



VII
SEMINARIO DE
CITOGENÉTICA
VIGO - 2012




PARADORES
Parador de Pontevedra

27 al 30 de junio de 2012

UniversidadeVigo





UniversidadeVigo



Comité Organizador

Juan José Pasantes Ludeña

Paloma Morán Martínez

Concepción Pérez García

Lara Covelo Soto

Daniel García Souto

Nieves Santamaría Gómez

Pilar Alvariño Sanjurjo

Miércoles, 27 de junio

17.00 Inscripción y entrega de documentación

20.00 Recepción en el Parador

Jueves, 28 de junio, mañana

09.30 Conferencia inaugural

W Schempp

Y chromosomal evolution in primates: Inter- and intra-species Y chromosome variation in human and great apes

10.30 Primera Sesión, coordina L Rebordinos

10.30 M Cano-Linares, I Romero-Fernández, JM Marchal, A Sánchez

Análisis de la transcripción de las secuencias repetidas en especies de Arvicólidos

11.00 AS Roco, L Zimmerman, T Amano, M Bullejos

The three faces of *Xenopus tropicalis* sex chromosomes

11.30 Café

12.00 K Guzmán, AS Roco, M Stöck, E García, M Bullejos

Cytogenetic and molecular analysis of a satellite DNA family, BamHI-800, in several species of the family Bufonidae

12.30 A García, S Portela, R Iziga, A Merlo, I Cross, M Manchado, L Rebordinos

Construyendo el primer mapa físico del lenguado (*Solea senegalensis*) mediante FISH-BAC y secuenciación NGS

13.00 L Covelo, C Pérez-García, JJ Pasantes, P Morán

Inmuno-localización de 5-mC en la lamprea *Petromyzon marinus*

13.30 RI Figueroa, A Stüken, S Fraga, A Cuadrado A

Breaking paradigms on Dinoflagellate chromosome organization and structure

14.00 **Almuerzo**

Jueves, 28 de junio, tarde

16.00 Segunda Sesión, coordina A Cabrera

16.00 A Cuadrado, A Carmona, N Jouve

SSRs, Cromosomas y taxonomía de *Hordeum murinum* con citotipos di-, tetra- y hexaploides

16.30 Z Hejdukova, R Núñez, V Heredia, M Díez, MJ Puertas, M González-Sánchez

Modificaciones epigenéticas de la histona H3 durante la formación de los granos de polen en plantas de centeno con cromosomas B

17.00 D Gómez-Revilla, M González-García, M Cuacos, A Gonzalo, M Díez, MJ Puertas, JM Vega

Análisis estructural del centrómero del cromosoma B de centeno, *Secale cereale* L.

17.30 Café

18.00 MC Calderón, A Cabrera, P Prieto

Importancia de las regiones subteloméricas en el apareamiento cromosómico en *Hordeum chilense*

18.30 R Moreno Pinel, A Cabrera Caballero

Utilización de la citometría de flujo para la evaluación de introgresiones de *Agropyron cristatum* en trigo duro

19.00 PJ Sola-Campoy, R Navajas-Pérez, R de la Herrán, C Ruiz-Rejón, T Schwarzacher

Caracterización citogenética-molecular de la familia de ADN satélite PIVE180 en *Pistacia vera*

21.00 Cena

VII Seminario de Citogenética

Viernes, 29 de junio, mañana

09.00 Tercera Sesión, coordina J Cabrero

09.00 D García-Souto, C Pérez-García, P Morán, JJ Pasantes

Caracterización cromosómica de dos especies de venéridos: *Chamelea (Venus) striatula* y *Clausinella fasciata*

09.30 A Insua, R Freire, A Arias-Pérez, J Méndez, J Fernández-Tajes

Cromosomas y manipulación del nivel de ploidía de almejas de la familia Veneridae

10.30 P Lorite, O Sanllorente, MI Torres, G Periquet, T Palomeque

Nuevo elemento mariner en el genoma de las hormigas: estudio y caracterización del elemento Azteca

11.00 J Cabrero, M Bakkali, B Navarro-Domínguez, R Martín-Blázquez, F Ruiz-Ruano, R Palomino, JPM Camacho

Localización centromérica de la proteína de reparación del ADN, Ku70, durante la meiosis y la mitosis del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*

11.30 Café

12.00 Conferencia de clausura

MJ Puertas

Tras los neocentrómeros meióticos se atisba la evolución de los cromosomas eucarióticos

13.00 Reunión de la Sección de Citogenética de la SEG

14.00 Almuerzo

Viernes, 29 de junio, tarde

16.00 Actividades complementarias

16:00 Desplazamiento en autobús a O Grove

17:00 Paseo en barco por la Ría de Arousa hasta Cambados

19:30 Desplazamiento a Pazo Baión y visita a viñedos y bodega

20:30 Cóctel-aperitivo en Pazo Baión

22:00 Regreso en autobús a Pontevedra

Y chromosome evolution in primates: Inter- and intra-species Y chromosome variation in human and great apes

W. Schempp

Institute of Human Genetics, University Clinic Freiburg, Freiburg

In 1969, Susumu Ohno proposed that the mammalian X and Y chromosomes evolved from an ordinary pair of autosomes, existing in the mammalian ancestor about 300 million years ago. Indeed, this view of sex chromosome evolution is supported by several characteristics of the X and Y chromosomes of the eutherian mammals. The X chromosome is supposed to suffer little changes, whereas the Y chromosome is characterized by a continuous loss of active genes. This is thought to be the consequence of the lack of recombination of the male-specific part of the Y chromosome (MSY). On the other hand, there are homologous regions, the so-called pseudoautosomal regions (PAR) at distal ends of the sex chromosomes of the eutherian mammals. They represent specific regions sharing sufficient homology to enable chromosome alignment, recombination and thus proper segregation of the X and Y chromosomes during male meiosis.

