

Congreso de la Sociedad Española de Genética. Sevilla 2001

CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE GENÉTICA SEVILLA 2001

Congreso
de la
Sociedad Española
de Genética

SEVILLA
2001

Sevilla - 19 al 21 de
Septiembre de 2001

Consejería de Agricultura y Pesca



**CONGRESO DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE GENÉTICA**

SEVILLA 2001

19 al 21 de Septiembre de 2001

*Organizado por el Departamento de Genética
de la Universidad de Sevilla*

TÍTULO:

Congreso de la Sociedad Española de Genética. Sevilla 2001

©:

JUNTA DE ANDALUCÍA. *Consejería de Agricultura y Pesca.*

© TEXTOS:

Autor/es.

PUBLICA:

Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

COLECCIÓN:

Congresos y Jornadas.

SERIE:

Agricultura.

COMITÉ ORGANIZADOR:

Josep Casadesús Pursals (Presidente)

Andrés Aguilera López (Secretario)

Isabel López Calderón (Tesorera)

Javier Avalos Cordero

Tahia Benitez Fernández

Enrique Cerdá Olmedo

Luis Corrochano Peláez

Sebastián Chávez de Diego

Antonio Marín Rodríguez

Eduardo Santero Santurino

ISBN:

84-8474-031-5

DEP. LEGAL:

SE-2262-2001.

IMPRESIÓN:

A.G. Novograf, S.A. (Sevilla)

ENTIDADES PATROCINADORAS

Ministerio de Ciencia y Tecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
European Molecular Biology Organization
Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía



Consejería de
Turismo y Deportes,
Junta de Andalucía

Universidad de Sevilla
Fundación Ramón Areces
Patronato del Real Alcázar, Sevilla
Merck-Eurolab
Cruzcampo S. A.

COMITÉ ORGANIZADOR

Josep Casadesús Pursals (Presidente)
Andrés Aguilera López (Secretario)
Isabel López Calderón (Tesorera)
Javier Avalos Cordero
Tahía Benitez Fernández
Enrique Cerdá Olmedo
Luis Corrochano Peláez
Sebastián Chávez de Diego
Antonio Marín Rodríguez
Eduardo Santero Santurino

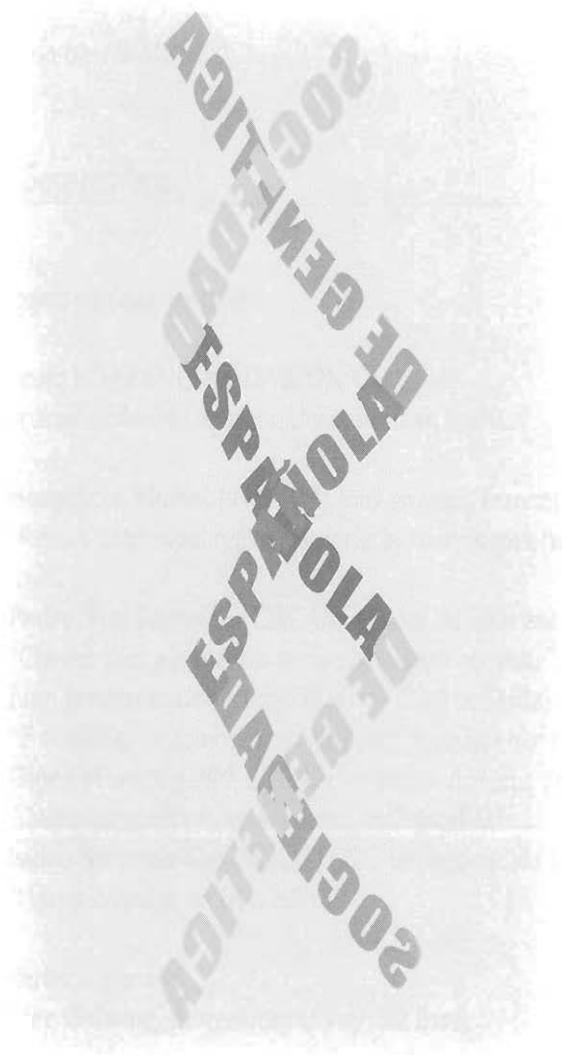
SECRETARÍA TÉCNICA

Travel Dos Congresos, Génova 6, 41010 Sevilla

SEDE DEL CONGRESO

Salón de Actos de la E. T. S. de Arquitectura
C / Páez de Rivera s/n
Campus de Reina Mercedes
Universidad de Sevilla

PROGRAMA



17.00-20.15 h. Simposio II: "EVOLUCIÓN MOLECULAR".
Coordinadora: Montserrat Aguadé, Universidad de Barcelona.

- **Wolfgang Stephan** (Universität Ludwig-Maximilian, Munich, Alemania).
"Patterns of covariation in RNA secondary structures and molecular analysis of compensatory mutations".
- **Carmen Segarra** (Universidad de Barcelona).
"Recombinación, uso de codones y divergencia nucleotídica en *Drosophila*".
- **Armando Caballero** (Universidad de Vigo).
"Estrategias para la conservación de recursos genéticos".
- **Rosa de Frutos** (Universitat de Valencia).
"Evolución de retroelementos en genomas de eucariotas".
- **Lucas Sánchez** (CIB, CSIC, Madrid).
"Evolución de la determinación sexual y la compensación de dosis génica en Diptera: Aspectos comparativos entre *Drosophila* (Suborden *Brachycera*) y *Sciara* (Suborden *Nematocera*)".

21.30 h. Visita monumental.

Jueves, 20 de Septiembre

09.00-12.30 h. Simposio III: "EXPRESIÓN GÉNICA".
Coordinadores: Eduardo Santero y Sebastián Chávez, Universidad de Sevilla.

- **Carmen Pueyo** (Universidad de Córdoba).
"Expresión génica y estrés oxidativo. Cuantificación de la transcripción por RT-PCR múltiple".
- **Miguel Vicente** (CNB, CSIC, Madrid).
"¿Hay redes reguladoras de la expresión de genes esenciales?".
- **Lluis Montoliu** (CNB, CSIC, Madrid).
"Dominos de expresión en procesos de transferencia génica".
- **Juan Valcárcel** (EMBL, Heidelberg).
"Regulación de la expresión génica a nivel de procesamiento alternativo del ARN mensajero".

- **Jesús de la Cruz** (Universidad de Sevilla).
“Helicasas de RNA y síntesis de ribosomas”.

13.00-14.00 h. Conferencia plenaria.

Antonio Prevosti, Universidad de Barcelona.
“Los seres vivos como sistemas informacionales”.

14.00-15.00 h. Almuerzo.

15.00-17.00 h. Sesión de paneles.

17.00-20.15 h. Simposio IV: “PATOLOGÍA GENÉTICA”.

Coordinador: Isidro Sánchez García, CIC, CSIC/Universidad de Salamanca.

- **Thomas Boehm** (Max-Planck-Institute, Freiburg-im Briesgau, Alemania).
“Genetic dissection of lymphoid organ development”.
- **Barry Heavey** (RIMP, University of Vienna, Austria).
“The transcriptional control of lineage commitment in hematopoiesis”.
- **Carlos Martínez** (CNB, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid).
“Análisis genético de enfermedades autoinmunes”.
- **María Blasco** (CNB, CSIC, Madrid)
“Telómeros y telomerasa: cáncer, envejecimiento y reparación de DNA”.
- **Miguel Ángel Piris** (CNIO, Instituto Carlos III, Madrid).
“Perfiles de expresión con «microarrays» de cDNA en el diagnóstico molecular del cáncer”.
- **Rogelio González-Sarmiento** (Universidad de Salamanca).
“Edición del RNA: ¿un nuevo mecanismo patogénico?”.

Viernes, 21 de Septiembre

09.00-12.30 h. Simposio V: “EPIGENÉTICA”.

Coordinador: Josep Casadesús, Universidad de Sevilla.

- **Josép Casadesús** (Universidad de Sevilla).
“Información epigenética y actividad génica”.

- **David A. Low** (University of California, Santa Barbara, USA).
“The Dam regulon: understanding how DNA adenine methylase regulates gene expression and virulence in *Escherichia coli*”.
- **Francisco Antequera** (IMB, CSIC-Universidad de Salamanca).
“Estructura y evolución de la metilación del DNA y de las islas CpG en el genoma de mamíferos”.
- **Miguel Á. Vega-Palas** (IBVF, CSIC-Universidad de Sevilla).
“Heterocromatina y silenciamiento telomérico en levaduras”.
- **Miguel Á. Navarro** (University of Manchester).
“Control epigenético de la variación antigénica en tripanosomas africanos”.

13.00-14.00 h. Conferencia plenaria.

Franklin W. Stahl, University of Oregon, Eugene, USA.
“Meiotic recombination: a speculative synthesis”.

14.00-15.00 h. Almuerzo.

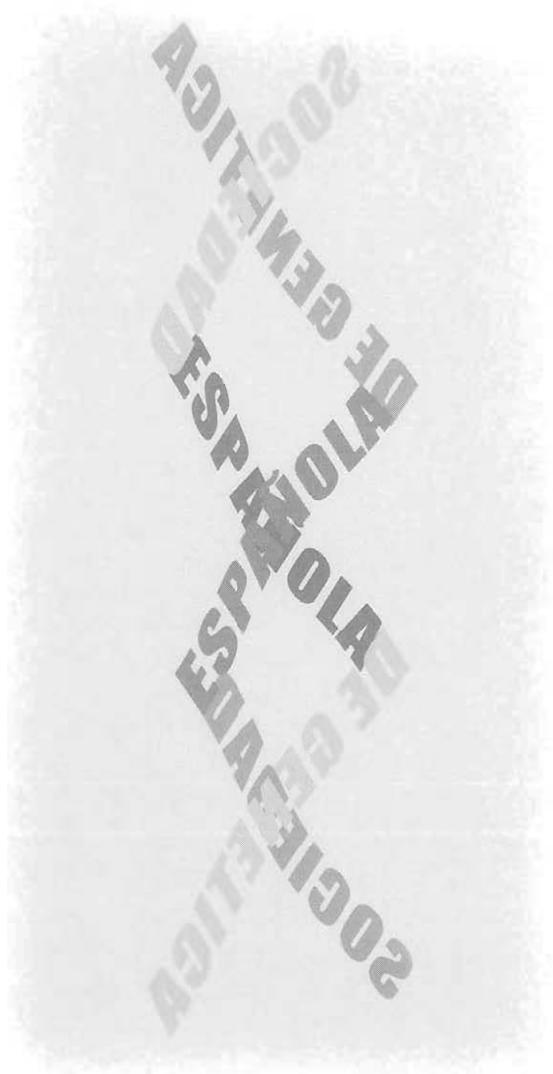
16.00-19.00 h. Mesa Redonda: “ORGANISMOS TRANSGÉNICOS”.
Coordinador: Tahía Benítez, Universidad de Sevilla.

- **Juan Luis Ramos** (EEZ, CSIC, Granada).
“¿Son posibles las aplicaciones de la Biotecnología en el Medio Ambiente?”.
- **Daniel Ramón** (IATA, CSIC, Valencia).
“Transgénicos en alimentación”.
- **Blanca San Segundo** (IBM, CSIC, Barcelona).
“La biotecnología aplicada a la obtención de cultivos protegidos contra plagas y enfermedades”.
- **Armand Sánchez** (Universidad Autónoma de Barcelona).
“Hitos y retos de la transgenia animal en especies domésticas”.

19.00 h. Asamblea de la SEG.

21.00 h. Cena de clausura.

**RESÚMENES
DE PONENCIAS**



Replication fork reversal in *Escherichia coli*.

