica una disminución de la capacidad de respuesta al estrés. Este efecto se manifestaría tanto a nivel poblacional (en Salobreña se observan mayores niveles de Hsp70 asociados a una variante cromosómica menos virulenta) y a nivel individual en Torrox (con individuos portadores de mayor número de cromosomas B_{24} presentando muy bajos niveles de Hsp70). Sin embargo, estos niveles de expresión, también son compatibles con la observación de que, en poblaciones naturales sujetas a factores estresantes durante largos periodos, se observan niveles muy bajos de

esta proteína (véase Sørensen et al. 2003). En experimentos realizados en laboratorio, los individuos y células sometidos a estrés térmico muestran un incremento en la expresión de la proteína inducible Hsp70. En cambio, los análisis realizados en poblaciones naturales de *Drosophila* muestran una disminución en los niveles de la Hsp70 inducible, cuando estas poblaciones están sometidas a un estrés constante (Sørensen et al. 1999, 2003). Es posible que en las poblaciones naturales, frecuentemente expuestas a estrés, el costo de la expresión de Hsp70 sea mayor que el beneficio producido, por lo que las poblaciones se adaptan por otros medios al estrés al que están sometidas (Sørensen et al. 2003). La ausencia de efectos sobre los niveles de Hsp70 en ganglio es congruente con la ausencia de efectos sobre otros caracteres somáticos, ya que cabría esperar, al tratarse de un parásito genómico, que sus efectos sean mayores en el tejido gonadal (que es por donde se transmiten) que en el somático (a cuyo nivel sus efectos deletéreos pueden disminuir la eficacia biológica de los portadores y, por tanto, las posibilidades de transmisión del B).

Como una primera aproximación general al estudio del efecto de los cromosomas B en la expresión génica en gónadas masculinas, hemos realizado una hibridación con cDNA de testículos de machos con y sin cromosoma B en *microarrays* de *Drosophila melanogaster*, encontrando cambios de expresión en 34 genes, de forma que, en los individuos con cromosoma B₂₄, 9 genes estaban sobreexpresados y 25 subexpresados, con respecto a los individuos 0B. Son datos preliminares procedentes de una hibridación heteróloga, en los que profundizaremos en futuras investigaciones, pero que son indicativos de que el cromosoma B afecta a la expresión de otros genes del genoma de *E. plorans*

Por otro lado, los cromosomas B producen una variación intraespecífica en la cantidad de DNA nuclear (véase el apartado de "Efectos" en la Introducción), por lo que es lógico pensar que su mera presencia influya en características celulares y/o individuales. También cabría esperarse que sus efectos fuesen mayores a nivel celular que a nivel individual, porque la propia fisiología del individuo podría amortiguar tales efectos. En este sentido, el B₂₄ tiene un tamaño de 781 x 10⁶ pb (Cabrerero et al. datos no publicados), lo que supone un incremento de aproximadamente el 10% en la cantidad de DNA de las células portadoras con respecto al genoma 0B (7900 x 10⁶ pb). Sin embargo, este incremento parece que no tiene efecto sobre los parámetros celulares medidos, tales como el tamaño y la complejidad celular, y tasa de división celular y de apoptosis.

El cromosoma B₂₄ influye negativamente en la espermatogénesis, aumentando significativamente el número de espermátidas aberrantes, tanto de macro- como de microespermátidas. Esta proporción de espermátidas anómalas ocasiona una reducción del número de espermatozoides viables, aunque el efecto que esto puede tener sobre la fertilidad de los machos no ha sido evaluado. El efecto de B₂₄ sobre las macroespermátidas sigue un patrón par-impar, lo que pone de manifiesto, de nuevo, el efecto perjudicial que la presencia de cromosomas B en número impar tiene en los individuos (Jones & Rees, 1982), tal vez debido a la presencia de éstos en forma univalente

(Camacho et al. 2004). Estos autores sugieren que el cromosoma B en forma univalente, puede quedar retardado en anafase I y provocar una restitución del núcleo y, por tanto, la formación de macroespermátidas. En individuos con número par de cromosomas B, estos cromosomas pueden formar bivalentes, evitándose así la formación de macroespermátidas. Los resultados de microscopía electrónica muestran la presencia de gran número de espermátidas tetraploides, lo que indica que el proceso de formación de las espermátidas debe fallar, principalmente, en la separación anáfasis. Sin embargo, la existencia de macroespermátidas triploides en *E. plorans* sugiere que en esta especie también se produce cierto nivel de fusión celular que da lugar a la formación de estas macroespermátidas poliploides en número impar. El número de microespermátidas también aumentó en presencia de B₂₄, manifestándose más intensamente en los individuos con número impar de cromosomas B, sugiriendo que las microespermátidas podrían corresponder principalmente a cromosomas B excluidos de los núcleos resultantes de las divisiones meióticas.

El efecto de los cromosomas B es raramente aparente sobre caracteres fenotípicos externos, aunque existen algunas excepciones como, por ejemplo, la planta *Haplopappus gracilis* donde la presencia del cromosoma B cambia el color de los aquenios (Jackson & Newmark 1960), o el maíz, donde los individuos portadores de cromosomas B presentan las hojas rayadas (Staub 1987). Los parásitos de transmisión puramente vertical, como es el caso de los cromosomas B, pueden reducir su virulencia asociada a rasgos morfológicos (esto es, atenuarse) siempre que su tasa de transmisión no se reduzca (Anderson & May 1982, Ewald 1994). En el saltamontes *E. plorans* no hemos encontrado, hasta el momento, evidencias de efectos del B sobre rasgos morfológicos, ni para la variante B₂ (Martín-Alganza et al. 1997) ni para B₂₄ (apartado 4.8). La ausencia de efectos sobre caracteres somáticos, como hemos mencionado anteriormente, es una estrategia esperada de un parásito genómico que, para mantenerse en las poblaciones, debería ejercer pocos efectos deletéreos al nivel somático y los que fuesen necesarios al nivel germinal, dado que es en éste último lugar donde se juegan su transmisión y, por tanto, su destino evolutivo (Camacho 2005).

Conclusiones |

1. Además del ADN satélite de 180 pb específico de *E. plorans* y del ADN ribosómico 45S, cuya existencia en el cromosoma B₂₄ era conocida previamente, hemos detectado, mediante amplificación por PCR de DNA de cromosomas B microdisecionados, la presencia de genes RNA 5S y genes para las histonas H3 y H4, aunque deben de estar en bajo número ya que no son detectables mediante FISH.
2. El DNA satélite de 180 pb es muy homogéneo dentro del genoma de *E. plorans*, observándose pocas diferencias en secuencia entre los cromosomas X, B₂₄ y el DNA genómico, por lo que estas secuencias no son informativas acerca del origen del cromosoma B en *E. plorans*. Sin embargo, su ausencia en el cromosoma S₁₀ lo descartaría como posible candidato del origen del B.
3. Los mecanismos de evolución concertada de los genes ribosómicos de *E. plorans* son más eficaces al nivel intracromosómico que entre cromosomas, originando así variaciones en las secuencias ITS del rDNA, que son específicas de cromosoma, tal como es el caso de las secuencias de los ITS observadas en los cromosomas X y B₂₄.
4. Las secuencias de los ITS del cromosoma B₂₄ muestran más similitud con las secuencias localizadas en los autosomas que con las secuencias del cromosoma X. Esto contradice la hipótesis del origen de los cromosomas B de *E. plorans* a partir del cromosoma X y apoya la idea de un origen autosómico del cromosoma B, presumiblemente a partir de alguno de los tres cromosomas pequeños, que son los que poseen los mayores bloques de genes ribosómicos 45S.
5. Las secuencias de los ITS y de los genes de las histonas H3 y H4 presentes en el cromosoma X, muestran una alta divergencia con respecto a las secuencias presentes en los otros cromosomas, lo que indica, o bien un mayor tiempo de divergencia, o una tasa de evolución más alta en este cromosoma que en los demás cromosomas, incluyendo al B₂₄.
6. Los genes de las histonas H3 y H4 del cromosoma B₂₄ presentan más similitud con las secuencias autosómicas que con las del cromosoma X, lo que refuerza la idea de un origen autosómico del cromosoma B.
7. El rDNA 5S no constituye un buen marcador para dilucidar el origen de los cromosomas B de *E. plorans*, ya que la presencia de copias funcionales en el B, y su ausencia en el X, podría sugerir el origen autosómico del B. Sin embargo, la presencia de copias degeneradas, portadoras de la misma delección, compartidas por el X y el B sería compatible con el origen del B a partir del X y un movimiento posterior de las secuencias funcionales rDNA 5S de los autosomas al cromosoma B. La alta movilidad de estas secuencias rDNA 5S podría explicar estos patrones.
8. Los patrones de acetilación de la lisina-9 de la histona H3 muestran que el cromosoma B₂₄ está hipoacetilado a lo largo de toda la meiosis masculina y de la espermiogénesis. Este mismo patrón se observa en células somáticas, tanto