Recent studies support the notion that the mammalian sex chromosome evolution is more complex than previously thought, showing a highly dynamic evolutionary history. This is particularly true for the primate Y chromosomes. Moreover, our own comparative molecular cytogenetic studies over the last years support the view that the evolutionary history of a primate species Y chromosome is not simply encrypted in its DNA sequence, but is also shaped by the social and the behavioral circumstances under which the specific species has evolved.

Análisis de la transcripción de las secuencias repetidas en especies de Arvicolídos

M Cano-Linares, I Romero-Fernández, JA Marchal, A Sánchez

Dpto Biología Experimental, Fac CC Experimentales, Universidad de Jaén

Las secuencias repetidas de DNA representan un porcentaje importante de los genomas eucariotas y han sido considerados como DNA parasitario y egoísta sin papel funcional. Trabajos recientes han demostrado que estas secuencias se transcriben activamente en las células eucariotas y parecen tener implicación funcional en varios aspectos importantes de la biología celular.

Las especies de roedores de la subfamilia Arvicolinae se caracterizan por la presencia de gran cantidad de heterocromatina constitutiva, ya sea pericentromérica y/o de los bloques heterocromáticos de los cromosomas sexuales. En éstas se han descrito en la secuencias de DNAs satélites, DNAs repetidos no satélites y retrotransposones, sin embargo no se han estudiado las posibles implicaciones funcionales de las mismas.

Los análisis de la transcripción en líneas celulares de fibroblastos y diferentes tejidos de varias especies de Arvicolídos demuestran que algunas secuencias de DNA repetitivo se transcriben. Así, diferentes elementos genéticos móviles, tipo L1 y no L1 (pMAHae-2, pMA-11/3) se transcriben en todos los tejidos y líneas celulares analizadas. Por su parte el ADN satélite centromérico Msat-160 se transcribe sólo en testículo, ovario y bazo, pero permanece silenciado en las líneas celulares de la mayoría de especies, con excepción de *M. cabreræ*. El ADN repetitivo no satélite McaY(851), acumulado en la heterocromatina del cromosoma Y, se transcribe en testículo y riñón de macho adulto y también en cultivos celulares de macho *M. cabreræ*.

Así, la transcripción de secuencias repetidas parece ser un hecho común en estas especies. Para tratar de profundizar en el significado funcional estamos caracterizando los transcritos y estudiando la posible relación de esta transcripción con la progresión del ciclo celular, con especial interés en la división mitótica. También discutiremos los datos que obtengamos de los ensayos funcionales de sobreexpresión y silenciamiento transcripcional que estamos llevando a cabo para alguna de estas secuencias repetidas.

The three faces of *Xenopus tropicalis* sex chromosomes

AS Roco¹, Zimmerman², T Amano², M Bullejos¹

(1) Área de Genética, Fac. CC Experimentales, Universidad de Jaén

(2) National Institute for Medical Research, London

Xenopus tropicalis has quickly become the amphibian model of choice due to its advantages over *X. laevis*. Despite of the recent interest on *X. tropicalis*, not much is known about its sex chromosome system or the sex determining gene. As in 95% of amphibian species, *X. tropicalis* has homomorphic sex chromosomes not differentiable by traditional cytogenetic techniques. As a further approach to unveil differences between sex chromosomes we have tried GISH and CGH on *X. tropicalis* chromosomes. Using these techniques no sex-linked differences were observed between male and female karyotypes, although interesting results were obtained about the distribution of repetitive sequences.

It has been supposed that *X. tropicalis* has a ZZ/ZW sex chromosome system, as is the case in *X. laevis*, but there are no evidences that support this hypothesis. To identify the sex chromosome system of this species three experimental approaches were set up: 1) sex ratio in gynogenetic spawns; 2) sex ratio in the offspring of sex reversed individuals and 3) the sex ratios in triploid and diploid spawns.

Both sexes were found among the gynogenetic offspring of hybrid females (N/IC), indicating that the mothers used in these experiments are not XX, but ZW. These results were confirmed by breeding sex reversed males. In this case only males were obtained among the offspring of these crosses, indicating that sex reversed males were ZZ (not XY) females. These results point to a ZZ/ZW sex chromosome system with female heterogamety.

To reveal possible dosage effects on the sex determining gene of this species, triploid individuals and diploid controls were obtained. The sex ratios obtained point to the existence of male heterogamety and XX/XY sex chromosome systems in some laboratory strains. Further identification of the sex pair in *X. tropicalis* will be done by FISH using probes close to sex-linked markers.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación through the Project CGL2009-08894 (co-funded by the European Regional Development Fund), and by the Junta de Andalucía, Spain, through the programme “Ayudas a Grupos de Investigación”, Group BIO 220.