Bénédicte Michel, Maria-Jose Flores, Gianfranco Grompone, Marie Seigneur, Enrique Viguera and Vladimir Bidnenko. Laboratoire de Génétique Microbienne, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy en Josas France.

The propagation of replication forks can be impaired by the encounter of obstacles such as DNA lesions or DNA-bound proteins that act as a road-block. Because in wild-type cells the precise amount of replication arrests and their origin are not known at present, mutants in which replication is arrested because of a defect in a known replication protein were used to study the consequences of replication blockage. Inactivation of a replicative helicase leads to a set of events that are best explained by a model involving replication fork reversal. According to this model, replication fork **arrest** is followed by the re-annealing of the nascent leading and lagging strands, allowing the **template** strands to pair, and leading to the formation of a Holliday junction. Replication fork reversal was proposed to occur upon replication arrest (i) in *rep* mutants, defective for an accessory replicative helicase thought to remove protein roadblocks from the path of replication forks, (ii) in a *holD*^{G10} mutant, impaired for the Psi subunit of the holoenzyme polymerase III gamma complex, (iii) upon a shift to restrictive temperature of *dnaBts*, *dnaEts* or *dnaNts* mutants, which carry a conditional mutation in genes encoding the replisome helicase, the Pol III catalytic subunit and the Pol III β clamp respectively. The molecular mechanism of fork reversal and the consequences of the reaction will be discussed.

Patterns of covariation in RNA secondary structures and molecular analysis of compensatory mutations.

Wolfgang Stephan, Dept. of Evolutionary Biology, U. of Munich, Luisenstr. 14, 80333 Munich, Germany

By compensatory mutations we usually mean a pair of mutations at different nucleotide sites in the genome that are individually deleterious but neutral or positively selected in appropriate combinations. We study the process of compensatory evolution in RNA secondary structures by comparative genomics and molecular approaches. To analyze compensatory evolution in RNA secondary structures, we have recently developed a likelihood method to predict secondary structures based on an alignment of homologous DNA sequences. This method was tested against various tRNA, rRNA, and mRNA molecules with known structures. It identified nearly all evolutionarily conserved helices in these structures. Furthermore, we analyzed models of compensatory evolution and estimated the parameters of these models from DNA sequence data. We found that the strength of selection on individual Watson-Crick pairs is in the range of $0.5 < Ns < 5$ (where s is the selection coefficient and N the effective population size). Another important component of this project is the analysis of individual helices of the statistically predicted *Adh* mRNA secondary structure by site-directed mutagenesis and P-element transformation. In a first set of experiments, we found evidence for a compensatory, long-range interaction between the 5' and 3' ends of *Drosophila Adh* mRNA. Further mutagenesis experiments in the lab investigate various phylogenetically inferred hairpin structures of *Adh* pre-mRNA. Of particular interest are the hairpins in the two small *Adh* introns that we identified by our likelihood ratio test mentioned above. We examined whether these helices affect the efficiency of splicing as they encompass or are located close to the branchpoint, which is an important splicing signal.

RECOMBINACIÓN, USO DE CODONES Y DIVERGENCIA NUCLEOTÍDICA EN DROSOPHILA

Carmen Segarra

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Numerosos estudios demuestran que el ambiente recombinacional tiene un efecto importante sobre el nivel de polimorfismo nucleotídico en *Drosophila*. Además, ciertos modelos teóricos predicen un efecto de la recombinación sobre la tasa de fijación de las mutaciones ligeramente seleccionadas. Con la finalidad de analizar este posible efecto se ha estudiado la divergencia nucleotídica entre *Drosophila melanogaster* y *D. subobscura* en genes que presentan drásticas diferencias en la frecuencia de recombinación entre dichas especies. Se ha comprobado que este cambio en el ambiente recombinacional tiene un efecto importante sobre el patrón de divergencia de estos genes. Dicho patrón se caracteriza por una elevada divergencia en las posiciones sinónimas y por acusadas diferencias en el sesgo en el uso de codones sinónimos en ambas especies. Aunque este patrón fue detectado inicialmente para los genes *yellow* y *scute*, posteriormente se ha confirmado para otros genes como, por ejemplo, *achaete*. El citado efecto de la recombinación sobre la divergencia también se ha confirmado para el gen *yellow* entre otras especies del grupo *obscura* y del grupo *melanogaster*. Una excepción son las comparaciones entre *D. ananassae* y las especies del grupo *obscura*. En estas comparaciones la divergencia sinónima es muy inferior y el sesgo en el uso de codones sinónimos es muy similar en ambas especies. La localización del gen *yellow* en *D. ananassae* en una zona de recombinación normal es compatible con este último patrón. Los resultados obtenidos pueden explicarse por un acusado incremento en la tasa de fijación de mutaciones sinónimas de codón preferente a codón no preferente en el linaje que conduce a las especies del subgrupo *melanogaster* a partir del momento en el que el gen *yellow* ocupara una posición telomérica en este linaje.

ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS

A. Caballero

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología,
Universidad de Vigo, 36200 Vigo.

Desde el punto de vista genético, los objetivos principales en los programas de conservación son evitar la consanguinidad, mantener la variación genética y preservar la población de la adaptación a la cautividad para una posible reintroducción al estado salvaje. Puesto que los recursos genéticos se mantienen comúnmente con censos de población reducidos, la deriva genética es la fuente principal de pérdida de variación genética. Los estudios teóricos permiten concluir que el procedimiento práctico más efectivo para mantener la máxima diversidad genética en programas de conservación consiste en minimizar el parentesco promedio entre los individuos reproductores. Esto produce tasas de consanguinidad y deriva genética que son aproximadamente la mitad de las que se producirían con contribución aleatoria de padres, puesto que la única fuente de deriva genética que se mantiene es la debida a la segregación de los heterocigotos. En adición, la utilización de marcadores genéticos o técnicas reproductivas especiales permite reducir, e incluso eliminar completamente, la fuente de deriva debida a la segregación de los heterocigotos. El análisis de poblaciones subdivididas requiere la partición de la diversidad genética en componentes intra e inter-subpoblacionales, pero los principios básicos son los mismos que en las poblaciones sin subdividir.

Un efecto colateral de todas las técnicas de manejo es el de reducir la intensidad de la selección natural, ya que no se producen diferencias en fecundidad entre padres, excepto en lo que se refiere a esterilidad completa de los individuos. Así pues, los métodos de conservación hacen más probable que se acumulen genes deletéreos en el genoma, particularmente en poblaciones de censo reducido. Sin embargo, utilizando modelos realistas de variación genética para caracteres reproductivos se puede concluir que este efecto no es particularmente importante, y las ventajas inherentes al mantenimiento de la variabilidad genética prevalecen.

Evolución de retroelementos en el genoma de eucariotas

Rosa de Frutos

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València. Valencia

Los retroelementos, secuencias de ADN móvil originadas por un proceso de retrotranscripción, están ampliamente distribuidos en los genomas de eucariotas. Por su abundancia pueden destacarse los retrotransposones en plantas y los LINEs y SINEs en mamíferos. En los genomas de estos grupos biológicos, los retroelementos han sufrido una fuerte expansión, llegando a constituir la fracción más importante en muchas especies. Frente a estos modelos de organización genómica, *Drosophila* se caracteriza por contener un bajo número de retroelementos. Se desconoce, en general, cuales son los mecanismos que controlan la expansión de los retroelementos en el genoma huésped. Puede hipotetizarse que en *Drosophila*, a diferencia de los genomas de plantas o mamíferos, estos elementos están sometidos a una fuerte presión de selección. Hemos analizado la dinámica evolutiva en dos retroelementos: *gypsy* (elemento tipo de una superfamilia de retrotransposones) y *bilbo* (elemento similar a los LINE de mamíferos), en las especies del grupo *obscura* de *Drosophila*. Los resultados del análisis de las secuencias relativas a los genes *env* de *gypsy* y *pol* de *bilbo*, indican una historia evolutiva similar en ambas familias de elementos. En ambos casos los elementos constituyen un grupo monofilético, y las relaciones filogenéticas entre los elementos de cada grupo son consistentes con las relaciones existentes entre sus especies huésped, lo que apoya la transmisión vertical (en el caso de *gypsy* parecen probables sucesos ocasionales de transferencia horizontal con especies externas al grupo *obscura*). También en ambos casos, las tasas de sustituciones sinónimas (K_s) son mayores que las no sinónimas (K_a), lo que apoya la incidencia de selección purificadora en sus historias evolutivas; además la razón K_s/K_a tiende a aumentar a medida que aumenta la distancia entre las secuencias. Como nota diferencial destaca una mayor tasa evolutiva en *bilbo*. Se discuten las distintas tasas de cambio en estos elementos respecto de un elemento genómico de las especies huésped: el gen *Adh*.

REGULACION DE LA EXPRESION GENICA A NIVEL DE PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL ARN MENSAJERO

Juan Valcárcel

Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL)Heidelberg(Alemania)

Al menos 60% de los genes humanos generan más de un ARN mensajero (ARNm) a partir sus transcritos primarios (pre-ARNms). Algunos pre-ARNms pueden generar miles de ARNms diferentes, incrementando sustancialmente la capacidad codificante del genoma. Nuestro grupo está interesado en investigar los mecanismos moleculares por los que se regula la selección de patrones de procesamiento alternativo de pre-ARNms durante la diferenciación celular y el desarrollo.

Nuestra aproximación ha consistido en analizar bioquímicamente ejemplos de regulación bien caracterizados genéticamente en *Drosophila melanogaster*. La proteína Sex-lethal (SXL) se une a ARN y se expresa exclusivamente en hembras. La expresión de SXL induce patrones de procesamiento específicos de hembras en genes diana. Hemos investigado cómo SXL interfiere con la actividad normal de la maquinaria de procesamiento para llevar a cabo sus funciones reguladoras. Nuestros resultados indican que SXL bloquea el acceso de factores generales de procesamiento a las señales que flanquean las secuencias codificantes (exones) de ciertos genes diana. En otros genes SXL influye en el proceso catalítico que conduce a la eliminación de las secuencias no codificantes (intrones).

El análisis de los mecanismos de regulación frecuentemente permite descubrir nuevos aspectos del funcionamiento de la maquinaria basal de procesamiento. Así, nuestro trabajo ha permitido definir la arquitectura modular de ciertos factores de procesamiento, nuevas funciones para familias de proteínas implicadas en la definición de los márgenes entre exones e intrones, y la caracterización de factores que regulan el procesamiento alternativo de genes implicados en la muerte celular programada o apoptosis.

Recientemente hemos complementado estos abordajes con métodos bioinformáticos y de genómica, con el objetivo de intentar entender la lógica molecular del programa de regulación génica que dirige el procesamiento alternativo de pre-ARNms y su contribución a la generación de complejidad proteómica de los eucariotas superiores.

HELICASAS DE RNA Y SËNTESIS DE RIBOSOMAS

Jesús de la Cruz¹, Dieter Kressler², Manuel Rojo³ y Patrick Linder⁴

¹Dpto. Genética, Universidad de Sevilla, I-41012 Sevilla. ²Biozentrum Basel, CH-4056 Basilea, Suiza. ³Institut Myologie, F-75651 París, Francia. ⁴Med. Biochemistry, CMU, CH-1211 Ginebra, Suiza.