de adultos como de embriones, indicando que se trata de un mecanismo general para el silenciamiento de este cromosoma. Por otra parte, el cromosoma X, que se heterocromatiniza durante la meiosis masculina, muestra también hipoacetilación de la H3 en este mismo aminoácido a lo largo de toda la espermatogénesis, incluso antes de los eventos de recombinación y sinapsis, pero no ocurre así en células somáticas.

9. Los genes ribosómicos localizados en la región distal del cromosoma B₂₄ muestran actividad nucleolar, detectable por la presencia de nucleolos asociados en diplotene. La NOR del B, cuando está activa, contribuye en un 25 % al total del área nucleolar celular. Sin embargo, no existen diferencias para el área nucleolar entre células con o sin expresión de la NOR del B, lo que sugiere que el área nucleolar total por célula debe estar sujeta a un estricto control en esta especie.

10. Existen diferencias significativas para el tamaño del nucleolo, aunque no para el número de nucleolos, entre poblaciones con distintas variantes de cromosomas B, de forma que en la población con la variante parasítica (Torrox), el tamaño nucleolar es menor que en las poblaciones con variantes neutralizadas (Salobreña y Smir), sugiriendo que los cromosomas parasíticos disminuyen el tamaño nucleolar.

11. Existe correlación positiva entre los autosomas, y negativa entre éstos y el cromosoma X, para el tamaño de los nucleolos formados por los cromosomas S₉, S₁₀, S₁₁ y X, cuya manifestación depende de la existencia de cromosomas B con la NOR competente, pero no activa.

12. La ultraestructura del nucleolo de *E. plorans* no muestra diferencias asociadas a la presencia del cromosoma B₂₄ en los tres tejidos analizados (testículo, ovariolas y ganglio cerebral), observándose nucleolos semejantes a los descritos en mamíferos.

13. La presencia del cromosoma B₂₄, independientemente de su número, no tiene efecto sobre la morfología, tamaño y complejidad celular. Tampoco influye en el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular ni en la tasa de apoptosis.

14. La presencia de cromosomas B influye negativamente en el proceso de espermatogénesis de los machos portadores, aumentando significativamente el número de espermátidas aberrantes, tanto de macro- como microespermátidas. Por otra parte, el efecto par-impar observado sobre la producción de espermátidas aberrantes, apoya la idea de que los cromosomas B, en número impar, son más perjudiciales para los individuos portadores que en número par.

15. El cromosoma parasítico B₂₄ disminuye los niveles de la proteína Hsp70 en el tejido gonadal, tanto de machos como de hembras, pero no en tejido somático. Independientemente de la temperatura, existe un patrón decreciente en los niveles de Hsp70 relacionado con el número de cromosomas B₂₄. Estos

efectos, sin embargo, no se apreciaron en los machos analizados de la población de Salobreña donde la variante más frecuente es el cromosoma neutralizado B_2 .

16. El cromosoma B_{24} no afecta a parámetros relacionados con el tamaño corporal como son la longitud del pronoto, la longitud del fémur izquierdo y la longitud de la cabeza.

Conclusions |

1. In addition to the 180 bp satellite DNA, specific for *E. plorans*, and the 45S rDNA, whose existence in the chromosome B₂₄ was previously known, we have detected, through PCR amplification of DNA coming from microdissected B chromosomes, the presence of 5S rRNA genes and H3 and H4 histone genes in the B₂₄ chromosome, though there must be just a few copies because they are not detectable through FISH.
2. The 180 bp satellite DNA is very homogeneous within the *E. plorans* genome, and shows only a few sequence differences between the X and B₂₄ chromosomes and the genomic DNA, so these sequences do not provide useful information about the origin of B chromosomes in *E. plorans*. However, the absence of this repetitive DNA in the S₁₀ chromosome would reject it as a possible candidate.
3. The mechanisms of concerted evolution of *E. plorans* ribosomal genes are more effective at the intrachromosomal level than between chromosomes. This explains the sequence differences observed among the X and B₂₄ chromosomes for the ITS regions of the rDNA.
4. The ITS sequences in the B₂₄ chromosome show more similarity with those located in the autosomes than with those in the X chromosome. This contradicts the hypothesis of the origin of the *E. plorans* B chromosomes from the X chromosome and supports the idea of their autosomal origin, presumably from any of the three smallest autosomes, which have the biggest blocks of 45S rDNA.
5. The ITS rDNA sequences and the H3 and H4 histone genes found in the X chromosome show a high divergence with regard to those present in the other chromosomes. This indicates either a greater time of divergence or a higher evolutionary rate in this chromosome than in the other chromosomes, including B₂₄.
6. The H3 and H4 histone genes of the B₂₄ chromosome show more similarity with the autosomal copies than with those in the X chromosome, which reinforces the idea for an autosomal origin of the B chromosome.
7. The 5S rDNA does not constitute a good marker to explain the origin of *E. plorans* B chromosomes, as the presence of functional copies in the B and its absence in the X could suggest an autosomal origin, but the presence of degenerated copies, carrying the same deletion, in the X and the B would be compatible with an origin of the B from the X chromosome and a subsequent movement of 5S rDNA functional sequences from the autosomes to the B chromosome. The high mobility of the 5S rDNA could explain these patterns.
8. The acetylation pattern of lysine-9 in the H3 histone indicates that the B₂₄ chromosome is hypoacetylated along all male meiosis and spermiogenesis. This same pattern is observed in somatic cells from adults and embryos, indicating

that it is a general mechanism for this chromosome silencing. On the other hand, the X chromosome, which is heterocromatinized during male meiosis, also shows hypoacetylation of the H3 lysine-9 along all male meiosis, even before recombination and synapsis, but it does not occur in somatic cells.

9. The ribosomal genes located in the distal region of the B₂₄ chromosome show nucleolar activity, detectable by the presence of nucleoli attached to them in diplotene cells. The B chromosome NOR, when active, contributes about 25% of total cell nucleolar area. However, there are no significant differences for total nucleolar area between cells with or without B-NOR expression, which suggests that this trait is subjected to a strict control in this species.

10. There are meaningful differences for nucleolus size, though there are no differences for the number of nucleoli, between populations with different variants of B chromosomes, in such a way that a population with the parasitic B variant (Torrox) showed lower nucleolus size than populations with neutralized B variants (Salobreña and Smir), suggesting that parasitic chromosomes diminish nucleolar size at population level.

11. There is a positive correlation between autosomes, and a negative one between these and the X chromosome, for the size of the nucleoli formed by the S₉, S₁₀, S₁₁ and X chromosomes, but the manifestation of these interdependences among A chromosomes are conditioned to the existence of B chromosomes with a competent but not active NOR.