Cytogenetic and molecular analysis of a satellite DNA family, BamHI-800, in several species of the family Bufonidae

K Guzmán¹, AS Roco¹, M Stöck², E García³, M Bullejos¹

(1) Área de Genética, Universidad de Jaén, (2) University of Lausanne
(3) CIBRG, Vairão

Satellite DNA constitutes a high proportion of eukaryotic DNA. These sequences have been widely described in mammals, but only a few molecular studies have been realized in amphibian species. We have characterized a new family of satellite DNA present in the species *Bufo bufo*. In this communication we extend our analysis to other species of the family Bufonidae (*B. calamita*, *B. luristanicus*, *B. surdus*, *B. arabicus*, *B. latastii*, *B. melanostictus*, *Pseudoepidalia boulengeri* and *P. brongersmai*) obtained from several locations in Europe, Asia and North Africa.

Southern blot analysis reveals that this satellite DNA is formed by monomers of about 800 bp. They are organized in tandem and are A-T rich. The comparison of the sequences obtained in these species reveals identity percentages that range between 98 and 52%. Methylation analysis indicates that sequences GATC present in this repetitive DNA are not methylated.

BamHI-800 satellite DNA is not dispersed in the karyotype, but highly accumulated in the smallest chromosomal pair of *B. bufo* karyotype. It is also highly accumulated close to the centromere in two of the largest chromosomal pairs of *B. calamita*. In *B. bufo* these sequences are also present in lower amount in the secondary constriction of the NOR and in pericentromeric regions of most long chromosomal pairs of the karyotype.

Phylogenetic analysis show all sequences from the same species grouped in the same branch and suggest they may have evolved by concerted evolution. The information obtained from these and other repetitive sequences can help to unveil the phylogenetic relations of the species of the family Bufonidae and to decide if they should be included in the genus *Bufo*, *Epidaea*, *Pseudopidalea* or *Duttaphrynus*.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación through the Project CGL2009-08894 (co-funded by the European Regional Development Fund), and by the Junta de Andalucía, Spain, through the programme “Ayudas a Grupos de Investigación”, Group BIO 220.

**Construyendo el primer mapa físico del lenguado
(*Solea senegalensis*) mediante FISH-BAC y secuenciación NGS**

AGarcía¹, S Portela¹, R Iziga^{1,2}, A Merlo¹, I Cross¹,
M Manchado², L Rebordinos¹

1 Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales,
Universidad de Cádiz

La hibridación in situ de fluorescencia (FISH) permite la localización de genes y la elaboración de mapas cromosómicos que evidencian la organización de genoma y además son útiles en mejora genética (GAS). Existen distintos tipos de mapas genéticos, por lo que es necesario relacionar unos con otros para disponer de la información completa que permita conocer la composición de la cromatina y distribución de los genes en los cromosomas. En ese sentido, una herramienta muy útil son las genotecas en cromosomas artificiales bacterianos (BACs), que permiten albergar todo el genoma de una especie en un número relativamente bajo de clones que a su vez se pueden utilizar como sondas FISH. La secuenciación del inserto del BAC localizado permite relacionar la secuencia de nucleótidos con su localización cromosómica. En este sentido, las técnicas de secuenciación de segunda generación (NGS) permiten secuenciar megabases de ADN en poco tiempo y a precios muy competitivos.

En nuestro caso disponemos de una genoteca BAC para el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), que está siendo rastreada para localizar clones BAC que contienen genes de interés para la optimización de la acuicultura de la especie. El lenguado senegalés es una de las especies más valoradas económicamente en acuicultura, aunque existen problemas durante su cultivo, asociados con la reproducción, la elevada susceptibilidad a enfermedades y las altas tasas de mortalidad durante su metamorfosis que dificultan su producción. La caracterización genética de esta especie permitiría resolver algunas de estas cuestiones y así mejorar su cultivo.

Los clones BAC estudiados contienen genes implicados en la metamorfosis de la especie, en el sistema inmune innato, en la reproducción y familias multigénicas, localizados mediante FISH única y doble suponen una primera aproximación a la elaboración de un mapa cromosómico de la especie.

Inmunolocalización de 5-metilcitosina en la lamprea *Petromyzon marinus*

Covelo L, Pérez-García C, Pasantes JJ, Morán P

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología. Universidad de Vigo

Las lampreas (orden Petromyzontiformes) representan un grupo crucial en la comprensión de las primeras fases de la evolución de los vertebrados, ya que, junto a los mixines (orden Myxiniiformes) componen el grupo más antiguo de los vertebrados vivos. Recientemente, se ha descrito que la lamprea de mar, *Petromyzon marinus*, sufre al igual que otros agnatos, una reorganización programada a gran escala de su genoma durante su desarrollo. De hecho, más de 500 Mb de ADN son eliminadas de la línea somática durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, apenas existen conocimientos sobre la organización del genoma en esta especie. En el presente trabajo, se ha analizado la localización de la 5-metilcitosina en profases meióticas y metafases mitóticas para determinar si existe variación en la distribución de este marcador epigenético entre la línea germinal y la somática de *Petromyzon marinus*.