La síntesis de ribosomas es una de las principales actividades celulares. Es un proceso altamente dinámico que implica numerosas moléculas de RNA, proteínas ribosómicas y factores de actuación en *trans* (no presentes en las subunidades ribosómicas maduras)^{1, 2}. Las helicasas de RNA de la familia *DEAD-box* son los factores de actuación en *trans* más numerosos que participan en la biogénesis de ribosomas. Hemos analizado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* diferentes mutantes puntuales y estirpes que expresan condicionalmente estas enzimas, encontrando fenotipos que son característicos de la inhibición del procesamiento de los RNA ribosómicos o del ensamblaje de éstos con proteínas ribosómicas. Dada su posible función helicasa, concluimos que estas proteínas pueden funcionar en: (i) establecer o disociar interacciones RNA:RNA intra o intermoleculares; (ii) optimizar la función de endo y exonucleasas durante el procesamiento de los RNA ribosómicos; (iii) finalmente, incorporar, reordenar o disociar factores de actuación en *trans* y/o proteínas ribosómicas mediante la modulación específica de interacciones RNA:RNA, RNA:proteína o incluso proteína:proteína. En este trabajo, se presentan nuestros resultados más recientes y perspectivas actuales.

1. Venema, J., and D. Tollervey. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33:261-311.

2. Kressler, D., P. Linder, and J. de la Cruz. 1999. Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19:7897-7912.

Transcriptional Control of B Cell Lineage Commitment and Development

B. Heavey, I. Mikkola, M. Schebesta and M. Busslinger

Research Institute of Molecular Pathology, Dr. Bohr-Gasse 7, A-1030 Vienna, Austria

The transcription factor Pax5 (BSAP) is expressed within the hematopoietic system exclusively in the B-lymphoid lineage, where it is required for progression beyond an early progenitor (pro-B) cell stage. Surprisingly, the pro-B cells of Pax5-deficient mice are still able to differentiate to natural killer cells, T-lymphocytes and various myeloid cell types and thus correspond to uncommitted hematopoietic progenitor cells (Nutt et al., *Nature* 401, 556-562; Rolink et al., *Nature* 401, 603-606). Restoration of Pax5 expression in these pro-B cells rescues B cell development by repressing the transcription of lineage-inappropriate genes and thereby suppressing alternative lineage choices. The repression function of Pax5 is mediated through interaction with corepressors of the Groucho protein family (Eberhard et al., *EMBO J.* 19, 2292). On the other hand, Pax5 also activates the transcription of B-lymphoid genes and thus contributes to the stabilization of the B-lymphoid gene expression program. This is best illustrated by the Pax5 target gene BLNK, which codes for a central adaptor protein involved in B cell receptor signaling.

Conditional mutagenesis revealed that Pax5 expression is continuously required at the pro-B cell stage in order to maintain commitment to the B-lymphoid lineage. Moreover, Pax5 is indispensable for controlling the identity of mature B cells in late B-lymphopoiesis. Together, these data demonstrate that Pax5 is essential for maintaining the identity of B-lymphocytes throughout B cell development.

Telómeros e inestabilidad cromosómica: cancer, senescencia y reparación de DNA

Enrique Samper, Eva González-Suárez, Fermín Goytisolo & María A. Blasco

Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco 28049, Madrid, SPAIN.

Los telómeros son el final de los cromosomas y están constituidos por DNA repetitivo (TTAGGG en todos los vertebrados) y por proteínas asociadas. Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas de actividades de recombinación y degradación. La pérdida de función telomérica resulta en inestabilidad cromosómica y muerte o parada celular. Esta pérdida de función puede ocurrir debido a (i) la pérdida progresiva de repeticiones TTAGGG que ocurre con la edad y/o el número de divisiones crecientes, o bien, (ii) debido a la mutación y/o pérdida de proteínas específicas del telómero. La enzima *telomerasa* es la transcriptasa en reverso celular que sintetiza repeticiones teloméricas *de novo*. La activación de la telomerasa evita la disfunción telomérica asociada a división celular y así asegura una capacidad proliferativa indefinida. De hecho, la reactivación de telomerasa es una de las alteraciones más comunes en cáncer humano: más del 90 % de todos los tipos de tumores sobreexpresan telomerasa. La caracterización de ratones deficientes en actividad telomerasa, ratones *Terc*^{-/-}, ha servido para establecer el papel de la telomerasa y de los telómeros tanto en el cáncer, como en el envejecimiento o pérdida de la capacidad de regeneración de tejidos con la edad. Así mismo, la caracterización de ratones genéticamente deficientes en proteínas teloméricas nos ha permitido establecer el papel de estas en estabilidad cromosómica, cancer y envejecimiento. En mi ponencia me centraré en la descripción de las patologías asociadas a pérdida de función telomérica en ratones. Así, mismo describiré el impacto sobre el cancer de la pérdida o ganancia de actividad telomerasa usando ratones modificados genéticamente.

c-DNA microarrays. El Oncochip del CNIO.

Miguel Ángel Piris

En Febrero del año 2001 ha sido publicada en las Revistas Nature y Science la secuencia del 92% del genoma humano, descifrada en un esfuerzo internacional bautizado como Human Genome Project, y realizado por un Consorcio Público (NCBI) y la empresa Celera Genetics. Esta publicación abre una nueva vía al estudio de genes implicados en distintos procesos biológicos.

Una primera consecuencia de este esfuerzo es el considerable aumento en la disponibilidad de clonas de cDNA del consorcio IMAGE (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression, cubriendo hasta el 92% de la secuencia del genoma humano. Esto ha permitido desarrollar la tecnología de microarrays de cDNA para análisis de expresión.

En contraste con las técnicas moleculares convencionales que solo permitían el estudio de uno o varios genes a un tiempo, los microarrays de cDNA permiten analizar miles de genes simultáneamente en una muestra. Esto brinda un instrumento muy útil en el diagnóstico e investigación del cáncer humano, caracterizado por la presencia simultánea de múltiples alteraciones en genes y rutas controladoras del ciclo, reparación de DNA y otras.

¿Que es un microarray de expresión de cDNA?

Un microarray de cDNA es una matriz de miles de genes (hasta 18.000 secuencias de ADN) sobre superficies inertes (en el Oncochip del CNIO, de 4cm²). El microarray de expresión génica analiza el transcriptoma (ARN mensajero) en distintas poblaciones de células pudiendo comparar el nivel de expresión de cada gen en dos poblaciones. Esta técnica se basa en hibridación *in situ* competitiva, a través de un marcaje con fluorescencia.

Cuando un gen se expresa, éste produce un transcrito cuya base molecular es una molécula de ARN. Para la realización de esta técnica se marca con un único fluorocromo todo el conjunto de transcritos de las células que componen una neoplasia, y con otro los correspondientes a una población celular no tumoral de consenso. Ambos transcriptomas compiten para hibridarse con las cadenas complementarias de cDNA depositadas en el chip. De esta forma, al analizar el diferencial de hibridación entre ambos grupos obtendremos información sobre el mayor o menor grado de expresión de cada gen en la población neoplásica respecto de la control.

Esta tecnología consta de 4 partes

1.- **Impresión** de los clones de interés de cDNA de forma ordenada, en posiciones predefinidas, sobre un portaobjetos de cristal (en el modelo escogido por el CNIO) mediante un proceso robotizado .

2.- **Marcaje e hibridación:** El cDNA de dos poblaciones celulares (una tumoral problema y una normal que se usa de control) es marcado con distintos fluorocromos (Cy3-dUTP -rojo-, Cy5-dUTP -verde-) y es hibridado simultáneamente con un microarray que contienen miles de fragmentos de cDNA depositados.

3.- **Lectura del microarray:** Una vez hibridado el microarray se obtiene una matriz de puntos que es leída por un escáner, compuesto por un láser confocal. El *ratio* de fluorescencia (rojo/verde) en cada punto (gen) indica el *ratio* de concentraciones de moléculas de ARN mensajero entre las dos poblaciones celulares analizadas.

4.- **Análisis de la información.** Los datos de varios experimentos pueden ser comparados y los genes con patrones de actividad constante pueden ser agrupados, mediante distintos programas bioinformáticos basados en métodos de agrupamiento (*clustering* o agrupación jerárquica algorítmica) y SOM (self-organizing-maps). Así genes que caracterizan un determinado estado celular (maligno vs. benigno), características con valor pronóstico (agresivo vs. quiescente) o predicen la respuesta a una droga específica, son agrupados dando información sobre la complejidad de los fenómenos biológicos que caracterizan a la muestra en estudio.

A pesar de ser un sistema de análisis génico masivo, los microarrays de cDNA tienen una alta sensibilidad. Una de las ventajas significativas es que, debido a la miniaturización del

Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, Ethier SP, Kallioniemi A, and Kallioniemi O-P. (2000) Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 60:4519-4525

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES ____
Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999 Oct 15;286(5439):531-7

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V__
Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling
Nature 2000 Aug 3;406(6795):536-40

Pinkel: Cancer cells, chemotherapy and gene clusters. *Nat Genet* 2000 Mar;24(3):208-9

Young RA : Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 2000 Jul 7; 102(1):9-15

ESTRUCTURA Y EVOLUCION DE LA METILACION DEL DNA Y DE LAS ISLAS CpG EN EL GENOMA DE MAMIFEROS

Francisco Antequera

Instituto de Microbiología Bioquímica
CSIC/Universidad de Salamanca
Campus Miguel de Unamuno
37007-Salamanca

Las regiones 5' de los genes de mamíferos pueden clasificarse en dos grupos en función de su composición de bases y de su grado de metilación. Aproximadamente la mitad de ellas tienen un contenido G+C del 40% que es idéntico al del promedio del genoma y los genes de este grupo siempre se expresan en tejidos específicos. La otra mitad está asociada con islas CpG que son regiones desprovistas de metilación y con un contenido en G+C del 65% aproximadamente. Todos los genes de expresión constitutiva y muchos específicos de tejidos pertenecen a esta categoría.

Hemos descrito recientemente que las islas CpG actúan como orígenes de replicación de DNA lo cual sugiere que sus propiedades características podrían ser una consecuencia de esa actividad. Por otra parte, hemos definido mediante análisis de interacciones DNA-proteína *in vivo* la zona de las islas CpG que actúa como promotor en varios genes humanos y de ratón. Este papel doble facilitaría una posible regulación coordinada de la transcripción y la replicación.

Estas observaciones permiten postular un modelo según el cual los promotores de los genes activos antes del establecimiento de la línea germinal contribuirían a reclutar las moléculas iniciadoras de la replicación. A lo largo de sucesivas generaciones, el proceso de iniciación de la replicación generaría una zona con **las propiedades de las islas CpG** a la que los factores de transcripción habrían tenido que adaptarse. Este modelo explica que la secuencia de cada isla CpG sea única y que los promotores

asociados a ellas en genes homólogos humanos y de ratón tengan una organización completamente diferente.

References

1. Antequera and Bird (1993) PNAS
1. Delgado et al (1998) EMBO J.
2. Antequera and Bird (1999) Curr. Biol.
3. Cuadrado et al (2001) EMBO Reports

HETEROCROMATINA TELOMÉRICA Y SILENCIAMIENTO

Miguel Angel Vega Palas

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones
Isla de la Cartuja, c/ Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, España.

Los telómeros eucariotas juegan un papel esencial en la biología celular ya que garantizan la replicación del final de los cromosomas e impiden su fusión y su degradación por nucleasas inespecíficas (1-4). Además, los telómeros pueden silenciar la expresión de los genes subteloméricos y están implicados en la reparación de daños al ADN, en el reconocimiento de los cromosomas homólogos, en la recombinación y en la correcta segregación cromosómica (5). Todos estos procesos están probablemente influenciados por la especial estructura cromatínica, de naturaleza heterocromatínica, en que se organizan las regiones teloméricas (6).

Recientemente he podido comprobar que la formación de la heterocromatina telomérica implica dos fases distintas, una fase de inicio y otra de extensión. Al extenderse hacia el interior del cromosoma, la heterocromatina telomérica puede silenciar la expresión de ciertas unidades transcripcionales subteloméricas (7-10). Resulta interesante resaltar que una de estas unidades transcripcionales es el retrotransposón Ty5-1. El silenciamiento de dicho retrotransposón podría controlar su proliferación e, incluso, condicionar su evolución.