12. The ultrastructure of the *E.plorans* nucleolus does not show any differences associated with the presence of the B₂₄ chromosome in the three tissues analyzed (testicle, ovary and cerebral ganglion), showing nucleoli similar to those described in mammals.

13. The presence of the B₂₄ chromosome, regardless of its number, has no effect over the morphology, size and cellular complexity. It does not have an influence either in the percentage of cells which are in the different stages of the cell cycle or in the apoptosis rate.

14. The presence of B chromosomes has a negative influence in the spermatogenesis process of male carriers, significantly increasing the number of both macro- and microspermatids. On the other hand, the odd-even effect observed about the production of aberrant spermatids supports the idea that B chromosomes in an odd number are more harmful for carrier individuals than in an even number.

15. The B₂₄ parasitic chromosome diminishes the levels of the Hsp70 protein in male and female gonads, but not in a somatic tissue. Regardless of the temperature, there is a decreasing pattern in the levels of Hsp70 related to the number of B₂₄ chromosomes. These effects, however, were not apparent in males from the Salobreña population where the most frequent variant is the neutralized B₂ chromosome.

16. The B_{24} chromosome does not affect parameters related to body size, like thorax, femur and head lengths, as it could be expected for a genome parasite that mainly cross-talks with the A genome at meiosis.

Perspectivas |

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos explorado el origen, la expresión y ciertos efectos del cromosoma B₂₄ de *E. plorans*. Sin embargo, como en cualquier investigación, no solo se cierra un capítulo sino que también se abren diversas posibilidades para continuar analizando los fascinantes cromosomas B. Por ello, en el presente apartado nos proponemos avanzar algunas vías de la futura investigación que se realizará en el seno del grupo de investigación donde se ha realizado la tesis doctoral.

Los datos de las secuencias ITS e histonas H3 y H4 obtenidos en el presente trabajo apuntan a un origen autosómico del cromosoma B y, más probablemente, a los tres cromosomas de menor tamaño, que son los que poseen los cluster mayores de rDNA ribosómico 45S. Para discriminar entre estos cromosomas candidatos hemos iniciado la microdissección de estos autosomas, para así poder realizar un análisis de sus secuencias y compararlas con las del cromosoma B. Las secuencias ITS-1, características de cada cromosoma, constituyen un marcador excepcional para establecer qué secuencias autosómicas muestran mayor similitud con las del B. Este estudio podría ampliarse a todos los autosomas del complemento (no hay que olvidar que todos contienen genes ribosómicos) y a otros tipos de secuencias, como las histonas H3 y H4. En este caso sería interesante investigar si, además de en el cromosoma L2 y M8, existen copias de los genes de las histonas en otros autosomas. La detección de copias dispersas (orfonas) en algún otro cromosoma, al igual que ocurre en el cromosoma B, podría también contribuir a esclarecer el origen del B. Por otra parte, puesto que los elementos móviles están extendidos por todo el genoma, también sería interesante el análisis de las secuencias de estos elementos en el B y los autosomas para averiguar si muestran una elevada homogeneidad entre cromosomas A y B (indicando una elevada intercomunicación entre A y B) o, por el contrario, una elevada diferenciación entre cromosomas, sugiriendo así poca evolución concertada entre cromosomas.

Otra línea de análisis que se puede llevar a cabo es el estudio a nivel molecular de la expresión de los genes ribosómicos 45S, cuantificando los niveles de transcripción de los cromosomas A y B. Dado que en las poblaciones de Torrox los cromosomas B expresan sus genes rDNA (lo que se pone de manifiesto por la visualización de un nucleolo asociado) y afectan a la expresión de las NORs principales del complemento cromosómico de *E. plorans*, sería interesante profundizar en la interdependencia, a nivel de regulación génica, entre cromosomas A y B. En esta tesis hemos demostrado que existen diferencias intracromosómicas para los ITS, sobre todo para los ITS-1, que nos permiten identificar los transcritos de rRNA provenientes de diferentes cromosomas (A y B). Así, sería muy interesante la cuantificación de los transcritos rRNA procedentes de cada cromosoma (A y B) en machos con números diferentes de cromosomas B. Así se podría estimar la variación en el nivel de transcripción del rDNA de los cromosomas B (en paralelo a su capacidad de organizar nucleolos visibles citológicamente), las diferencias en expresión del rDNA entre variantes de cromosomas B procedentes de varias poblaciones naturales, y los efectos de los cromosomas B sobre la

interdependencia entre cromosomas A respecto a los niveles respectivos de transcripción de su rDNA.

Hemos demostrado que la presencia de cromosomas B afecta a los niveles de la proteína Hsp70. Pero no hemos abordado si este efecto se produce a nivel de una disminución de la transcripción de estos genes o a través de otros mecanismos. Se podría estudiar mediante qPCR los niveles de mRNA para esta proteína y así dilucidar a qué nivel se produce este efecto. De igual forma, se puede investigar si los cromosomas B provocan cambios en los niveles de expresión de otros genes de los cromosomas A. Puesto que nuestro análisis preliminar, mediante hibridación del cDNA de *E. plorans* con microarrays de *D. melanogaster*, indicó que los machos con cromosomas B muestran sobreexpresión de 9 genes y subexpresión de 25 genes con respecto a los individuos OB, una línea de trabajo muy interesante será el análisis de la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa. Este mismo estudio nos planteamos realizarlo también en las hembras.

Otras posibilidades que caben reseñar en este capítulo de perspectivas, son el estudio de la posible expresión del satDNA de *E. plorans* (del que poseemos alguna evidencia) y la reconstrucción de la historia filogeográfica de la invasión del cromosoma B de las diferentes poblaciones de esta especie.

Por último, y habida cuenta de las posibilidades que las nuevas tecnologías de secuenciación masiva están abriendo, no es descabellado plantear la secuenciación completa de un cromosoma B. Ello permitiría disponer de abundante información para comprender mejor la biología de estos parásitos genómicos.

Bibliografía |

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelaziz M, Teruel M, Chobanov D, Camacho JP, Cabrero J. 2007. Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. *Cytogenet Genome Res.* 119 (1-2):143-6.
- Alexander M. 1981. Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. *A. Rev. Microbiol.* 35: 113-133.
- Alfenito MR and Birchler JA. 1993. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 135: 589-597.
- Anderson RM & May RM. 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85: 411-426.
- Araujo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F & Camacho JPM. 2001. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 268: 1127-1131.
- Bakkali M. 2001. Tesis Doctoral: Evolución de los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* en Marruecos.
- Bakkali M, Cabrero J & Camacho JPM. 2003. B^A interchanges are an unlikely pathway for B chromosome integration into the standard genome. *Chromosome Research* 11: 115-123.
- Battaglia E. 1964. Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia* 17: 245-299.
- Becskei A, Kaufmann BB & van Oudenaarden A. 2005. Contributions of low molecule number and chromosomal positioning to stochastic gene expression. *Nature Genetics* 37 (9): 937-944.
- Beukeboom LW. 1994. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* 73: 928-996.
- Bell G & Burt A. 1990. B chromosomes: Germ-line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology* 100: 19-26.
- Blake WJ, Kærn M, Cantor CR & Collin JJ. 2003. Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* 422: 633-637.
- Bosemark NO. 1954. On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. II. Inheritance of a standard type of accessory chromosome. *Hereditas* 40: 425-437.
- Brockhouse C, Bas JAB, Fereday RM, & Strauss NA. 1989. Supernumerary chromosomes evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32: 516-521.
- Cabrero J, Alché JD & Camacho JPM. 1987. Effects of B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29: 116-121.
- Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research* 5: 194-198.

- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM. 1999. Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435-439.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM and López-León MD. 2003a. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* *Chromosome Research* 11: 375-381.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 2003b. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207-211.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM. 2003c. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90: 377-381.
- Cabrero J, Manrique-Poyato MI, Camacho JPM. 2006. Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 114: 66-69.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jiménez R, Camacho JP. 2007 Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet Genome Res.* 119 (1-2):135-42.
- Camacho JPM, Carballo AR, Cabrero J. 1980. The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). *Chromosoma* 80: 163-176.
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD & Shaw MW. 1997a. Evolution of a near-neutral B chromosome. pp 301-318. In: *Chromosomes Today* (eds) Henriques-Gil N, Parker JS & Puertas MJ, Chapman and Hall, London, 12.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC & Cabrero J. 1997b. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* 149: 1030-1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW. 2000. B chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 163-178.
- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A, Perfectti F. 2002. Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 269: 2173-2177.
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD, Bakkali M & Perfectti F. 2003 The B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. *Genetica* 117: 77-84.
- Camacho JPM, Perfectti F, Teruel M, López-León MD, Cabrero J. 2004 The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenet Genome Res.* 106: 325-331.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. The evolution of the genome (Gregory TR, ed.): 223-286
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Caperta A, Morais-Cecílio L, Jones RN, Viegas W and Houben A. 2007. Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell* 19: 1738-1749.

- Carlson WR. 1969. Factors affecting preferential fertilization in maize. *Genetics* 62: 109-121.
- Carvalho AB. 2002. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 664-668.
- Cheng YM and Lin BY. 2003. Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics* 164: 299-310.
- Covert SF. 1998. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr. Genet* 33: 311-319.
- Darlington CD & Upcott MB. 1941. The activity of inert chromosome in *Zea mays*. *J Genet* 41: 275-296.
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS. 2002. Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111: 332-340.
- Dirsh VM. 1958. Revision of the genus *Eyprepocnemis* Fieber, 1853 (*Orthoptera: Acridoidea*). *Proc. Roy. Ent. Soc. Lond. B* 27: 33-45.
- Drouin G and Moniz de Sá M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat unit of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* 12: 481-493.
- Drouin G (2000) Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes. *Genome* 43:213-215.
- Eirín-López JM, AM González-Tizón, A Martínez, J Méndez. 2002. Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus spp*): possible evidence of an "orphan origin" for H1 histone genes. *J Mol Evol* 55: 272-283.
- Ewald P. 1987. Transmission modes and evolution of parasitism-mutualism continuum. *Ann. NY Acad. Sci.* 503: 295-306.
- Fisher RA. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon, Oxford.
- Franks TK, Houben A, Leach CR & Timmis JN. 1996. The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 105: 223-230.
- Fox DP, Hewitt GM & Hall DJ. 1974. DNA replication and RNA transcription of euchromatic and heterochromatic chromosome regions during grasshopper meiosis. *Chromosoma* 45: 43-62.
- González Sánchez M, González González E, Molina, F, Chiavarino AM, Rosato M, Puertas MJ. 2003. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90: 122-129
- González-Sánchez M, González-García M, Vega JM, Rosato M, Cuacos M, Puertas MJ. 2007. Meiotic loss of the B chromosome of maize is influenced by the B univalent co-orientation and the TR-1 knob constitution of the A chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 119: 282-290.
- Green DM. 1988. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma* 97: 55-70.

- Green DM, Zeyl CW & Sharbel TF. 1993 The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosome in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. J. Evol. Biol. 6: 417-441.
- Green DM. 1990. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. Genome 33: 818-824.
- Gutknecht J, Sperlich D & Bachmann L. 1995. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. Chromosoma 103: 539-544.
- Hackstein JHP, Hochstenbach R, Hauschteck-Jungen E & Beukeboom LW. 1996 Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? BioEssays 18: 317-323.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
- Hamilton WD. 1980. Sex versus non-sex parasite. Oikos 35: 282-290.
- Han F, Lamb JC, Yu W, Gao Z, Birchler JA. 2007. Centromere function and nondisjunction are independent components of the maize B chromosome accumulation mechanism. Plant Cell 19: 524-533.
- Hasegawa N. 1934. A cytological study on 8-chromosome rye. Cytologia 6: 68-77.
- Henrique-Gil N, Santos JL & Arana P. 1984. Evolution of a complex polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosoma 89: 290-293.
- Henriques-Gil & Arana 1990. Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Evolution 44: 747-753.
- Hentschel CC & Birnstiel ML. 1981. The Organization and Expression of Histone Gene Families. Cell 25: 301-313.
- Hernández F y Presa JJ. 1984. Sobre la biología de *Eyprepocnemis plorans* (charpentier, 1825)(Orthoptera: *Acrididae*), en la huerta de Murcia (S.E. España). Bol. Serv. Plagas 10: 245-249.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW & Camacho JPM. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 76: 633-639.
- Hewitt G M & John B. 1967. The B chromosomes system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb). III. The statistics. Chromosoma 21: 140-162.
- Hewitt GM. 1973a. Variable transmission rates of a B-chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb) (*Acrididae: Orthoptera*). Chromosoma 40: 83-106.
- Hewitt GM. 1973b. The integration of supernumerary chromosomes into orthopteran genome. Col. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 38: 183-194.
- Hewitt GM. 1979. Grasshoppers and Crickets. *Animal Cytogenetics*, 3, *Insecta*, 1, *Orthoptera*. Gebruder Borntraeger, Berlin-Stuttgart.
- Hoeprich PD. 1977. Host-parasite relationships and the pathogenesis of infectious disease. pp 34-45. In: *Infectious diseases* (ed. Hoeprich, PD), Harper & Row, London.

- Hoffmann AA & Hercus MJ. 2000. Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience* 50: 217-226.
- Houben A, Verlin D, Leach CR, Timmis JN. 2001. The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 110: 451-459.
- Houben A, Belyaev ND, Leach CR & Timmis JN. 1997. Differences in histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosome Res.* 5: 233-237.
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I. 2003. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 33: 967-973.
- Jaenike J. 1978. An hypothesis to account for the maintenance of sex within populations. *Evol. Theory* 3: 191-194.
- Ishak B, Jaafar H, Maetz JL & Rumpler Y. 1991. Absence of transcriptional activity of the B-chromosome of *Apodemus peninsulae* during pachytene. *Chromosoma* 100, 278-281.
- Jackson RC & Newmark K P. 1960. Effects of supernumerary chromosome on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 132: 1316-1317.
- Jamilena M, Ruiz-Rejón C & Ruiz-Rejón M. 1994. A molecular análisis of the origin of the *Crepis Capillaris* B chromosome *J. Cell. Sci.* 107: 703-708.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón M & Ruiz-Rejón C. 1995. Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosome of *Crepis Capillaris*. *Chromosoma* 104: 113-120.
- Janssens FA. 1909. Spermatogénèse dans les Batraciens. V. La théorie de la chiasmotypie, nouvelle interpretation des ciñeses de maturation. *Cellule* 25: 387-411.
- Jiménez MM, Romera F, González-Sánchez M & Puertas MJ. 1997. Genetic control of the rate of rye B chromosomes. III. Male meiosis and gametogenesis. *Heredity* 78: 636-644.
- Jin W, Lamb JC, Vega JM, Dawe RK, Birchler JA, Jiang J. 2005. Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell* 17: 1412-1423.
- John B & Hewitt GM. 1965. The B chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus*. I. The mechanisms. *Chromosoma* 16: 548-578.
- Johnson NA. 1997. Selfish genetic elements: Long-range dynamics predicted by non-equilibrium models. *Trends. Ecol. Evol.* 12: 376-378.
- Jones RN. 1985. Are B chromosomes selfish? In *The evolution of genome size* (ed. T. Cavalier-Smith), pp. 397-425. London:Wiley.
- Jones RN. 1991. B-chromosome drive. *Am. Nat.* 137: 430-442.
- Jones RN. 1995. Tansley review no. 85: B chromosome in plants. *New Phytol.* 131: 411-434.
- Jones RN & Puertas MJ. 1993 The B- chromosome of rye (*Secale cereale* L.). In *Frontiers in plant science research* (ed. K. K. Dhir & T. S. Sareen), pp. 81-112. Delhi: Bhagwati Enterprises.