Con el fin de determinar si existen diferencias respecto a la compartimentación del genoma en regiones ricas en AT y CG se tiñeron metafases mitóticas y meióticas con DAPI/PI. Asimismo, se visualizó la distribución de la 5-metilcitosina, tanto en cromosomas mitóticos como meióticos, utilizando un anticuerpo comercial específico.

Se apreciaron señales intensas en uno de los extremos de todos los cromosomas meióticos, así como diversas señales intercalares en algunos cromosomas. En todos los casos estas señales se localizaron en regiones DAPI negativas. En contraste, al menos 20 cromosomas mitóticos no presentaron ninguna señal positiva para la 5-metilcitosina. El resto de cromosomas mitóticos presentó una señal en el extremo DAPI negativo al igual que en meióticos pero en este caso de menor intensidad.

Breaking paradigms on Dinoflagellate chromosome organization and structure

Figuerola RI, Stüken A, Fraga S, Cuadrado A

Aquatic Ecology, Biology Department, Ecology Building, Lund University

Dinoflagellates are unicellular eukaryotic algae best known by their capacity to reach very high cell densities in coastal areas causing so-called “red tides”. These red tides may cause severe anoxia and thus have severe negative effects on the ecosystem. But these tides can also result in serious human health consequences, as many dinoflagellate species produce several types of potent toxins that may accumulate in the food chain.

Numerous studies have focused on the ecological factors triggering red tides, but very little is known about the cytological mechanisms involved. Information on dinoflagellate chromosome structure and organization during the cell cycle is scarce. For example, patterns of segregation during meiosis are unknown. The main reason for this lack of knowledge is probably the difficulty in studying dinoflagellate genomes: they contain huge amounts of DNA per cell, which can be up to 70 times higher than in human cells. In order to clarify chromosome structure and look for markers to study segregation, we have studied chromosome morphology during the cell cycle and patterns of ribosomal gene organization in important toxic species within the genus *Alexandrium*, focusing in *Alexandrium minutum* and the *Alexandrium fundyense-catenella* complex. Flow cytometry measurements indicate that these species contain 29 and 70 pg of DNA per cell respectively, a fact easily observed at the chromosome level. It had previously been suggested that in dinoflagellates chromosomes are both permanently condensed through the cell cycle and morphologically identical. In contrast, our studies revealed that dinoflagellate chromosomes show different levels of condensation during the cellular cycle. At the maximum condensation level (metaphases) different chromosome morphologies are visible. Additionally, we first show that dinoflagellate chromosomes have a two chromatids organization in anaphase, without centromeric structures being visible. Also, we found inter-species differences: Whereas *A. minutum* shows ribosomal genes clustered on non-differentiated chromosomes, *A. fundyense* appears to have specialized chromosomes on which the genes are located. This difference opens up an interesting line to study evolutionary traits within this important genus, believed to have evolved through polyploidy but in which we have reported different sexual systems and meiotic triggers.

SSRs, Cromosomas y Taxonomía de *Hordeum murinum* con citotipos di-, tetra- y hexaploides

A Cuadrado, A Carmona, N Jouve

Dpto de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá

Hordeum murinum L, (cebadilla, espigadilla, cebada bastarda, cebada de liebre, cebada de ratones o cola de zorro, entre otros), es una hierba de la familia gramínea muy común en los países Mediterráneos, emparentada con la cebada cultivada (*Hordeum vulgare*). Conocer la estructura génica y genómica de esta especie silvestre es fundamental para poder utilizarla en la mejora de la cebada cultivada y especies afines. Taxonómicamente se diferencian tres subespecies: subsp. *glaucum* (Steud.) Tzvel ($2n=2x=14$), subsp. *murinum* ($2n=4x=28$), y subsp. *leporinum* (Link) Arc. ($4x$ and $6x$; $2n=6x=42$), morfológicamente muy similares y que algunos autores sin distinción incluyen en el “complejo *murinum*”.

En este trabajo demostramos que la utilización de distintas secuencias repetidas, especialmente SSRs (Secuencias Simples Repetidas), como marcadores cromosómicos, permite caracterizar individualmente los cromosomas que integran los genomios presentes en las formas di- tetra- y hexaploides y determinar así que la poliploidía surgida en el complejo *murinum* tuvo su origen por alopoliploidía. Formas diploides de la subsp. *glaucum* habrían sido uno de los progenitores de las formas tetraploides. Los genomios presentes en las formas tetraploides, con independencia de la clasificación taxonómica a nivel de subespecie, están representados en las formas hexaploides de la subsp. *leporinum*. Además describimos por primera vez la presencia de citotipos tetraploides en la subsp. *glaucum* y mostramos que no existen diferencias a nivel cromosómico entre las formas tetraploides de las tres subespecies. Las formas tetraploides y hexaploides, poseerían uno o dos genomios, respectivamente, muy distintos a los que actualmente portan las especies diploides del género *Hordeum*, y que por lo tanto se trataría de genomios presentes en especies donadoras diploides ya extintas.

Este trabajo está financiado con la ayuda AGL 2009-10373 del MEC.