Un número significativo de estudios han contribuido a definir la naturaleza repetitiva de las repeticiones teloméricas y de sus secuencias asociadas (denominadas TAS) en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, pocos de estos estudios han prestado atención a las regiones que se localizan en el lado centromérico de las TAS. Puesto que considero que estas regiones subteloméricas son importantes, de hecho contienen genes silenciados, he decidido analizar su estructura primaria. Tras realizar múltiples análisis de comparación de secuencias he podido comprobar que muchas de estas regiones están altamente conservadas. He denominado a estos grupos de secuencias Grupos Subteloméricos de Homología.

Referencias: 1) Blackburn, E. (1991) *Nature* 350, 569-573. 2) Greider, C. (1996) *Scientific American* Febrero, 80-85. 3) Lingner, J. y Cech, T. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 226-232. 4) Zakian, V. (1989) *Annu. Rev. Genet.* 23, 579-604. 5) Gartenberg, M. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 132-137. 6) Grunstein, M. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 383-387. 7) Vega-Palas et al., (2000) *Mol. Gen. Genet.* 263, 287-291. 8) Vega-Palas et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 9388-9392. 9) Vega-Palas et al., (1997) *Nature Genetics* 15, 232-233. 10) Venditti et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 1928-1933.

CONTROL EPIGENETICO DE LA VARIACION ANTIGENICA EN TRIPANOSOMAS AFRICANOS

Miguel Navarro

School of Biological Sciences
Manchester University
Manchester, Reino Unido

El ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* alterna entre un insecto vector y un hospedador mamífero. La forma sanguínea sufre variación antigénica de una cubierta protéica de membrana que permite al parásito eludir la respuesta inmune del hospedador. De entre una familia multialélica de sitios de expresión (SE) teloméricos del gen VSG (glicoproteína variable de superficie), sólo uno es transcripcionalmente activo en cada momento. Unintercambio transcriptional entre dos SEs provoca un cambio del tipo de VSG en la membrana. En la forma del insecto, no se expresan VSGs. Inicialmente, analizamos la cromatina en los SE mediante el estudio de su accesibilidad a la transcripción por una polimerasa heteróloga. El nivel de transcripción de la RNA polimerasa T7, desde un promotor insertado en un SE inactivo en la forma sanguínea, no fue diferente al de otros loci control. Sin embargo, durante la diferenciación a la forma del insecto, la transcripción mediada por T7 desde el SE se redujo dramáticamente. Por otro lado, la delección del promotor de un SE activo en la forma sanguínea, mediante reemplazamiento con el promotor T7, provocó la sorprendente activación de otro SE previamente inactivo. La transcripción endógena del SE esta mediada por una RNA polimerasa I (pol I), localizada en el nucleolo de células eucarióticas. Con el fin de estudiar un posible fenómeno de compartimentalización nuclear en la regulación de los SE, desarrollamos anticuerpos contra pol I. Estos anticuerpos identificaron una macroestructura nuclear que contiene pol I. El marcado de RNA nuclear nascente demostró que dicha estructura extranucleolar es transcripcionalmente activa. Esta factoría transcripcional esta asociada al SE activo, visualizado en el núcleo mediante marcado con GFP-LacI. Todos estos resultados sugieren la existencia de dos mecanismos para la regulación de los SE. Un mecanismo de represión (silencing) de los SE, mediado por remodelación de la cromatina, que operaría en la forma del insecto. Sin embargo, en la variación antigénica que sufre la forma sanguínea, operaría un mecanismo acoplado de activación e inactivación de SEs accesibles, mediado por el reclutamiento del SE a la singular macroestructura de pol I.

LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PROTEGIDOS CONTRA PLAGAS Y ENFERMEDADES.

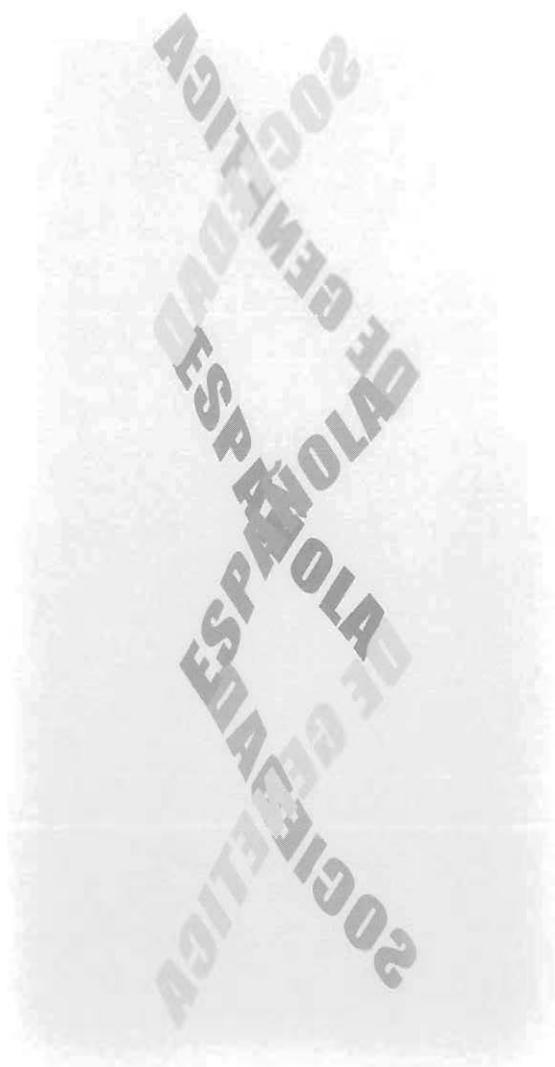
Blanca San Segundo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CID), CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona

Las enfermedades causadas por patógenos y plagas son la causa más importante de pérdidas en las cosechas, pudiendo representar hasta el 30-40% de las pérdidas de todo el mundo. Si a esto se añaden las pérdidas que se producen en periodos postcosecha, el porcentaje asciende al 60-70%. Por otra parte, mientras que la población mundial sigue en continuo crecimiento, existe una limitación en la superficie cultivable de la tierra, por no decir una reducción progresiva de la misma a causa de la deforestación y erosión del suelo, acumulación de productos tóxicos, etc. Ello hace imprescindible la utilización de variedades de especies destinadas a la alimentación que resulten más productivas, mejor adaptadas al entorno, o más resistentes al ataque de patógenos y plagas. En esta dirección, la moderna biotecnología vegetal representa una herramienta de gran utilidad para la obtención de variedades resistentes a enfermedades, con la ventaja adicional de que permite diseñar múltiples estrategias que pueden ser aplicadas a las diferentes especies cultivables. Las ventajas que se derivan de la utilización de variedades modificadas genéticamente resistentes a enfermedades incluyen el incremento en la producción y la reducción en el uso de productos químicos en el campo, con el consiguiente beneficio que ello supone para la conservación del medio ambiente y la reducción de los costes de producción.

Algunas de las estrategias que se están utilizando para la obtención de plantas transgénicas resistentes a enfermedades reproducen los mecanismos naturales de defensa de las plantas (utilización de genes de defensa vegetales, genes que codifican para proteínas con actividad antimicrobiana o insecticida, como transgenes). La utilización de genes de defensa de otros organismos para aumentar las propiedades de resistencia de las plantas amplía las posibilidades, y representa una estrategia alternativa a la utilización de genes de defensa vegetales. Sin embargo, y pese a que no hay ninguna evidencia con fundamento científico de que los cultivos modificados genéticamente representen un riesgo para la salud o el medio ambiente superior al que puedan representar los cultivos tradicionales, en la opinión pública ha surgido un intenso debate acerca de las aplicaciones de la biotecnología vegetal en la agricultura. Muchas de las críticas y preocupaciones surgidas frente a esta nueva tecnología tienen sin embargo soluciones científicamente demostradas. Se hace pues necesario que haya una mayor comunicación entre la comunidad científica y la sociedad, así como la creación de programas internacionales para que esta metodología pueda introducirse en países en vías de desarrollo.

**RESÚMENES
DE COMUNICACIONES**



VALLES CALCHAQUÍES (SALTA, ARGENTINA): GENÉTICA DE LA POBLACIÓN HUMANA MEDIANTE STRs

*Albeza, M.V.; *Acreche, N.E.; Tomàs, C.; Picornell, A.; Castro, J.A.; Ramon, M.M.

Laboratori de Genètica. Universitat de les Illes Balears (Espanya).

*Universidad Nacional de Salta-CIUNSa (Argentina).

Se presenta un estudio genético de la población humana de los Valles Calchaquíes (Cordillera Oriental de los Andes, aprox. 3.000 m de altitud). En esta región se desarrollaron sociedades prehispanicas de alto nivel socioeconómico y diversidad cultural. La población actual mantiene pautas diferenciales que la distinguen de la del resto del país (Argentina) y la acercan a la de los países limítrofes. Es un área con características ecológicas y culturales específicas, combinación de andinas y amazónicas.

La población actual, en su mayoría, ocupa las tierras durante varias generaciones y está desigualmente distribuida, con un total de 25.000 habitantes. Tiene una baja densidad y está mayoritariamente compuesta por pequeños productores que practican la agricultura y ganadería de subsistencia. Las localidades más pobladas son Cafayate, con 9.264 habitantes y Cachi, con 6.157 habitantes (Censo Nacional, 1991).

Se obtuvieron 55 muestras de sangre de individuos no directamente emparentados y con al menos cuatro abuelos nacidos en los Valles Calchaquíes. Se determinaron los nueve STRs incluidos en el AmpF λ STR Profiler Plus PCR (PE Applied Biosystems): D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 y D7S820. La co-amplificación de estos loci se realizó en un GeneAmp PCR System 2400 y el análisis de los fragmentos en un ABI Prism 310 DNA Sequencer.

La población se encuentra en equilibrio de H-W. Las comparaciones con otras poblaciones europeas (españolas, portuguesas e italianas) y americanas (USA, Brasil, Amazonas y Puna (noroeste de Argentina)) han revelado una similitud de la población calchaquí con la amazónica y la andina, y una clara diferenciación genética del resto.

EL GEN DE LA FOTOLIASA DEL HONGO PATOGENO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI* SE INDUCE POR LUZ VISIBLE Y POR α -TOMATINA, GLICOALCALOIDE DE LA PLANTA DE TOMATE.

E.Alejandro-Durán, T.Roldán-Arjona, R.R.Ariza y M. Ruiz-Rubio.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14071. Córdoba.

Para determinar si el hongo fitopatógeno vascular *F. oxysporum* posee un mecanismo de fotorreactivación capaz de reparar dímeros de pirimidina tipo ciclobutano, que es la principal lesión producida en el ADN por la luz ultravioleta (254 nm), se analizó la supervivencia de las esporas irradiadas con luz UV, observándose que se incrementaba significativamente tras la irradiación con luz visible.

Utilizando como sonda un fragmento de 600 pb del gen que codifica dicha enzima en *Neurospora crassa*, se ha aislado un fragmento genómico que contenía el gen que codifica la fotoliasa de *F. oxysporum*. El escrutinio se realizó en una genoteca de ADN genómico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El ADNc de la fotoliasa se obtuvo utilizando como sonda un fragmento genómico de dicho gen, a partir de una genoteca de ADNc. De la comparación de la secuencia genómica y de la del ADNc se deduce la presencia de dos intrones. La secuencia de aminoácidos muestra una gran semejanza con dominios conservados con las fotoliasas de *Trichoderma harzanium*, *N. crassa* y *E. coli* entre otras. Su con otras fotoliasas sugiere que el cromóforo variable de la enzima consiste en pterina, ya que contiene el par IP en la región amino-terminal.