- Jones RN & Rees H. 1967. Genotypic control of chromosome behaviour in rye. XI. The influence of B chromosomes on meiosis. *Heredity* 22: 333-347.
- Jones RN & Rees H. 1982 B chromosome. New York: Academic Press.
- Jones RN & Houben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trend Plant Sci.* 8: 417-423.
- Jones RN & Houben A. 2005. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:838-849.
- Jones RN, González-Sánchez M, González-García M, Vega JM, Puertas MJ. 2008. Chromosomes with a life of their own. *Cytogenet Genome Res.* 120:265-280.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research.* 30: 3059-3066.
- Kayano H. 1957. Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. *Proc. Jpn. Acad.* 33: 553-558.
- Keyl HG & Hägele K. 1971. B chromosomen bei *chironomus*. *Chromosoma* 35: 403-417.
- Kirk D & Jones RN. 1970. Nuclear genetic activity in B-chromosome rye, in terms of the quantitative interrelationships between nuclear proteins, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* 31: 241-254.
- Lamb JC, Riddle NC, Cheng YM, Theuri J, Birchler JA. 2007. Localization and transcription of a retrotransposon derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Res.* 15: 383-398.
- Langdon T, Seago C, Jones RN, Ougham H, Thomas H, Forster JW and Jenkins G. 2000. De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154: 869-884.
- López-Fernández C, Mezzanotte R, Gosálvez J. 1992. Autosomal, sex and B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera) viewed with restriction endonuclease in situ digestion. *Heredity* 68: 365-372.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 1991. A nucleolus organizer region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. *Chromosoma* 100: 134-138.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM, Cano MI, Santos JL. 1992. A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* 46: 529-539.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J, Viseras E, Camacho JPM, Santos JL. 1993. Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 71: 352-362.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM & Camacho JPM. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 2: 87-92.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 1995. Changes in NOR activity pattern in presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome* 38: 68-74.

- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Camacho JPM. 2008. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res.* 121: 260–265
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, de la Guardia RD, Sánchez A. 2004. X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* 12: 767–776.
- McAllister BF. 1995. Isolation and characterisation of a retro-element from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.* 4: 253–262.
- McAllister BF & Werren JH. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243–253.
- Manrique-Poyato MI, Muñoz-Pajares AJ, Loreto V, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 2006. Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 14: 693–700.
- Martín-Alganza A, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM. 1997. Supernumerary heterochromatin does not affect several morphological and physiological traits in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Hereditas* 126: 187–189.
- Martin DP, Williamson C and Posada D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21(2): 260–262.
- Megías L y Renal J. 1998. Técnicas generales. En: Manual de técnicas de Microscopía Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Renal J. y Megías L. (ed). Editorial Universidad de Granada.
- Miao VP, Covert SF & VanEtten HD. 1991a. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254: 1773–1776.
- Miao VP, Matthews DE & VanEtten HD. 1991b. Identification and chromosomal location of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 214–223.
- Montgomery EA, Huang SM., Langley CH & Judd BH. 1991. Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: genome structure and evolution. *Genetics* 129: 1085–1098.
- Morcillo G, Gorab E, Tanguay RM, Díez JL. 1997. Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in paquitene cells. *Experimental cell Research* 236: 361–370.
- Müntzing A. 1954. Cytogenetics of accessory chromosomes (B-chromosomes). *Caryologia* 6: 282–301.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM. 1998. Parallel effect of a B chromosome and a mite decreasing female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 265: 1903–1909.
- Navajas-Pérez R, Rubio-Escudero C, Aznarte JL, Rejón MR and Garrido-Ramos M. 2007. SatDNA Analyzer: a computing tool for satellite-DNA evolutionary análisis. *Bioinformatics* 23(6): 767 – 768.
- Nur U. 1963. A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma* 14: 407–422.

- Nur U. 1969. Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 27: 1-19.
- Nur U & Brett BLH. 1985. Genotypes suppressing meiotic drive of a B chromosome in the mealy bug *Pseudococcus obscurus*. *Genetics* 110: 73-92.
- Nur U, Werren JH, Eickbush DG, Burke WD, and Eickbush TH. 1988. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 240: 512-514
- Oliver JL, Posse F, Martínez-Zapater JM, Enriquez AM & Ruiz-Rejón M. 1982. B chromosomes and E1 isoenzyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis*. *Chromosoma* 85: 399-403.
- Ormerod MG. 1994. Flow Cytometry. A practical approach. 2nd edn. (Serie Editors: Rickwood D and Hames BD).
- Östergren G. 1945. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot. Notiser* 2: 157-163.
- Page BT, Wanous MK, and Birchler JA. 2001. Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. *Genetics* 159: 291-302.
- Parker JS, Taylor S & Ainsworth CC. 1982. The B chromosome system of *Hypochoeris maculata*. III. Variation in B-chromosome transmission rates. *Chromosoma* 85: 229-310.
- Pelham 1984. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3(13): 3095-3100.
- Perfectti F & Werren JH. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* 55: 1069-1073.
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD, Camacho JPM. 2004 Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet Genome Res.* 106: 338-343.
- Plowman AB & Bougourd SM. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72: 587-593.
- Posada D. 2006. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34: 700-703.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Puertas MJ, González-Sánchez M, Manzanero S, Romera F & Jiménez MM. 1998. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity* 80: 209-213.
- Puertas MJ. 2002. Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet Genome Res.* 96: 198-205.
- Rebollo E, Martín S, Manzanero S, Arana P. 1998. Chromosomal strategies for adaptation to univalency. *Chromosome Res.* 6: 515-531.

- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, Camacho JPM. 2004. Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J Evol Biol.* 17: 716–719
- Roman H. 1947. Mitotic non-disjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. *Genetics* 32: 391–409.
- Romera F, Jiménez MM & Puertas MJ. 1991. Factors controlling the dynamics of the B chromosome polymorphism in Korean rye. *Heredity* 67: 189–195.
- Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo CA, Puertas MJ. & Poggio, L. 1996. Genetic control of B chromosome transmission rate in *Zea mays* ssp. *Mays* (*Poaceae*). *Am. J. Bot.* 83: 1107–1112.
- Rosetti N, Vilardi JC, Remis MI. Effect of B chromosome and supernumerary segments on morphometric traits and adult fitness components in the grasshopper, *Dichroplus elongatus* (Acrididae). 2007. *The autors* 20: 249–259.
- Roskams J & Rodgers L. 2002. Lab Ref. A handbook of recipes, reagents and other reference tools for use at the bench. Cold Spring Harbor Laboratory PRESS.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- Rozen S & Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132: 365–86.
- Rufas JS, Iturra P, De Souza W & Esponda P. 1982. Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Arch. Biol.* 93: 267–274.
- Ruiz-Rejón M, Posse F & Oliver JL. 1980. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (*Liliaceae*): Effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79: 341–348.
- Rutishauser A & Röthlisberger E. 1966. Boosting mechanism of B chromosomes in *Crepis capillaris*. *Chromosomes Today* 1: 28–30.
- Sannomiya M. 1974. Cytogenetics studies on natural populations of grasshoppers with special reference to B-chromosomes I. *Gonista bicolor*. *Heredity* 32: 251–265.
- Sapre AB & Deshpande DS. 1987. Origin of B chromosomes in *Cix* L. through spontaneous interspecific hybridisation. *J. Hered.* 78: 191–196.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M & Parzefall J. 1995. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373: 68–71.
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I & Haaf T. 2002. Chromosome banding in Amphibia. XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia*. *Cytogenet Genome Res.* 57: 205–218.
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I & Schartl M. 2006. Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Reseach* 14: 231–242.