Modificaciones epigenéticas de la histona H3 durante la formación de los granos de polen en plantas de centeno con cromosomas B

Z Hejdukova, R Núñez, V Heredia, M Díez, MJ Puertas,
M González-Sánchez

Dpto. de Genética, Fac de Biología, Universidad Complutense de Madrid

La metilación de la histona H3 es una modificación epigenética relacionada con la expresión. En centeno, la trimetilación en la lisina 27 (H3K27me3) se asocia con la regulación negativa de la transcripción, pues promueve la compactación del DNA. Por el contrario, la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3) se relaciona con euromatina y, por tanto, con regiones activas para la transcripción.

Mediante inmunolocalización hemos estudiado la trimetilación de las lisinas 4 y 27 de la histona H3 y los efectos de la presencia de cromosomas B sobre los patrones de metilación durante la mitosis de polen en centeno. También hemos llevado a cabo una inmunodetección del la subunidad β - tubulina.

En plantas con Bs, tras la primera mitosis, las señales H3K4me3 y de tubulina se distribuyen desigualmente. El núcleo vegetativo carece de tubulina y tiene restos difusos de H3K4me3, mientras que el generativo muestra señal clara de H3K4me3. Tras la segunda mitosis, los núcleos espermáticos tienen señal de H3K4me3. Los Bs no muestran tubulina ni H3K4me3 cuando están perdidos como micronúcleos.

Por el contrario, la inmunolocalización de H3K27me3 tras la primera mitosis en plantas con Bs, marca únicamente el núcleo vegetativo, y lo hace con una distribución uniforme. En consecuencia ni los cromosomas de la anafase de la segunda mitosis de polen, ni los núcleos espermáticos presentan señal de H3K27me3.

Lo más interesante de nuestro trabajo es la capacidad que tienen los cromosomas B para cambiar el patrón de metilación de la histona H3 en K4 y K27 durante el desarrollo del polen. Los cambios observados tienen lugar después de la primera mitosis y son complementarios: en el núcleo generativo aparece más señal de H3K4me3 (activación transcripcional) y desaparece la H3K27me3 (represión transcripcional). Por su parte, el núcleo vegetativo presenta un marcaje menos intenso de H3K4me3 pero H3K27me3 aparece con mayor intensidad.

Análisis estructural del centrómero del cromosoma B de centeno, *Secale cereale* L.

D Gómez-Revilla, M González-García, M Cuacos,
A Gonzalo, M Diéz, MJ Puertas, JM Vega

Dpto de Genética, Fac de Biología, Universidad Complutense de Madrid

La función centromérica y la estructura del cinetocoro se conservan en la evolución, mientras que las secuencias de ADN presentes en el centrómero evolucionan tan rápidamente que no se conservan entre especies diferentes y pueden diferir incluso entre cromosomas de la misma especie. El objetivo de este trabajo es el análisis de la organización en meiosis del centrómero del cromosoma B de centeno mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con secuencias centroméricas.

El retrotransposón Bilby es el principal responsable de la actividad centromérica en los cromosomas A ya que su señal de FISH se encuentra más estirada y cercana a los polos en metafase I que las señales del retrotransposón CRW. En cambio, en el centrómero del B las señales de ambos retrotransposones se superponen, son más difusas, ocupando un área más grande, y no aparecen tan estiradas a los polos como en los As. Estos resultados indican una distinta organización de las secuencias centroméricas en ambos tipos de cromosomas, y sugieren que secuencias específicas del B podrían ser responsables de su actividad centromérica.

FISH en paquítina permitió observar las secuencias centroméricas con más detalle. La señal de Bilby en el centromero del B es significativamente mayor que las observadas en los As. Cuando Bilby se combina con CL11, una secuencia específica del B aislada por A. Houben, ambas secuencias muestran señales fuertes de hibridación en el centrómero del B. Sorprendentemente también aparecen señales de hibridación más débiles de ambas secuencias fuera del centrómero, ocupando casi toda la longitud del brazo corto, y la mitad proximal del brazo largo del B. La presencia de secuencias centroméricas fuera del centrómero ha sido únicamente descrita en el caso del B de maíz, lo que sugiere que este fenómeno podría estar implicado en el mecanismo de no-disyunción de los Bs en estas especies.

Importancia de las regiones subtelo méricas en el apareamiento cromosómico en *Hordeum chilense*

MC Calderón¹, A Cabrera², P Prieto¹

(1) Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Córdoba

(2) Departamento de Genética ETSIAM, Universidad de Córdoba

Durante la meiosis se producen procesos claves como el reconocimiento y apareamiento entre cromosomas homólogos, y la posterior sinapsis y recombinación cromosómica entre ambos, siendo el reconocimiento entre cromosomas uno de los procesos más desconocidos de la meiosis. El inicio del apareamiento cromosómico y la posterior formación del complejo sinaptonémico se inicia en las partes más distales del cromosoma, los telómeros, que forman una estructura compacta conocida como “bouquet”. Este apareamiento continúa a lo largo del cromosoma hacia las regiones centrales como si se tratara de un cierre en cremallera.