La funcionalidad del gen se confirmó complementando una estirpe de *E. coli* deficiente en actividad fotoliasa. Actualmente se está llevando a cabo la sobre-expresión y la purificación de la enzima, así como la puesta a punto de un ensayo de actividad *in vitro* utilizando un oligonucleótido de 18 residuos de timina irradiado con UV.

El gen de la fotoliasa de *F. oxysporum* se induce en presencia de luz visible. Además, el análisis de la secuencia del promotor del gen revela la presencia de una secuencia consenso STRE (CCCCT) que se ha relacionado con la activación de la transcripción en respuesta a diferentes condiciones de estrés. De hecho, el gen de la fotoliasa también se induce en presencia de α -tomatina. Este glicolcaloide de la planta de tomate interacciona con los esteroides de la membrana, incrementando la permeabilidad del hongo con la formación de poros y pérdidas del contenido celular. Este daño causado por el glicolcaloide a nivel de membrana es probablemente una señal de estrés que conduce a una respuesta celular que activa la transcripción del gen de la fotoliasa entre otros.

REPETIBILIDAD vs. POTENCIA DE LOS ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES DE ADN Y VARIABILIDAD FENOTÍPICA

L. Alfonso

Dep. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra

La probabilidad de detectar la asociación existente entre un marcador de ADN y la variación fenotípica producida por un gen ligado a dicho marcador puede medirse a través de la potencia estadística del estudio de asociación. Este valor nos permite establecer cual es el diseño experimental y la metodología de análisis más adecuados para realizarlo, y depende del espacio de inferencia que nos imponamos. En el caso de estudiar la asociación entre un marcador y por ejemplo una enfermedad animal, nos interesará inferir la asociación para toda una especie, raza o conjunto amplio de poblaciones y no limitarnos a una única población. De este modo diseñaremos distintos estudios a realizar en cada una de las poblaciones implicadas. En algunos casos, se suelen realizar repeticiones del estudio en aquellas poblaciones en las que se detecta asociación estadísticamente significativa, con el objetivo de confirmarla. La probabilidad de volver a detectar una asociación, repetibilidad, es conceptualmente distinta a la potencia del estudio. La repetibilidad se refiere a muestras extraídas de una misma población y la potencia a muestras extraídas de distintas poblaciones.

La no repetibilidad de un análisis de asociación no forzosamente indica que el resultado del primer análisis realizado sea espurio y tengamos por tanto que argumentar causas, como por ejemplo que la población es una población mezclada. Partiendo de esta idea, conocer el valor esperado de repetibilidad en un análisis de asociación permite evaluar el interés de repetir un estudio en una misma población.

Para comparar ambos valores se simuló un estudio de asociación gen-marcador mediante regresión, partiendo de diversas poblaciones y repitiéndolo en cada una de ellas. El proceso se realizó considerando distintas frecuencias y valores aditivos del gen y distinto número de animales muestreados.

Tal como teóricamente cabía esperar, los resultados obtenidos indican que los valores de repetibilidad tienden a ser mayores que los de la potencia, pero sólo cuando esta última es muy baja son relevantemente distintos. No parece por tanto aconsejable dedicar recursos a repetir un estudio de asociación frente a poder realizar estudios de mayor potencia.

POLIMORFISMO ESTRUCTURAL Y DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DE
LOS RETROTRANSPOSONES DE *Drosophila melanogaster*.

L. Alonso-González, A. Domínguez y J. Albornoz.

Dpto. de Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo.

Se investigó la estructura interna y la distribución genómica de cinco familias de retrotransposones (*297*, *412*, *1731*, *copia* y *mdg1*) en una población natural y en tres líneas de laboratorio de *Drosophila melanogaster*.

La distribución en la cromatina de las cinco familias se estudió en una línea isogénica de laboratorio (*sepia-1*). Las familias *297* y *412* están representadas principalmente por copias situadas en la eucromatina, *copia* y *mdg1* tienen las copias situadas en la α y β heterocromatina así como en la eucromatina, mientras que la familia *1731* es principalmente β heterocromática.

Hemos encontrado polimorfismo estructural en las cinco familias, pero hay diferencias cuantitativas y cualitativas entre familias. El número de copias defectivas y su distribución parece ser una característica particular de cada familia. La mayor parte de las copias de *1731* (más del 90%) son defectivas, las familias *297* y *mdg1* tienen un 60%, aproximadamente, de copias defectivas, mientras que las familias *412* y *copia* están representadas sobre todo por copias completas (75 y 89% respectivamente).

SELECCIÓN SUPERGÉNICA DIFERENTE EN SEXOS Y EL MANTENIMIENTO DEL POLIMORFISMO DE INVERSIONES.

José M^o Álvarez y Gonzalo Álvarez.

Dpto. de Biología Fundamental (Área de Genética), Universidad de Santiago de Compostela. 15782 Santiago de Compostela.

Después de más de 50 años de investigación sobre el mantenimiento del polimorfismo de inversiones por selección natural, sigue siendo un enigma la medida en que la heterosis, la selección dependiente de las frecuencias, la selección supergénica u otras fuerzas selectivas contribuyen al establecimiento de equilibrios genéticos en las poblaciones. La potencia que, como mecanismos equilibradores, poseen los fenómenos selectivos que afectan de forma diferente a los dos sexos nos ha motivado a concebir un modelo de selección supergénica en viabilidad diferente en sexos. En dicho modelo se asumen la existencia de dos ordenamientos cromosómicos, la presencia de recombinación sólo en hembras (como ocurre en las especies de *Drosophila*), y panmixia.

El cálculo de condiciones de polimorfismo protegido del sistema genético genera cuatro inequaciones que garantizan la existencia de, al menos, un punto de equilibrio estable, siempre que los parámetros selectivos verifiquen dichas inequaciones. Cuando la matriz jacobiana del sistema evaluada en uno de los puntos de fijación está asociada a autovalores complejos con parte imaginaria no nula, una de las condiciones de polimorfismo protegido puede ser obviada. Existen, por lo tanto, casos en los que los parámetros selectivos sólo deben verificar dos inequaciones.

La restricción del modelo al caso en que los parámetros de selección supergénica sean iguales en ambos sexos permite expresar las condiciones de polimorfismo protegido en función de medias armónicas de los parámetros selectivos que actúan sobre machos y hembras, de forma análoga a como ocurre en los modelos de selección de fertilidad multiplicativa y de selección en viabilidad diferente en sexos. De esta manera, se puede apreciar cómo la selección supergénica igual en sexos actúa como un parámetro selectivo sobre las hembras. Considerando todos los parámetros selectivos del sistema iguales en sexos se obtienen, como caso particular, las ecuaciones de recurrencia y las condiciones de polimorfismo protegido de los modelos de selección supergénica tratados en la literatura.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES EN CORMOS DE AZAFRÁN, *Crocus sativus* L.

Manuel Alvarez-Ortí, Angela Rubio, Lourdes Gómez-Gómez, Julia Pardo, Felicitas Jiménez, Julio Escribano y José Antonio Fernández

Instituto de Desarrollo Regional, Sección de Biotecnología. Campus Universitario s/n. 02071-Albacete

El azafrán, *Crocus sativus* L., es una planta estéril que se reproduce vegetativamente a partir de cormos. El cormo es un tallo subterráneo especializado, cuya misión es acumular sustancias de reserva, para que pueda tener lugar la brotación y floración después de periodos de dormancia. Para tratar de elucidar los complejos mecanismos fisiológicos que envuelven el desarrollo de este órgano, se han generado y secuenciado 800 ESTs a partir de una librería de ADN complementario de cormo de azafrán en diferentes estadios de desarrollo. Los resultados obtenidos muestran claras diferencias en cuanto a la expresión de genes en los distintos estadios. Destaca la elevada expresión de genes implicados en defensa contra patógenos, metabolismo de carbohidratos, proteínas transportadoras y retrotransposones.

TRAZABILIDAD DE ORIGEN GENÉTICO EN PRODUCTOS CURADOS DEL CERDO IBÉRICO.

Alves E., Fabuel E., Fernández A., Barragán C., Rodríguez C., Silió L.

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología.

INIA. Ctra de la Coruña, Km7. 28040 Madrid.

Los productos curados del cerdo ibérico tienen alto valor añadido e importante cotización en el mercado nacional, en el que concurren productos elaborados a partir de animales ibéricos puros y cruzados con *Duroc*. Por ello es importante el desarrollo de técnicas moleculares que permitan identificar el origen genético de la materia prima (trazabilidad) verificando la relación entre producto y tipo genético de procedencia descrito en el etiquetado.

Los alelos del gen MC1R, uno de los reguladores de la pigmentación de la capa, son idóneos como marcadores diagnóstico de este origen racial: alelo MC1R*4 fijado en *Duroc* y alelos MC1R*1 y MC1R*3 presentes en *Ibérico* (Fernández *et al.*, 2001).

En este trabajo se presenta el análisis de ADN genómico extraído de muestras de sangre, lomo fresco y curado durante 3,5 meses, de 8 individuos problema.

Mediante la técnica PCR-RFLP, se identificaron los alelos del gen MC1R y además se genotiparon un panel de 7 microsatélites altamente polimórficos en la población ibérica (8 alelos de media) para confirmar la vinculación de los tres tipos distintos de muestras a un mismo individuo.

En ninguna de las muestras se detectó el alelo MC1R*4 fijado en la raza *Duroc* y todos los genotipos obtenidos reflejan una inequívoca relación entre individuo, carne y producto curado.

Los resultados muestran la posibilidad de extraer ADN a partir de productos curados y analizarlo mediante técnicas moleculares. Además confirman la utilidad de ambos tipos de marcadores como método complementario de control del origen genético en productos ibéricos, uno de los aspectos más importantes de la normativa de calidad de los mismos.

Gip2. UNA NUEVA PROTEÍNA DE *Schizosaccharomyces pombe* RELACIONADA FUNCIONALMENTE CON Gip1, UNA PROTEÍNA ESENCIAL PARA LA DIVISIÓN CELULAR.

Cristina Antúnez, Araceli G. Castillo, Amando Flores y Eduardo R. Bejarano

Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos. 29071 Málaga

Gip1 es una proteína esencial de *S.pombe* conservada en todos los organismos eucarióticos. (Donoso *et al*, en preparación). La represión de la expresión de Gip1 en un mutante condicional produce la acumulación de células con un septo anómalo y dos núcleos con un contenido total de DNA de 2Cc por célula. Si se prolongan estas condiciones las células se terminan bloqueando en el la trancisión G2/M, con un septo y dos núcleos con un contenido total de DNA 4C por célula.

Recientemente, se ha aislado en nuestro laboratorio un nuevo gen, al que hemos denominado *gip2*, por interacción de la proteína que codifica con Gip1 en un análisis de dos híbridos. El análisis de secuencias de DNA muestra que ambas proteínas presentan una homología del 30% y que no existe homólogo de *gip2* en *Saccharomyces cerevisiae*. Gip2 no es esencial, y la disrupción del gen que la codifica no produce ningún efecto en el crecimiento ni en la división celular, aunque parece afectar a la localización de Gip1. Por otra parte, al construir un doble mutante con la disrupción del gen *gip2* y una mutación condicional de *gip1*, los efectos fenotípico producidos por la ausencia de Gip1 se ven incrementados. Estos datos parecen indicar una relación funcional entre ambas proteínas

Miscanthus sinensis ANDERSS COMO PLANTA BIOENERGÉTICA
Atienza SG¹, Ballesteros J¹, Prieto P¹, Hernández P¹, Ramirez MC¹,
Martín LM², Martín A¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) Córdoba

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. UCO.