- Selker EU, Free S J, Metzberg RL & Yanofsky C. 1981. An isolated pseudogene related to the 5s RNA genes in *Neurospora crassa*. *Nature* 294:576-578.
- Sharbel TF, Green DM & Houben A. 1998. B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41: 14-22.
- Shaw MW. 1984. The population genetics of the B-chromosome polymorphism of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Biol. J. Linn. Soc.* 23: 77-100.
- Shaw MW & Hewitt GM. 1985. The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity*, 54: 259-268.
- Shaw MW & Hewitt GM. 1990. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: Where next? Pp 197-223. In: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (eds. Futuyma, D. & Antonovics, J.), Oxford Univ. Press, 7.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V , 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6: 1025-1037.
- Sørensen JG, Michalak P, Justesen J, Loeschcke V. 1999. Expression of heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal reistance. *Hereditas* 131: 155-164.
- Staub RW. 1987 Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *J. Hered.* 78: 71-74.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson JD., Higgins DG. and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Telenius H, Carter N.P, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA and Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2007 Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* 15 (6): 755-765.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2008 Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma*.
- Towbin HT, Staehelin T and Gordon J. 1979. Poliacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:4.350-4.354.
- van Valen L. 1973 A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1: 1-30.

- van Vugt J.F.A, Salverda M, de Jong J.H.a.n.s., Stouthamer R. 2003. The paternal sex ratio chromosome in the parasitic wasp *Trichogramma kaykai* condenses the paternal chromosomes into a dense chromatin mass. *Genome* 46 (4): 580-587.
- Viseras E, Cano MI, Camacho JPM, Santos JL. 1990. Relationship between mitotic instability and accumulation of B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Genome* 33: 23-29.
- Visintin R & Amon A. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol* 12: 372-377
- Volobujev VT & Timina NZ. 1980. Unusually high number of B-chromosome and mosaicism by them in *Apodemus peninsuale* (Rodentia, Muridae). *Tsitologiya Genet* 14: 43-45.
- Werren JH. 1991. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Am. Nat.* 137: 392-402.
- White MJ D. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, London.
- Wilson EB. 1907. The supernumerary chromosomes of *Hemiptera*. *Science* 26: 870-871.
- Zuker M, Mathews DH and Turner DH. 1999. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. pp. 11-43 In Barciszewski J. and Clark BFC (eds), *RNA Biochemistry and Biotechnology*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274-277.

Trabajos adicionales |

- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Res.* 2008 acceptedo
- Abdelaziz M, Teruel M, Chobanov D, Camacho JP, Cabrero J. 2007. Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. *Cytogenet Genome Res.* 119 (1-2):143-6.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Camacho JP. Histone H2AX phosphorylation is associated with most meiotic events in grasshopper. 2007. *Cytogenet Genome Res.* 116(4): 311-315.
- Perfectti F, Teruel M, López-León MD, Cabrero J. 2004. The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. J.M.P. Camacho. Issue in B Chromosome in the eukaryote genome of Cytogenetic and Genome Research 106: 325-331.

Anexo I | Alineamientos

Alineamiento 1. Alineamiento de las secuencias de ADN satélite de *Eyprepocnemis plorans*¹



¹ Alineamiento de las secuencias de ADN satélite utilizadas en este estudio, donde se muestran las diferentes sustituciones y las repeticiones de 3 o más A o T existentes a lo largo de toda la unidad de repetición.

Alineamiento 2. Alineamiento de las secuencias ITS de *Eyrepocnemis plorans**

Extremo 3' del gen 18S

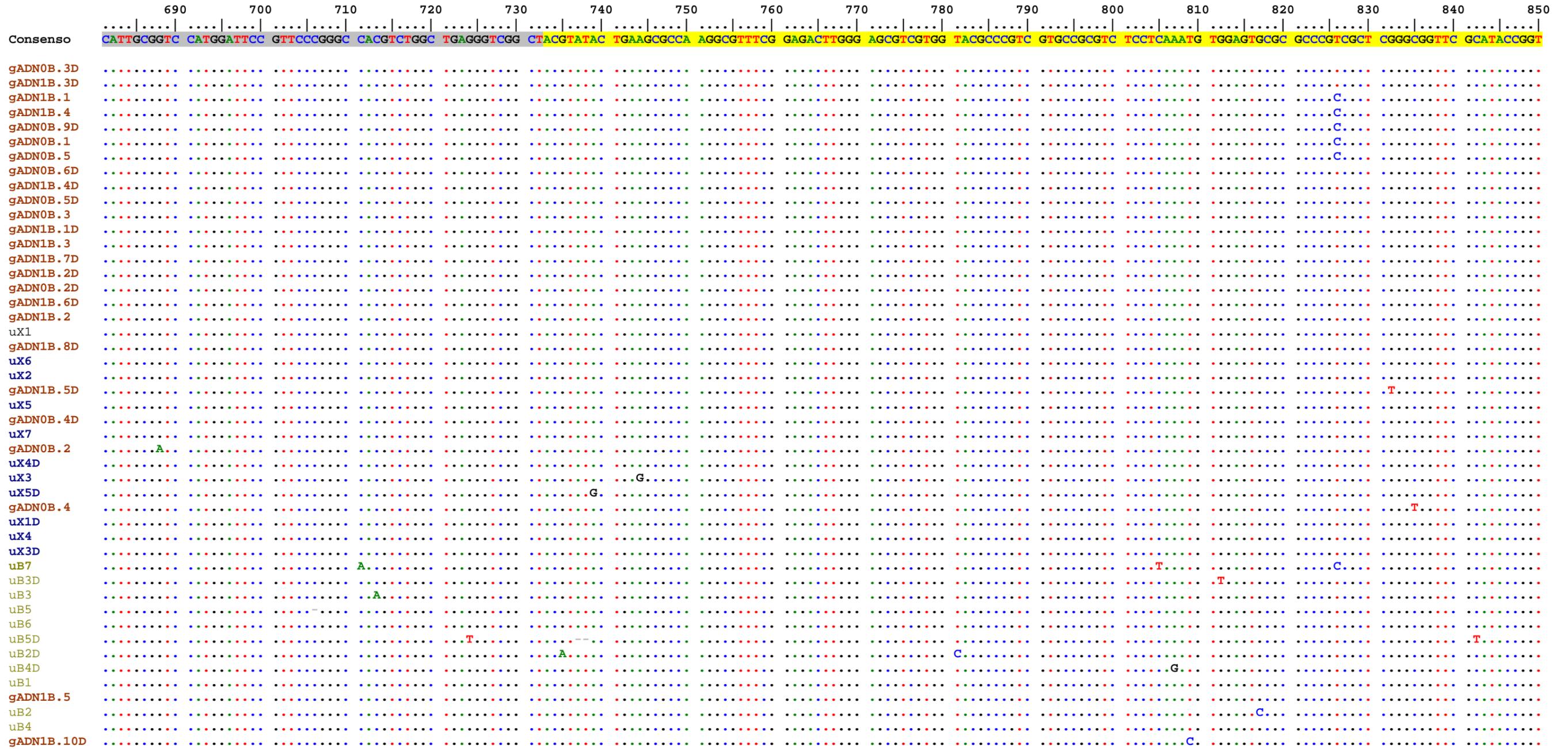


*En la secuencia consenso aparecen señaladas las diferentes regiones, los genes 18S, 5,8S y 28S en gris y el ITS-1 e ITS-2 en amarillo