La principal función de los telómeros, cuya secuencia está evolutivamente muy conservada, es la de estabilizar las regiones terminales de los cromosomas. A diferencia de las repeticiones teloméricas, las secuencias asociadas a los telómeros (TAS) o regiones subtelo méricas tienen una organización compleja, son variables entre eucariotas y se localizan adyacentes a las repeticiones teloméricas, siendo desconocida su función exacta. En este trabajo se pretende profundizar en la importancia de las regiones subtelo méricas en el reconocimiento y apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis en cereales. Se han utilizado líneas de adición y sustitución del cromosoma 3Hch de *Hordeum chilense* que portan deleciones en las regiones terminales, en el fondo genético del trigo harinero *Triticum aestivum*. Se ha analizado el apareamiento cromosómico de estos cromosomas delecionados de *Hordeum* mediante hibridación in situ con sondas de ADN que permitan la visualización de estos cromosomas en el fondo genético del trigo, así como de las regiones de interés teloméricas y subtelo méricas. Los resultados obtenidos son pioneros y muestran por primera vez que los telómeros son necesarios pero no suficientes para que el apareamiento entre cromosomas homólogos tenga lugar de forma correcta. Son los subtelo méricos las regiones necesarias y cruciales para que los cromosomas homólogos se asocien correctamente durante la meiosis en trigo.

Utilización de la citometría de flujo para la evaluación de introgresiones de *Agropyron cristatum* en trigo duro

R Moreno Pinel, A Cabrera Caballero

Departamento de Genética, ETSIAM, Universidad de Córdoba

Septoria tritici es un hongo patógeno causante de una de las principales enfermedades que afectan al cultivo del trigo duro en Andalucía, para la que no se han encontrado genes de resistencia dentro de la especie. *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn ($2n=4x=28$, PPPP) es una especie cultivada como forrajera y resistente a esta enfermedad pero los cruzamientos realizados con trigo duro no han tenido éxito. $xAgroticum$ ($2n=4x=28$, DDPP) es un anfiploide fértil procedente del cruzamiento entre *A. cristatum* y *Aegilops tauschii* (Coss.) ($2n=2x=14$, DD). El cruzamiento entre $xAgroticum$ y el trigo duro si ha sido posible pero la ausencia de recombinación intergenómica sugiere que la introgresión de los genes de interés debe realizarse mediante la obtención de líneas de traslocación. En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de emplear la citometría de flujo para acelerar la selección de genotipos de trigo que contengan introgresiones de *A.cristatum*. Para ello se ha seleccionado un grupo de plantas obtenidas de varios retrocruzamientos de $xAgroticum$ con trigo duro que contienen números variables de cromosomas pertenecientes a los genomas P y D. En esta población de plantas se han comparado los valores obtenidos por citometría con la constitución cromosómica de cada planta determinada mediante FISH. Con la información procedente de la citometría y la ayuda de marcadores moleculares específicos de los genomas D y P, se ha desarrollado una herramienta que permite seleccionar de forma más rápida plantas de trigo duro que incorporen solo introgresiones del genoma P, reservándose la técnica FISH, más laboriosa, para confirmar la constitución cromosómica de las plantas de interés.

**Caracterización citogenética-molecular de la familia de ADN satélite
PIVE180 en *Pistacia vera***

PJ Sola-Campoy, R Navajas-Pérez, R de la Herrán,
C Ruiz-Rejón, T Schwarzacher

Campus Fuentenueva SN, 18071, Granada

El pistacho (*Pistacia vera*) es una planta dioica cuya semilla tiene una gran importancia económica a nivel mundial, principalmente consumida como fruto seco, siendo un cultivo en expansión. Sin embargo, hasta la actualidad, son escasos los análisis genéticos llevados a cabo en esta especie. En este sentido, parte de nuestros estudios se han centrado en el desarrollo de marcadores moleculares que nos permitan identificar y, en última instancia, mejorar su cultivo. Así, hemos caracterizado un ADN repetido de su genoma, la familia de ADN satélite PIVE180. Esta familia presenta una repetición monomérica de unos 180pb, en la cual, podemos encontrar motivos palindrómicos, microsátelites y motivos teloméricos degenerados del tipo (TT)nAN(GG)n que indican su posible posición en los extremos cromosómicos. En cuanto a los estudios cromosómicos, su cariotipo ha sido establecido en $2n=30$. En este trabajo, hemos modificado el protocolo para la obtención de cromosomas metafásicos en pistacho y llevado a cabo, por un lado, tinción con DAPI, para poner de manifiesto la presencia de regiones heterocromáticas y, por otro, hibridación in situ (FISH) utilizando como sonda la unidad de repetición de PIVE180. Esta hibridación ha demostrado la presencia de este ADN satélite en la mayoría de los cromosomas en posiciones teloméricas o subteloméricas. Se han detectado señales de hibridación en 22 de los 30 cromosomas que forman el complemento. El estudio comparado con tinción DAPI, ha mostrado que este ADN satélite está totalmente ausente en el par más heterocromático y en los tres pares más pequeños. Esta pareja heterocromática es importante ya que ha sido propuesta como una pareja de cromosomas sexuales. Estos cromosomas suelen tener sus propios procesos de evolución y degeneración, explicando la gran cantidad de heterocromatina presente, su gran tamaño y una posible explicación para el hecho de que no esté presente el ADN satélite PIVE180.