El género *Miscanthus* Anderss (*Andropogoneae*:*Saccharinae*) tiene un creciente interés en la UE para la producción de energía. Concretamente se utiliza la especie *M.xgiganteus* Greef et Deu., introducida por A.Olsen en Europa en 1935 (1), estando los clones actuales estrechamente relacionados con el que introdujo Olsen (2). No obstante, el contenido en minerales causa problemas en los intercambiadores de calor durante la combustión, disminuyendo la eficiencia energética e incrementando el coste de mantenimiento, por lo que se busca reducir el contenido de minerales de este tipo de plantas. *M.xgiganteus* proviene del cruzamiento de *M.sinensis* (2n=2x=38MM) y *M.sacchariflorus* (Maxim.)Benth. (2n=4x=76, MMM¹M¹)(3,4), siendo un triploide con 2 genomas de *M.sacchariflorus* (MM¹) (si bien el genoma M proviene ancestralmente de *M.sinensis*) y 1 de *M.sinensis* (M)(4,5). Entre los objetivos de la mejora genética de estas plantas está la producción de híbridos poliploides estériles para evitar el escape, con una aportación genómica mayor de *M.sinensis* en el norte de Europa y de *M.sacchariflorus* en el sur, dado el origen y características de estas especies (6). El proyecto BIOMIS estudia *M.sinensis* por su diploidía y su contribución con 2 genomas a *M.xgiganteus*, para mejorar la calidad de combustión. Los objetivos son estudiar la genética de los caracteres relacionados con la calidad de combustión, realizando el mapa genético de una población segregante y localizando loci para caracteres cuantitativos (QTLs) que permitan la identificación de marcadores para la selección de genotipos adecuados.

1. Nielsen, PN. 1990. Elefantengrassanbau in Dänemark-Pratikerbericht. Pflug und Spaten 3. 1-4. Citado en Greef & Deuter (1993).

2. Greef JM, Deuter M, Jung C, Schondelmaier J. (1996). Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. Genetic Resources and Crop Evolution 44, 185-195.

3. Greef JM, Deuter M, (1993). Syntaxonomy of *Miscanthusxgiganteus* GREEF et DEU. Angew. Bot. 67. 87-90.

4. Linde-Laursen, IB. (1993). Cytogenetic analyses of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. Hereditas 119: 297-300.

5. Adati S, Shiotani I. 1961. The cytotaxonomy of the genus *Miscanthus* and its phylogenic status. Bull. Fac. Agr. Mie Univ. 25:1-24.

6. Deuter M, Abraham J., 1998. Genetic resources of *Miscanthus* and their use in breeding. Biomass for Energy and Industry. Proceedings of the International Conference Würzburg. 8-11 June. 775-777.

ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA TRANSLOCACIÓN ESPONTÁNEA
ENTRE CROMOSOMAS A Y B DEL SALTAMONTES
EYPREPOCNEMIS PLORANS

M. Bakkali, J. Cabrero y J. P. M. Camacho

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,
18071, Granada, España
E-mail: mbakkali@ugr.es

Un macho de *E. plorans* capturado en una población marroquí era portador de una translocación recíproca espontánea entre el autosoma A_4 y el cromosoma supernumerario B_{M8} . Mediante las técnicas de bandeo C y doble FISH localizamos los puntos de rotura en el tercio distal de A_4 y en la frontera entre el ADN repetitivo y el ADN ribosómico distal de B_{M8} . La técnica de impregnación argéntica no reveló cambio alguno en el estado inactivo del ADNr propio del B localizado tanto en éste como en el autosoma.

Hemos realizado un análisis del comportamiento meiótico de los cromosomas implicados en la translocación, así como un análisis de las progenies de un macho portador apareado con varias hembras. Durante cigotene y paquitene, los cromosomas A_4 , A_4 - B_{M8} y B_{M8} - A_4 formaban un trivalente, y la inmensa mayoría de las metafases I estudiadas (115/118) mostraban quiasmas tanto en el segmento intersticial como en el de apareamiento. Las tres metafases I restantes mostraban un bivalente (A_4 / B_{M8} - A_4) y un univalente (A_4 - B_{M8}), debido a la ausencia de quiasmas en el segmento intersticial. El análisis de las 6 progenies obtenidas reveló que la translocación conlleva una alta mortalidad en las etapas embrionarias anteriores a los 11 días de incubación, pero no en etapas posteriores. Además, los embriones homocigóticos normales y los heterocigóticos para la translocación muestran viabilidad similar hasta los 11 días de incubación. Por otra parte, la monosomía para la región distal del cromosoma A_4 es letal, mientras que la trisomía de esta región no parece afectar a la viabilidad embrionaria en el periodo analizado. Por su parte, la trisomía de la región proximal de A_4 tampoco parece afectar a la viabilidad embrionaria, y la existencia de 4 embriones con esta trisomía sugiere que los cromosomas A_4 y A_4 - B_{M8} segregan hacia el mismo polo a una frecuencia muy baja (1.7%), a pesar de que esta orientación meiótica no fue observada.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ADN SATÉLITE EN ESPECIES DEL GÉNERO *Pteropus*

María José L. Barragán, Sergio Martínez, Juan Alberto Marchal,
Mónica Bullejos, Rafael Díaz de la Guardia¹, Antonio Sánchez

Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén. ¹Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Mediante digestiones del ADN genómico de tres especies de murciélagos del género *Pteropus* (*P. scapulatus*, *P. poliocephalus* y *P. alecto*) con *PstI* hemos aislado, clonado y secuenciado una familia de ADN satélite específica de este género. Este satélite está organizado en tándem y presenta una unidad de repetición de 744pb. La secuencia consenso tiene un porcentaje de G-C del 54,97%, hecho especialmente llamativo por cuanto los ADN satélites suelen ser ricos en A-T y porque precisamente el genoma de las especies del género *Pteropus* es especialmente rico en A-T. Los clones secuenciados presentaban un alto grado de identidad variando dentro desde 96 al 98%. Encontrándose que las sustituciones de bases se distribuyen de forma aleatoria en todas las secuencias en relación con la secuencia consenso.

Este repetitivo presenta como media 4 secuencias diana para los isoesquizómeros *MspI* y *HpaII*. Este hecho nos ha permitido determinar mediante Southern blot que existe una fuerte metilación de este repetitivo, si bien, dicha metilación no afecta por igual a todas las secuencias CCGG presentes en el mismo.

El análisis filogenético mediante el método de Neighbor-Joining usando como distancia el parámetro Kimura-2, permitió obtener un árbol en el que las monómeros pertenecientes a las distintas especies están perfectamente separados en ramas diferentes con valores de bootstrap del 99% y 100%.

¿CUÁL ES LA REGIÓN DEL PROMOTOR DE BETL-1 NECESARIA PARA SU TRANSACTIVACIÓN POR EL GEN DE TIPO MYB ZmMRP-1?

Cristina Barrero, Joaquín Royo y Gregorio Hueros

Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Madrid. E-28871. gregorio.hueros@uah.es

Las células de transferencia situadas en la base del endospermo controlan la entrada de nutrientes en la semilla en desarrollo de los cereales. Por consiguiente, su actividad puede determinar en gran medida el rendimiento de las cosechas. Como aproximación al estudio del desarrollo y función de estas células, hemos realizado varios “screening” diferenciales.

El gen ZmMRP-1 fue identificado en una de estas búsquedas. Se expresa exclusivamente en las células de transferencia y codifica para una proteína que contiene un dominio de unión a DNA tipo myb. Experimentos de cotransformación en protoplastos de tabaco demuestran que ZmMRP-1 es capaz de transactivar (hasta 80 x la actividad basal) al gen delator GUS situado bajo el control del promotor de BETL-1, otro gen específico de este tejido no relacionado con ZmMRP-1. El promotor de BETL-1 es completamente inactivo en este sistema en ausencia de ZmMRP-1. Hemos delimitado dentro del promotor de BETL-1 la región mínima necesaria para que se produzca la trans-activación por ZmMRP-1. Para ello, utilizamos una serie de deleciones de este promotor fusionadas al gen delator GUS y medimos la actividad del gen delator en ensayos de cotransformación en protoplastos de tabaco.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES DE *Arabidopsis thaliana* IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

**José María Barrero, Pedro Piqueras, Víctor Quesada,
María Rosa Ponce y José Luis Micol**

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Con la intención de contribuir a la resolución del problema agronómico que supone la salinización progresiva de las tierras de regadío, hemos aislado 17 estirpes mutantes del sistema modelo *Arabidopsis thaliana*, capaces de germinar en presencia de altas concentraciones salinas. Su análisis de complementación nos ha permitido establecer que corresponden a 5 genes, a los que hemos denominado *SALOBREÑO1* a *5* (*SAÑ1* a *5*). Hemos establecido que la mutación *sañ5* es un alelo nulo del gen *ABI4*, cuyo producto es un factor de transcripción que participa en la ruta de transducción de la señal del ácido abscísico (ABA), una fitohormona implicada en las respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés ambiental.

La cartografía de baja resolución de los alelos mutantes *sañ1* permitió asignarles una posición en el cromosoma 5, a 7,3 cM del microsatélite MBK5. Se consideró candidata una región de 2 Mb, dentro de la cual se identificaron cinco nuevos marcadores moleculares, mediante la elección de regiones ricas en repeticiones cortas, cuyo polimorfismo se comprobó tras el diseño y síntesis de oligonucleótidos a partir de las secuencias que flanqueaban a cada presunto microsatélite. Tras analizar 878 plantas fenotípicamente mutantes de la F₂ de varios cruzamientos entre individuos *sañ1/sañ1* y un ecotipo distinto de su ancestro silvestre, se acotó una región representada en los insertos parcialmente solapantes de cuatro clones BAC. La secuenciación de genes candidatos permitió establecer que las mutaciones *sañ1* afectan al gen *ABAI*, cuyo producto proteico, la zeaxantina epoxidasa, participa en la ruta biosintética del ABA.

Con el fin de determinar la naturaleza estructural de los genes *SAÑ3* y *SAÑ4*, estamos siguiendo una estrategia posicional similar a la que nos ha permitido identificar a *SAÑ1*.

EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS DE LOS
GÉNEROS *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y
Zygosaccharomyces.

**Eladio Barrio¹, Carmela Belloch², M^a Teresa Fernández-Espinar³ y
Amparo Querol³**

¹ Instituto “Cabanilles” de Biodiversidad y Biología Evolutiva, y
Departamento de Genética, Universidad de Valencia.

² Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia.

³ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia.

Recientes métodos moleculares aplicados a la sistemática de levaduras han mostrado que los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* de la familia Saccharomycetaceae son polifiléticos, es decir, la clasificación de las especies en géneros no refleja sus relaciones filogenéticas.

En el presente estudio se analiza la filogenia de las especies pertenecientes a esos géneros en base a secuencias de distintos genes y regiones tanto nucleares (genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S, regiones espaciadoras transcritas ITS1 e ITS2) como mitocondriales (cox2, subunidad 2 del complejo de la citocromo c oxidasa), así como en base a los datos disponibles de otros marcadores moleculares (cariotipos electroforéticos, presencia de genes parálogos, análisis de sintenia, etc.).

A partir de esta información se discute distintos aspectos de la evolución de estas especies de levaduras, desde la sistemática molecular basada en las reconstrucciones filogenéticas, a los procesos de evolución molecular de los genomas de estas especies, o los mecanismos de especiación involucrados en la generación de la diversidad levaduriforme.

CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN *DAX-1* DE *Talpa occidentalis*

Francisco Barrionuevo Jiménez, Federico Zurita Martínez y Rafael Jiménez Medina y Miguel Burgos Poyatos

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
18071 Granada

DAX1 es un gen ligado al sexo que está implicado en la diferenciación y determinación del sexo en mamíferos. Su patrón de expresión en ratón y la reversión sexual que sufren los humanos XY con duplicación de *DAX1*, han sugerido que este gen puede tener un papel inhibitor de la diferenciación testicular. En la secuencia de *DAX1* existe un dominio que codifica una región de unión al DNA (DBD) y un dominio similar al de los receptores nucleares de hormonas (LBD). La región DBD de humanos y ratón consta de cuatro repeticiones incompletas.