Extremo 5' del gen 18S e ITS-1

	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340		
Consenso	AAGGATCATT	ACCGACTAGA	CTGCATGTCT	TTCGATGTGC	GTGTCGTGTC	GCGCATTCA	CTTCATGTAC	GGGCGGCCGG	CCGGCTTCGG	CTGGGCTGGC	TGTCCGCGCG	CCGCGTGCGG	AACCACGCGC	ACTTCTCAA	ACTAGCGGTT	GGTTGTTTG	TACGAGCGC		
gADN0B.3D										C						C	GT	G	
gADN1B.3D										C						C	GT	G	
gADN1B.1																	GT	G	
gADN1B.4										C									
gADN0B.9D																			
gADN0B.1	C							A				A							
gADN0B.5																			
gADN0B.6D								A	T		TC								
gADN1B.4D								A											
gADN0B.5D								A	T		TC								
gADN0B.3																			
gADN1B.1D																			
gADN1B.3								A											
gADN1B.7D					C														
gADN1B.2D																			
gADN0B.2D								A											
gADN1B.6D														C					
gADN1B.2								A											
uX1								A											
gADN1B.8D								A											
uX6								A											
uX2								A											
gADN1B.5D								A											
uX5								A											
gADN0B.4D								A											
uX7								A											
gADN0B.2								A											
uX4D								A											
uX3						T		A											
uX5D								A			C								
gADN0B.4							G	A											
uX1D							G	A											
uX4								A											
uX3D								A											
uB7									C							C	GT	G	
uB3D									C				T			C	GT	G	
uB3									C							C	A	GT	G
uB5									C			T				C	GT	G	
uB6									C			A				C	GT	G	
uB5D									C							C	GT	G	
uB2D									C							C	GT	G	
uB4D			G						C							C	GT	G	
uB1									C							C	GT	G	
gADN1B.5									C							C	GT	G	
uB2									C							C	GT	G	
uB4									C							C	GT	G	
gADN1B.10D									C							C	GT	G	

Gen 5,8 S e ITS-2

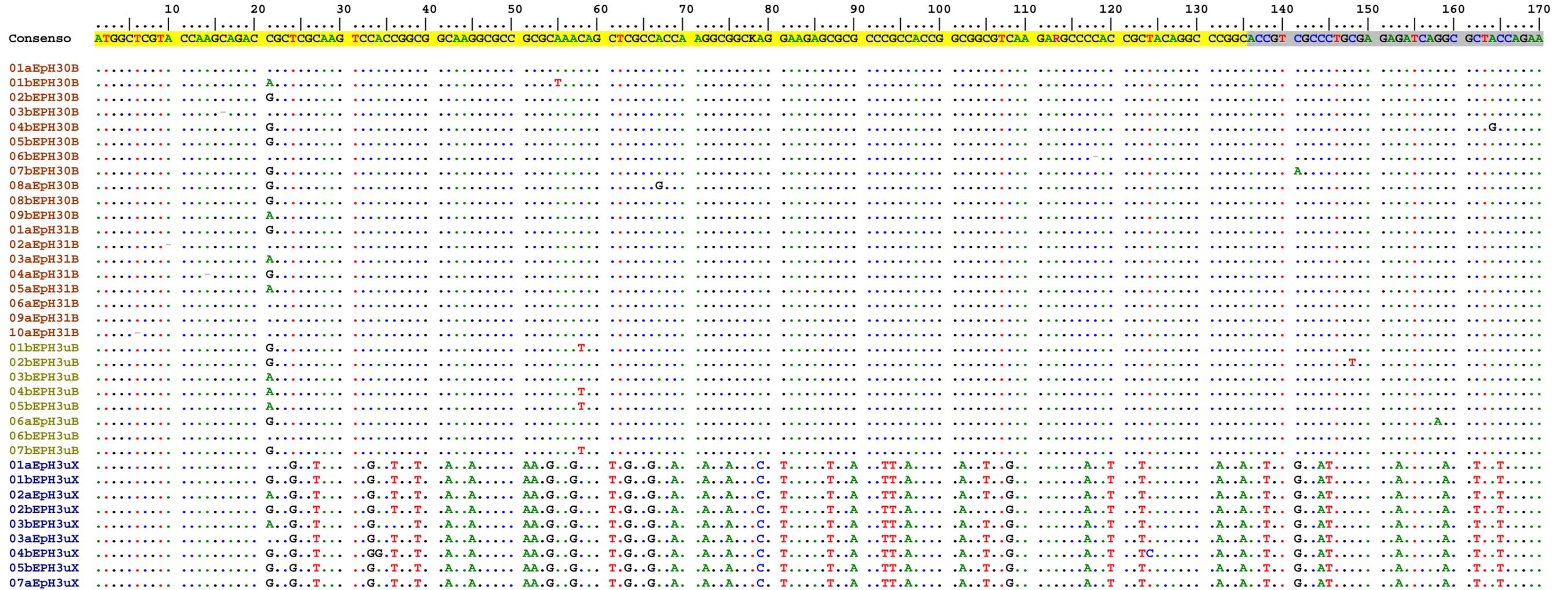


Alineamiento 3. Alineamiento de las secuencias del gen ARN 5S de *Eyrepocnemis plorans*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
Consenso	TAAACGACCAT	ACCACGCTGA	ACACACCCGGT	TCTCGTCCGA	TCACCGAAG	TTAAGCAACG	TTGGGCCCGG	TTAGTACTTA	GATGGGGGA	CCGCTT
06g1B5S
09g1B5S
01g1B5S
05g1B5SGTC
08g1B5S	T.....
03g1B5S	T.....T	T.....
09g0B5S	T.....
06g0B5S	T.....
08g0B5S	T.....
10g0B5S	T.....A
11g0B5S	.T.....	T.....TA
06B5S	T.....T
07g0B5S	T.....T
07B5S	T.....T
07g1B5ST
03B5SG.C..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
05X5SG.C..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
01X5SG.C..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
05B5SG.G..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.	A.....
09B5SG.G..C.AT.	..T.G.T.	C.....GG.	.C.....T.
04B5SG.G..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
01B5SG.G..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
02X5SG.G..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.
02B5SG.G..C.AT.	..T.G.-	C.....GG.	.C.....T.C
03X5SG..C.A	.G..T.	AGT.G.-	C.....GG.	.C.....T.
10B5SG.G..T.A	C.....GG.	CC.....T.G
07X5SG.G..T.AAG	C.....GG.	.C.....T.
08B5SG..T.AAG	C.....GGA	.C..A..T.	C.G.....
09X5SG.G..T.AG	C.....GG.	.C.....T.
08X5ST.AAGGG.T.T	C.....
06X5ST.AAAT.TCG.T.	C.....

Alineamiento 4. Alineamiento de las secuencias de la histona H3 de *Eyrepocnemis plorans*²

A. Secuencia de ADN de gen de la histona H3



² En la secuencia consenso están señalados los diferentes dominios de la histona H3 amplificados: el dominio N-terminal (amarillo) y el dominio de plegamiento (gris)

B. Secuencia de aminoácidos de la histona H3

	350	360	370
Consenso	ACGCCAAGCG	CGTCACCATT	ATGCCTAAGG ATAT
01aEph30B			C
01bEph30B		T	
02bEph30B			
03bEph30B			
04bEph30B		C	
05bEph30B			
06bEph30B			
07bEph30B			
08aEph30B		T	
08bEph30B		C	
09bEph30B		C	
01aEph31B		T	
02aEph31B			C
03aEph31B		C	
04aEph31B		C	C
05aEph31B		C	
06aEph31B		C	
09aEph31B			
10aEph31B			
01bEph3uB		T	C
02bEph3uB			
03bEph3uB		C	
04bEph3uB		C	
05bEph3uB			
06aEph3uB		T	
06bEph3uB			
07bEph3uB			
01aEph3uX	T	A	T
01bEph3uX	T	A	T
02aEph3uX	T	A	T
02bEph3uX	T	A	T
03bEph3uX	T	A	T
03aEph3uX	T	A	T
04bEph3uX	T	A	T
05bEph3uX	T	A	T
07aEph3uX	T	A	T