Caracterización cromosómica de dos especies de venéridos: *Chamelea (Venus) striatula* y *Clausinella fasciata*

D García-Souto, C Pérez-García, P Morán, JJ Pasantes

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología, Universidad de Vigo.

La familia Veneridae comprende un amplio y heterogéneo grupo de especies de almejas cuya historia evolutiva es todavía bastante incierta. Un estudio cariotípico sistemático contribuiría a una mejor comprensión de las verdaderas relaciones filogenéticas entre sus especies integrantes. Puesto que los relativamente escasos estudios cromosómicos en estas familia se han centrado principalmente en las que tienen mayor importancia comercial, en este trabajo hemos establecido los cariotipos y analizado la distribución cromosómica de los genes ribosómicos y de las histonas en dos nuevas especies de venéridos: *Chamelea striatula* y *Clausinella fasciata*.

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de tejidos gonadal y branquial. La presencia de regiones ricas y pobres en CG se analizó mediante tinción con fluorocromos. La localización de las secuencias codificadoras de los ARNr y de las histonas se realizó mediante FISH empleando como sondas un fragmento del rDNA 28S, la unidad completa del rDNA 5S y el gen de la histona H3 generadas mediante PCR y marcadas por PCR o *nick traslation*. La localización de secuencias teloméricas se realizó utilizando sondas PNA teloméricas de vertebrados.

Al igual que otros venéridos, ambas especies muestran $2n = 38$ cromosomas. Por el contrario, tanto en sus cariotipos como en el número y la distribución de las agrupaciones génicas estudiadas presenta notables diferencias. Aunque tanto *C. striatula* como *C. fasciata* presentan una única agrupación de rDNA 45S, su posición difiere. Los números de agrupaciones 5S rDNA, dos y una, y de genes de histonas, tres y dos, así como su distribución, son también diferentes en estas especies.

Daniel García Souto es beneficiario de una ayuda del programa “Bolsas de Máster do Campus do Mar” para el curso 2011-2012.

**Cromosomas y manipulación del nivel de ploidía de almejas
de la familia Veneridae**

A Insua, R Freire, A Arias-Pérez, J Méndez, J Fernández-Tajes

Dpto. Biología Celular e Molecular, Universidade da Coruña

El análisis de los cromosomas desempeña un importante papel en diferentes campos de la investigación genética. El cómputo de cromosomas pone de manifiesto fenómenos de aneuploidía y poliploidía. La distinción de cromosomas homólogos posibilita la caracterización de reordenaciones cromosómicas fijadas y polimorfismos. La identificación de entidades estructurales y funcionales de los cromosomas refleja la organización de genes y genomas. La comparación de cariotipos permite establecer relaciones entre taxa y ayuda a comprender la evolución de las especies ya que la especiación es promovida o seguida con frecuencia por reordenaciones cromosómicas. También el estudio de los procesos de hibridación se beneficia del análisis cromosómico mediante la caracterización de los cromosomas parentales y las alteraciones cromosómicas potencialmente asociadas, y mediante la evaluación de la eficacia del proceso. Finalmente, la asignación de grupos de ligamiento a cromosomas específicos y el conocimiento de la localización cromosómica de los marcadores moleculares facilita los programas de mejora basados en mapas genéticos.

En este trabajo se realiza una revisión de los estudios cromosómicos en almejas de la familia de bivalvos Veneridae por englobar especies comestibles de gran importancia económica en muchas partes del mundo. Con ello se pretende aportar una visión general de los cariotipos de las especies examinadas y sus anomalías, así como resaltar el estado actual de la aplicación de técnicas citogenéticas y los resultados aportados en este grupo de bivalvos. Al incluirse especies comerciales, la revisión también trata los ensayos realizados para inducir triploides y tetraploides y las consecuencias principales de la poliploidía inducida.

Nuevo elemento mariner en el genoma de las hormigas: estudio y caracterización del elemento Azteca

P Lorite¹, O Sanllorente¹, MI Torres¹, G Periquet², T Palomeque¹

(1) Dpto. Biología Experimental, Universidad de Jaén

Los elementos mariner son los transposones de tipo II más frecuentes y extendidos en el genoma de eucariotas. Se encuentran flanqueados por secuencias repetidas terminales invertidas (ITRs), codifican una única proteína, la transposasa, que uniéndose a las ITRs escinde el mariner y lo integra en otro lugar del genoma.

Se han publicado tres tipos diferentes de elementos mariner en tres especies de hormigas; Mboumar, Sinvmar, y Myrmar. Un cuarto elemento mariner, llamado Azteca, se ha encontrado insertado dentro de los elementos Myrmar de *Tapinoma nigerrimum*. Este elemento, de 900 pb, es defectivo, debido a la existencia de una deleción interna. Actualmente se ha secuenciado el genoma de 7 especies de hormigas, de los géneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Camponotus*, *Harpegnathos*, *Linepithema*, *Pogonomyrmex* y *Solenopsis*. La búsqueda en las secuencias disponibles de estos genomas ha puesto de manifiesto que este nuevo mariner está presente en todas ellas. En cuatro de las especies se encuentran elementos completos de aproximadamente 1300 pb. Además existen múltiples copias defectivas similares a las existentes en *Tapinoma*, así como otras copias truncadas en los extremos 5' o 3'. En las secuencias disponibles de los genomas de *Linepithema humile* y *Solenopsis invicta* no se detectan copias completas. Sin embargo, mediante PCR hemos amplificado elementos completos en estas dos especies. También se han amplificado copias completas en *Tapinoma nigerrimum*. Se hace un estudio sobre la posible actividad de estos elementos y un análisis filogenético. En *T. nigerrimum* se realiza la localización cromosómica del elemento Azteca y se hace un estudio comparativo de la distribución de los cuatro tipos de mariner en esta especie.