En los topos del género *Talpa*, todas las hembras de las especies analizadas hasta el momento poseen ovotestes en lugar de ovarios. Estas hembras son fértiles, y sus gónadas presentan una gran porción de tejido testicular disgenésico adyacente a una región de tejido ovárico normal.

Hemos clonado y secuenciado un fragmento de 355 pares de bases del gen *DAX1* de *T. occidentalis*. El análisis de este fragmento reveló una alta homología con las dos últimas repeticiones del dominio DBD de otras especies de mamíferos. Comprobamos además que la homología observada entre las dos repeticiones de la misma especie era menor que la de cualquiera de ellas con sus homeólogas de otras especies. Esto demuestra que el origen de estas duplicaciones es anterior a la separación de los grupos taxonómicos comparados.

Los estudios de expresión realizados por RT-PCR demuestran que en las gónadas de los machos dicha expresión comienza en el estadio E-4, cuando aparecen los primordios gonadales indiferenciados, y termina alrededor del nacimiento, cuando los testículos están completamente formados. En las hembras, la expresión comienza asimismo en E4, pero se prolonga más allá del nacimiento, durante todo el período de lactancia, cuando se forma el tejido testicular de los ovotestes. Estos hechos demuestran que, al menos en el topo, el gen *DAX1* no tiene un efecto "antitesticular".

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *AVENA MURPHYI* EN ESPAÑA Y MARRUECOS

Benchacho, M.^{1,2}; **García García P.**²; **Pérez de la Vega M.**²

¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Marruecos

² Área de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León, España

Avena murphyi Ladiz. ($2n=4x=28$) es una especie anual que muestra una distribución muy restringida en la provincia de Cádiz, cuenca del río Barbate y Sierra de Grazalema en España, y cercanías de Tánger en Marruecos. Crece en pastizales sobre suelo arcilloso profundo, pero este tipo de hábitats está desapareciendo rápidamente debido a su utilización para cultivos, por lo que existe un peligro de extinción real para la misma.

Actualmente se dispone de muestras de *A. murphyi* procedentes de 11 lugares (5 en Marruecos y 6 en España), aunque se pueden encontrar más poblaciones en Marruecos.

El análisis de 9 sistemas isoenzimáticos ha mostrado la presencia de un nivel alto de variabilidad dentro y entre poblaciones de Marruecos, mientras que la variabilidad es muy reducida dentro de las poblaciones españolas, siendo la mayoría de ellas prácticamente uniformes. Además de los patrones isoenzimáticos encontrados en las poblaciones españolas de *Avena murphyi*, se han descrito nuevos alelos para los loci *Mdh1* y *Mdh2* en las poblaciones marroquíes.

Esta información es básica a la hora de establecer programas de mejora y conservación de esta especie, clasificada como vulnerable en el Catálogo Andaluz de especies de flora silvestre amenazada.

CONSTRUCCIÓN DE UNA COLECCIÓN DE CEPAS DELETANTES DE LEVADURA PARA ANÁLISIS FENOTÍPICO CUANTITATIVO

R. Benito, C. Vilariño, JL Revuelta.

Departamento de Microbiología y Genética. CSIC/Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca. E-mail: revuelta@gugu.usal.es

La determinación de la secuencia completa del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha permitido identificar más de 6000 fases de lectura abierta (ORFs), la mitad de las cuales no poseen función celular conocida. La disrupción génica es una aproximación muy eficaz a la hora de determinar la función biológica de una ORF no caracterizada.

En *Saccharomyces cerevisiae* es posible construir una disrupción génica precisa (del codon de inicio al codon de paro) e inferir la función génica a través de la respuesta de la cepa disruptante a una variedad de condiciones de crecimiento selectivas (segundas mutaciones, drogas o condiciones de estrés). La disrupción precisa de los genes de la levadura se realiza mediante reemplazamiento génico con moléculas lineales de ADN exógeno generadas por PCR. En una única etapa, mediada por recombinación homóloga se reemplaza la secuencia diana genómica y se permite la selección directa de los transformantes.

La aplicación de esta estrategia a nivel del genoma completo requiere en primer lugar la construcción sistemática de una serie de mutantes nulos en un único ORF y su marcaje específico con una etiqueta molecular que permita su posterior identificación y cuantificación en una mezcla compleja.

En la construcción de esta colección se utilizan cassetes construídos por PCR que contienen el módulo de resistencia a geneticina flanqueado por dos secuencias idénticas a las de la secuencia genómica que va a ser sustituida y dos secuencias de 20 nucleótidos específicas para cada reemplazamiento, que constituyen la etiqueta molecular.

Cada disrupción queda marcada por dos secuencia únicas, como un código de barras, que permite mediante la hibridación a un "chip" de DNA su identificación en una población compleja de disruptantes. Los deletantes construídos son entonces analizados en paralelo en determinadas condiciones selectivas de crecimiento, de forma que el nivel en que cada cepa sobrevive puede ser determinado gracias a la tecnología de los "chips" de DNA.

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA RAPD-PCR AL ESTUDIO DE SEIS POBLACIONES DE CANGREJO DE RÍO *AUSTROPOTAMOBIVS PALLIPES* (LEREBoulLET, 1858) ESPAÑOLAS.

Beroiz, B.⁽¹⁾, Alonso, F.⁽²⁾, Ochando, M.D.⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento Genética. Fac. CC. Biológicas. Universidad Complutense. 28040-Madrid.

⁽²⁾Centro de Investigación Agraria Albaladejito. Servicio de Investigación Agraria. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Crta. Toledo-Cuenca km.174. 19164-Cuenca.

El cangrejo de patas blancas *Austropotamobius pallipes* es la única especie de cangrejo de río autóctona que existe en nuestro país. Esta especie juega un papel primordial en nuestros ecosistemas fluviales, pero a pesar de su importancia, desde finales de los 70 hasta la actualidad sus poblaciones se han visto reducidas drásticamente por diversas causas (afanomicosis, introducción de cangrejos exóticos, alteración del hábitat) por lo que actualmente se encuentra amenazada.

Hasta el momento son muy escasos los estudios genéticos en esta especie, la mayoría de ellos basados en la electroforesis isoenzimática y en el análisis de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial.

En el presente trabajo hemos realizado un análisis de la estructura genética de seis poblaciones, de diferentes zonas geográficas, mediante el uso de la técnica RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar) utilizando ocho oligodecámeros de las series A y C de Operon (Operon Technologies Inc.). El tejido empleado ha sido el músculo de pinza, que los individuos regeneran tras su amputación, a fin de evitar el sacrificio de los animales.

Los resultados que hemos obtenido indican que, contrariamente a lo esperado y a pesar de la regresión de estas poblaciones, todavía conservan un cierto grado de variabilidad genética. La información proporcionada por este tipo de trabajos, sobre variabilidad genética del cangrejo de río, resulta de utilidad básica para diseñar programas de recuperación de esta especie, tan importante en nuestros ecosistemas fluviales.

HIR EN *Escherichia coli*: ¿UNA REPLICACIÓN DE ESTRÉS EXCLUSIVAMENTE CROMOSÓMICA O COMÚN A OTROS REPLICONES?

Emilia Botello y Alfonso Jiménez Sánchez

Area de Genética. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura. 06080-Badajoz.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han establecido y caracterizado la existencia en *Escherichia coli* de una replicación fuera del control del ciclo celular que es inducida por estrés térmico (HIR, *heat induced replication*. Botello, E. y A. Jiménez-Sánchez, Mol. Microbiol. 26:133-144, 1997). Esta replicación ha sido detectada y estudiada en el cromosoma de *Escherichia coli*.

En el presente trabajo se determina si HIR tiene lugar también en minicromosomas (plásmidos con el origen de replicación del cromosoma, *oriC*) y varios plásmidos con orígenes de replicación diferentes tanto estructural como funcionalmente (R1, RSF1010, ColE1). Para el desarrollo del trabajo se utilizan como metodologías específicas: aislamiento y purificación de DNA, marcaje radiactivo del DNA *in vivo* y su cuantificación, electroforesis de DNA y análisis de imágenes. Los resultados obtenidos permitirán establecer a HIR como una respuesta de estrés específica del cromosoma o de su origen (*oriC*) o como un mecanismo más general de replicones bacterianos.

INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN LA LEVADURA *DEBARYOMYCES HANSENI*.

J.Botet, M.A. Santos, J.L. Revuelta.

Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. e-mail: revuelta@gugu.usal.es

El ácido fólico es una vitamina esencial del grupo B, de gran importancia económica al ser utilizada como aditivo en nutrición humana y animal. Está implicado en procesos biológicos críticos como la formación de células sanguíneas, la división celular y el metabolismo proteico.

Entre otros efectos sobre la salud, el ácido fólico reduce el riesgo de malformaciones del tubo neural, tales como la espina bífida. Igualmente se ha demostrado que esta vitamina reduce los niveles de homocisteína y, por tanto, disminuye los riesgos de infarto y de padecer enfermedades coronarias. También, se ha podido asociar la deficiencia en ácido fólico con un mayor riesgo de desarrollar tumores de colon, páncreas y mama, así como lesiones precancerosas de cervix.

Actualmente la producción de ácido fólico se realiza exclusivamente mediante síntesis química. Este método convencional utiliza reactivos caros y el rendimiento del producto es muy bajo; motivos por los que métodos alternativos de producción mediante fermentación con microorganismos tienen una gran ventaja ambiental y económica.

Algunas especies de levaduras, como *Debaryomyces hansenii*, poseen un metabolismo purinogénico muy activo, propiedad que ha sido explotada por la industria para la producción por fermentación de derivados purínicos con propiedades saborizantes.

El ácido fólico tiene como precursor biosintético el GTP, por lo que cepas de *Debaryomyces hansenii* con un incremento en la síntesis de purinas y por tanto de GTP, podrían ser modificadas genéticamente para redirigir el exceso de GTP hacia la producción de ácido fólico. En esta línea, nuestros trabajos están encaminados hacia la caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de ácido fólico en la levadura *Debaryomyces hansenii* con el fin de realizar las modificaciones genéticas apropiadas para el desarrollo de cepas que presenten mayores niveles de producción de esta vitamina.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN *SRY* EN MACHOS DE *Talpa occidentalis*

Miguel Burgos Poyatos, Federico Zurita Martínez, Francisco Barrionuevo Jiménez y Rafael Jiménez Medina

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.

En los embriones XY de mamíferos, la expresión del gen *SRY*, localizado en el cromosoma Y, induce la diferenciación testicular en sus primordios gonadales indiferenciados. En ausencia de *SRY* (individuos XX), tales primordios gonadales se diferencian como ovarios. En consecuencia, determinación del sexo y determinación testicular son términos equivalentes en mamíferos. La secuencia y el patrón de expresión del gen *SRY* han sido investigados en un buen número de especies de mamíferos. Estos estudios han demostrado que este gen sólo está altamente conservado en su dominio HMG y que se expresa de forma muy dispar en distintas especies. Así, en el ratón lo hace durante un corto lapso de tiempo, que coincide con el proceso de diferenciación testicular, mientras que en otros euterios, incluidos los humanos, y en algunos marsupiales lo hace durante un tiempo mas largo, que siempre incluye el momento de la diferenciación sexual, pero que es muy variable entre especies.