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
Consenso	MARTKQTARK	STGGKAPRKQ	LATKAARKSA	PATGGVKKPH	RYPGTVVALR	EIRRYQKSTE	LLIRKLPFOR	LVREIAQDFK	TDLRFQSSAV	MALQEAEEAY	LVGLFEDTNL	CAIHAKRVTI	MPKD
01aEph30B													
01bEph30B		*											
02bEph30B													
03bEph30B	X							G					
04bEph30B						C							
05bEph30B													
06bEph30B				X								X	
07bEph30B											T		
08aEph30B			A										
08bEph30B													
09bEph30B										S			
01aEph31B													
02aEph31B	X												
03aEph31B													
04aEph31B	X												
05aEph31B											Y		
06aEph31B													
09aEph31B													
10aEph31B	X												
01bEph3uB		*											
02bEph3uB					*			V	R	P			
03bEph3uB													
04bEph3uB		*									V		
05bEph3uB		*											
06aEph3uB						K							
06bEph3uB													
07bEph3uB		*			R								
01aEph3uX			S								A	I	
01bEph3uX			S						G		A	I	
02aEph3uX			S								A	I	
02bEph3uX			S								A	I	
03bEph3uX			S								A	I	
03aEph3uX			S						M		A	I	
04bEph3uX		A			S		H				A	I	
05bEph3uX					S						A	I	
07aEph3uX			S		R						A	I	

Alineamiento 5. Alineamiento de las secuencias de la histona H4 de *Eyrepocnemis plorans*³

A. Secuencia de ADN de gen de la histona H4

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170
Concenso	CGGGATAACA	TTCAGGGGAT	CACGAAGCCG	GCGATCCGCC	GCCTGGCGCG	CAGGGGTGGC	GTGAAGCGCA	TCTCTGGTCT	CATCTACGAG	GAGACgCGCG	GTGTGCTGAA	GGTGTTCCTC	GAGAACGTGA	TCCGCGACGC	CGTGACGTAC	ACTGAGCACG	CCAAGCGGAA
01EPH4er0BC.....
02EPH4er0B
03EPH4er0B
04EPH4er0B
05EPH4er0BC.....
06EPH4er0BC.....
07EPH4er0B
03EPH4er1BC.....
01EPH4er1BCN.....
02EPH4er1BC.....
04EPH4er1BC.....
05EPH4er1BC.....
06EPH4er1B
07EPH4er1B
01EP4eruBC.....
02EP4eruB
03EP4eruBC.....	.C.....	.G.....	.T.....	.C.....	GC.T.C.TG.....G.....	.C.....T.GC.....
04EP4eruB
05EP4eruBC.....
08EP4eruB
09EP4eruB
10EP4eruB
01EpH4ir0B
02EpH4ir0B
03EpH4ir0B
04EpH4ir0B
05EpH4ir0B
06EpH4ir0BC.....
07EpH4ir0B
08EpH4ir0B
09EpH4ir0B
10EpH4ir0B
01EpH4ir1BC.....	.C.....
03EpH4ir1BC.....
04EpH4ir1BC.....
05EpH4ir1BC.....
06EpH4ir1B
09EpH4ir1BC.....
08EpH4ir1B
10EpH4ir1BC.....	.C.....
01EpH4iruBC.....	.C.....	.G.....	.T.....	.C.....	GC.T.C.TG.....G.....	.C.....T.GC.....
02EpH4iruBC.....	.C.....	.T.....	.T.....	.C.....	AC.C.CA.....	.T.G.CT.TG.C
03EpH4iruB
04EpH4iruBC.....	.C.....	.T.....	.T.....	.C.....	AC.C.CA.....	.T.G.CT.TG.C
05EpH4iruBC.....	.C.....	.A.....	.A.....	.A.....	GC.T.AT.....	.A.C	.T.AAA.T.T
06EpH4iruB
07EpH4iruBC.....	.C.....	.G.....	.T.....	.C.....	GC.T.C.TG.....G.....	.C.....T.GC.....
01EpH4iruXC.....	.C.....
02EpH4iruX
03EpH4iruXC.....	.C.....
04EpH4iruXC.....	.C.....
05EpH4iruXC.....	.C.....
06EpH4iruXC.....	.C.....
07EpH4iruXC.....	.C.....	.T.....	.T.....	.T.....	.C.....	TC.TT.....	.T.....	.A.....	.C.....	.TG.....

³ Para la histona H4 sólo se ha amplificado el dominio de plegamiento de la proteína. Las secuencias de la histona H4 nombradas como H4er, corresponden a las secuencias de 211 pb, mientras que las secuencias H4ir, corresponden a las secuencias de la histona H4 de 181 pb.

B. Secuencia de aminoácidos de la histona H4

	180	190	200	210
Consenso	GACTGTCACC	GCCATGGA-C	GTGGTCTACG	CCCTCAAAAG AA
01EPH4er0B-T
02EPH4er0BG.....
03EPH4er0B-.T.G..
04EPH4er0BT.
05EPH4er0BT
06EPH4er0B-T.
07EPH4er0B-T.
03EPH4er1B-T.
01EPH4er1B-
02EPH4er1BT
04EPH4er1B-
05EPH4er1B-C.
06EPH4er1B-TG..
07EPH4er1B-T
01EP4eruBT
02EP4eruB-
03EP4eruB	..A.....T-
04EP4eruB-T.G..
05EP4eruB-G..
08EP4eruB-
09EP4eruB-T.G..
10EP4eruB-CA..
01EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
02EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
03EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
04EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
05EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
06EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
07EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
08EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
09EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
10EpH4ir0B	..C.....	-----	-----	-----
01EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
03EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
04EpH4ir1B	..C.....A	-----	-----	-----
05EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
06EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
09EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
08EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
10EpH4ir1B	..C.....	-----	-----	-----
01EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
02EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
03EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
04EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
05EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
06EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
07EpH4iruB	..C.....	-----	-----	-----
01EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
02EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
03EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
04EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
05EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
06EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----
07EpH4iruX	..C.....	-----	-----	-----

	10	20	30	40	50	60	70
Consenso	RDNIQGITKP	AIRRLARRGG	VKRISGLIYE	ETRGVLKVFL	ENVIRDAVTY	TEHAKRKTVT	AMDVVYALKR
01EPH4er0B
02EPH4er0BV.....
03EPH4er0B
04EPH4er0BRGLRPQK
05EPH4er0B
06EPH4er0B
07EPH4er0B
01EPH4er1B	..X.....
02EPH4er1B
03EPH4er1B
04EPH4er1B
05EPH4er1B
06EPH4er1B
07EPH4er1B
01EP4eruBE.....
02EP4eruB
03EP4eruB
04EP4eruB
05EP4eruB
08EP4eruBN.....
09EP4eruBD.....
10EP4eruBQ
01EpH4ir0BS.....	-----
02EpH4ir0B	-----
03EpH4ir0B	-----
04EpH4ir0BS.....	-----
05EpH4ir0BS.....	-----
06EpH4ir0B	-----
07EpH4ir0BS.....	-----
08EpH4ir0B	-----
09EpH4ir0BS.....	-----
10EpH4ir0B	-----
01EpH4ir1BS.....	-----
03EpH4ir1B	-----
04EpH4ir1BS.....	-----
05EpH4ir1BS.....	-----
06EpH4ir1BS.....	-----
09EpH4ir1BS.....	-----
08EpH4ir1BS.....	-----
10EpH4ir1BS.....	-----
01EpH4iruBS.....S	-----
02EpH4iruBA.....S.....	-----
03EpH4iruBR.....S.....	-----
04EpH4iruBA.....S.....	-----
05EpH4iruBS.....	-----
06EpH4iruBS.....	-----
07EpH4iruBS.....	-----
01EpH4iruXD.....L.....S.....S.....RPS-	-----
02EpH4iruXD.....L.....S.....S.....RARPS-	-----
03EpH4iruXD.....NSSS	RA-FATRSRI	QSTPSGRPS-	-----
05EpH4iruXD.....L.....S.....S.....ARPS-	-----
04EpH4iruXD.....L.....S.....S.....S.....	-----
06EpH4iruXD.....L.....S.....S.....ARPS-	-----
07EpH4iruXD.....L.....S.....S.....S.....	-----