**Localización centromérica de la proteína de reparación del ADN, Ku70,
durante la meiosis y la mitosis del saltamontes
*Eyprepocnemis plorans***

J Cabrero¹, M Bakkali¹, B Navarro-Domínguez¹, R Martín-Blázquez¹,
F Ruiz-Ruano¹, R Palomino², JPM Camacho¹

Dptos de Genética (1) y Bioquímica y Biología Molecular I (2),
Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

La proteína Ku70 está implicada principalmente en la ruta NHEJ (non-homologous end joining) de reparación del ADN. En el saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, la técnica de inmunofluorescencia ha revelado la presencia de pequeños y numerosos focos de Ku70 repartidos aleatoriamente por el citoplasma. Además, y como novedad, observamos por primera vez la presencia de grandes focos localizados en los centrómeros de todos los bivalentes y en los de los univalentes X y B. Los focos centroméricos aparecen durante diacinesis, y son igualmente visibles en las metafases y anafases meióticas y mitóticas (espermatogoniales y embrionarias). Dado lo inesperado de este resultado, y para verificar que la proteína que estábamos detectando en los centrómeros era efectivamente la Ku70, amplificamos la secuencia en *E. plorans* correspondiente a la región del gen Ku70 que se había usado para generar el anticuerpo, obtuvimos un ARN de doble cadena para esa región, y lo inyectamos a tres machos. En todos ellos desaparecieron los focos centroméricos, demostrando que la inactivación del gen Ku70 mediante ARNi conduce a la ausencia de la proteína Ku70 en las regiones centroméricas. Estos machos mostraban, además, una frecuencia muy elevada de macroespermátidas, sugiriendo que la ausencia de Ku70 puede estar asociada con fallos en la función centromérica. Para probar esta posibilidad, inyectamos colchicina a dos machos y, en ambos, desaparecieron los focos centroméricos. Todo esto sugiere que la proteína Ku70 está implicada en la función centromérica en *E. plorans*. Para comprobar si esta nueva función de Ku70 es una característica general, realizamos el mismo análisis en 14 especies de saltamontes, incluyendo especies cercanas a *E. plorans* y las langostas *Locusta migratoria* y *Schistocerca gregaria*, y en ratones. En todas estas especies observamos los focos pequeños citoplasmáticos, pero no los centroméricos. Esto sugiere que la función centromérica de Ku70 es una autapomorfía en *E. plorans*.

Tras los neocentrómeros meióticos se atisba la evolución de los cromosomas eucarióticos

MJ Puertas

Dpto de Genética, Fac de Biología, Universidad Complutense de Madrid

Los neocentrómeros son regiones cromosómicas que, en circunstancias especiales, se unen a los microtúbulos del huso y lideran el movimiento de los cromosomas a los polos. Los neocentrómeros que se forman en los cromosomas de plantas durante la meiosis aparecen como bloques heterocromáticos, generalmente localizados en posición terminal. Los neocentrómeros intersticiales son menos frecuentes, pero también se forman en regiones heterocromáticas. La heterocromatina con propiedades neocéntricas se estira hacia los polos por delante del verdadero centrómero y en ciertos casos orienta con él a polos diferentes.

Los neocentrómeros meióticos tienen muchas similitudes con los centrómeros verdaderos: tienen propiedades cinéticas, se unen a los microtúbulos y mantienen la unión de las cromátidas hermanas en anafase I. Al contrario que los verdaderos centrómeros, no se unen a las proteínas centroméricas CENH3 ni CENPC.

De acuerdo con la hipótesis de que los centrómeros se derivaron de los telómeros durante la evolución del cromosoma eucariótico, en este trabajo se sugiere que la presencia de repeticiones subteloméricas en las regiones cromosómicas con actividad neocéntrica en meiosis, puede ser el reflejo de un modo primitivo de interacción de los “proto-centrómeros” con los microtúbulos del huso. Por tanto parece plausible que el comportamiento de los neocentrómeros meióticos sea un remanente de la capacidad centromérica ancestral.

Se discuten los intrigantes paralelismos en la función de la heterocromatina centromérica y telomérica y se propone la necesidad de una función doble del “proto-telómero” en la protección de los extremos y en la segregación del cromosoma eucariótico durante su evolución en las etapas primitivas.

En este escenario evolutivo, la heterocromatina inicial, organizada en los extremos cromosómicos nacientes, habría facilitado el reclutamiento de proteínas de protección de los extremos cromosómicos y la unión de microtúbulos en la región subtelomérica. Posteriormente evolucionaría una función madura de segregación en la región subtelomérica, que daría lugar al centrómero.