En esta comunicación presentamos los resultados de un estudio sobre el perfil de expresión (RT-PCR) del gen *SRY* en el topo ibérico *Talpa occidentalis*, especie en la que previamente hemos clonado y caracterizado un fragmento de este mismo gen. La expresión se inicia en los primordios gonadales indiferenciados de los embriones XY durante el estadio E4, 3-4 días antes de que se produzca la diferenciación testicular de tales órganos. Tal expresión continúa desde entonces durante todo el periodo de desarrollo prenatal y postnatal de machos de topo, y se alarga incluso a la vida juvenil de estos animales, hasta 4-6 meses tras el nacimiento. Teniendo en cuenta las diferencias de longevidad entre especies, se trata por tanto del periodo de expresión del gen *SRY* más prolongado que se ha descrito. Este hecho apoya claramente la idea de que la expresión de este gen fuera de su período sensitivo (la determinación testicular), probablemente no tenga ninguna función específica. Por tanto, es necesario que este gen esté activo durante su período sensitivo, pero no es importante cuando se activa o cuando se silencia, siempre que lo haga antes y después de tal período, respectivamente.

LA METILACIÓN DAM Y LA PROTEÍNA DE RESPUESTA A LA LEUCINA (LRP) REGULAN LA CONJUGACIÓN BACTERIANA

E. M. Camacho y J. Casadesús

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

La metilación Dam y la proteína Lrp regulan la transferencia del episoma F y de otros plásmidos conjugativos, como pSLT y R100. La proteína Lrp es un regulador positivo de la conjugación. Lrp activa la transcripción del gen *traJ*, uniéndose a una región situada corriente arriba del promotor. El producto del gen *traJ* es un activador transcripcional del operón de transferencia (operón *tra*). En los mutantes Lrp⁻, la transcripción de *traJ* disminuye y ello ocasiona una disminución de la frecuencia de conjugación. La metilación Dam actúa como un represor de la conjugación, pero a nivel molecular es un regulador positivo. La metilación Dam activa la síntesis de un inhibidor de la conjugación, el ARN antisentido FinP, que inhibe la traducción del ARNm de *traJ*. En mutantes Dam⁻ hay menor cantidad de ARN FinP, y por tanto mayor síntesis de TraJ. Ello aumenta la transcripción del operón *tra* y, como consecuencia, la frecuencia de conjugación. Pese a que el promotor de *finP* tiene un sitio GATC solapado con el módulo -10, la metilación Dam no regula directamente la transcripción de dicho promotor. Es concebible que la metilación Dam regule la síntesis de un regulador transcripcional de *finP*. La delección de la región 5' del promotor *finP* no elimina la dependencia de la metilación Dam para la síntesis de ARN FinP, lo que sugiere que el hipotético regulador actúa en el propio promotor *finP* o corriente abajo del mismo. Tanto la proteína Lrp como la metilación Dam son reguladores "globales" de la célula bacteriana; por tanto, podrían regular la transferencia conjugativa de plásmidos como respuesta a señales fisiológicas o ambientales.

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DEL PATRÓN VASCULAR EN LAS HOJAS DE *Arabidopsis thaliana*

Héctor Candela^{1,2}, Antonio Martínez-Laborda¹ y José Luis Micol^{1,2}

¹División de Genética e ²Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Con el propósito de contribuir a desentrañar las operaciones genéticas responsables de la formación de los patrones de venación foliares en las plantas, hemos analizado su variabilidad natural en las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana*. También hemos realizado una búsqueda de mutantes que presentasen patrones de venación anormales en hojas por lo demás normales, inducidos mediante mutagénesis química o insercional. La infrecuencia de estos mutantes sugiere que la morfogénesis foliar y la formación del patrón vascular son procesos mutuamente dependientes. Para contrastar esta hipótesis, hemos estudiado 97 mutantes con morfología foliar anormal, pertenecientes a otros tantos grupos de complementación, identificando 2 cuyo patrón de venación es claramente distinto del silvestre. Hemos concentrado nuestra atención en uno de ellos, *rotundal* (*ron1*), y en un rasgo monogénico y recesivo, *hemivenata* (*hve*), que manifiesta el ecotipo Ei-5. El fenotipo Hve es pleiotrópico, caracterizándose por una venación foliar muy simple, una inflorescencia muy ramificada y poca fertilidad. Hemos obtenido los dobles mutantes de *hve* con mutaciones en loci implicados en el desarrollo vascular y en la percepción o el transporte de las auxinas, como *lop1*, *pin1*, *axr1*, *mp*, *cyp2*, y *ron1*. El análisis del ligamiento a marcadores moleculares nos ha permitido circunscribir a unas 200 kb del brazo corto del cromosoma 2 la región en la que presuntamente radica *HVE*. Estamos llevando a cabo una cartografía fina de esta región y la caracterización estructural de varios genes candidatos, a fin de determinar la naturaleza molecular de *HVE*.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA FUNCIÓN IgaA DE *Salmonella enterica*

David A. Cano¹, M. Graciela Pucciarelli², Francisco García del Portillo² y Josep Casadesús¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Sevilla. ²Departamento de Biotecnología Microbiana (Centro Nacional de Biotecnología)

Salmonella enterica no prolifera en el interior de ciertos tipos celulares "no permisivos", como los fibroblastos NRK. El aislamiento de mutantes de *Salmonella* que proliferan en el interior de fibroblastos ha revelado que el autocontrol del crecimiento es una respuesta mediada por el propio patógeno. En dicha respuesta intervienen reguladores de la virulencia como PhoP, RpoS, SlyA y SpvR. El escrutinio también proporcionó un mutante que llevaba una mutación en un gen de *S. enterica* sin función conocida. A este gen le hemos llamado *igaA* (de "intracellular growth attenuation"). La mutación *igaA1* es pleiotrópica, lo que indica que el gen *igaA* participa en diversas funciones celulares. Además de proliferar activamente en fibroblastos NRK, el mutante IgaA⁻ es avirulento en el modelo animal del ratón, superproduce polisacárido capsular debido a un aumento en la expresión de los genes que sintetizan ácido colánico, y disminuye la expresión de FlhDC, un regulador de la síntesis de flagelos. Además, la proteína IgaA debe participar en algún proceso esencial para la célula bacteriana, ya que una mutación *igaA* nula es inviable. La búsqueda de mutaciones supresoras de los fenotipos del mutante IgaA⁻ ha revelado que la regulación génica mediada por *igaA* debe producirse a través del sistema de dos componentes RcsB/RcsC: Todos los fenotipos del mutante IgaA⁻ necesitan un sistema RcsB/RcsC activo. La predicción *in silico* de la estructura secundaria de la proteína IgaA sugiere que podría ser una proteína de membrana con al menos cinco dominios transmembrana; por tanto, podría intervenir en la detección de alguna señal extracelular.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN REGULADO POR pH AMBIENTAL EN *FUSARIUM OXYSPORUM* Y DETERMINACIÓN DE SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS

Zaira Caracuel Ríos, Clara González Verdejo, , M. Isabel G. Roncero, Antonio Di Pietro

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba, España

Muchos microorganismos, que viven en ambientes con pHs variables, disponen de sistemas de regulación para sintetizar determinadas moléculas únicamente cuando el rango de pH externo es adecuado. En los hongos *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*, dicha regulación se lleva a cabo mediante PacC, un factor de transcripción con dedo de zinc que se activa mediante proteólisis a pH alcalino. Para estudiar el papel de la regulación génica por pH ambiental en la patogénesis fungica, se ha aislado el ortólogo de *pacC* del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. El nivel de expresión de *pacC* es mínimo a pH ácido y máximo a pH alcalino, independientemente de la fuente de carbono utilizada. Para elucidar la función de PacC se han construido dos plásmidos, uno de ellos portador de un alelo de *pacC* interrumpido por el marcador de resistencia a higromicina, y el otro portador de un alelo truncado del gen (supuestamente constitutivo). Entre los transformantes de *F. oxysporum* portadores del alelo interrumpido se identificaron dos integrativos por recombinación homóloga, donde el alelo silvestre quedó reemplazado por el mutado. Dichos mutantes son incapaces de crecer a pH alcalino e hipersensibles a neomicina. El análisis de hibridación Northern reveló la ausencia del transcrito *pacC* en los mismos. La inactivación de *pacC* no altera la capacidad de infectar plantas de tomate. Los transformantes de *F. oxysporum* portadores del alelo *pacC* truncado (supuestamente constitutivo) muestran mayor nivel de resistencia a neomicina que el silvestre. Actualmente se está estudiando, mediante análisis Northern, el patrón de expresión de los genes responsables de *pacC* y de diferentes enzimas líticas en estos mutantes y en la estirpe silvestre.

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL ADN SATÉLITE EN *Aphaenogaster subterranea* (HYMENOPTERA, FORMICIDAE).

P. Lorite¹, S. Renault², F. Rouleux-Bonnin², S. Bigot², J.A. Carrillo¹, G. Periquet² y T. Palomeque¹.

1. Área de Genética, Dept. Biología Experimental. Universidad de Jaén. 23071 Jaén. E-mail: plorite@ujaen.es
2. IRBI. UFR Sciences et Techniques. Parch Grandmont. 37200 Tours. Francia.

Se ha aislado y caracterizado una familia de ADN satélite (APSU) en la hormiga *Aphaenogaster subterranea*. Este ADN satélite, formado por la repetición de unidades de 162 pb, es relativamente rico en AT y presenta repeticiones internas directas e invertidas con la consiguiente existencia de palíndromos. Presenta también “clusters” de dA o dT cuyo número es superior o igual a 3, datos que sugieren la existencia de curvatura. Sin embargo, el estudio de la movilidad electroforética en geles no desnaturizantes de poliacrilamida, parece indicar su ausencia. Este ADN no está metilado tal como se deduce de las digestiones con los isoesquizomeros *MspI/HpaII* y *Sau3A/NdeII*.

La cuantificación en diferentes estadios de desarrollo, demostró la existencia de procesos de reducción en la cantidad de ADN satélite asociados a la diferenciación en castas, ya que las pupas de reinas presentan sólo un 25% de la cantidad presente en pupas de obreras.

Para determinar si este ADN se transcribe, se ha realizado reverso transcripción del ARN total extraído en obreras y reinas en estadio de desarrollo, así como en obreras adultas. Para ello se utilizaron cebadores diseñados a partir de las dos cadenas del ADN satélite. Los productos obtenidos fueron amplificados por PCR usando los mismos cebadores y posteriormente, hibridados con sondas de ADN satélite. Los resultados obtenidos indican que la transcripción se produce en ambas hebras de ADN, y que el ADN satélite se transcribe en la misma proporción en individuos en desarrollo y en obreras adultas

Castillo, R., Álvarez, M., Rubio, A., Gómez, L., Fernández, J.A.
Instituto Desarrollo Regional, Sección Biotecnología.
Campus Universitario s/n, 02071, Albacete.

Entre los mecanismos de defensa utilizados por las plantas ante el ataque de patógenos, se encuentra la síntesis y expresión de las llamadas proteínas PR (pathogenesis-related proteins). dentro de este grupo se incluyen las quitinasas. Se trata de un grupo de enzimas hidrolíticas ampliamente distribuido, no sólo en plantas sino también en bacterias, hongos y varios grupos animales incluido el hombre. Actualmente, en plantas, las quitinasas se han clasificado en seis tipos según su estructura primaria.

En la planta del azafrán la parte más susceptible al ataque de patógenos es el cormo por ser este un órgano subterráneo. Nuestro grupo ha construido una librería de expresión a partir de cormos de azafrán recolectados en los meses de febrero y marzo, a partir de la cual se aisló un gen (cac 15) cuya secuencia presenta un alto grado de homología con las quitinasas de tipo I. El patrón de expresión de esta proteína en cormos correspondientes a distintas estaciones del año, su expresión en otros órganos de la planta (raíz, tallo, hojas y flor) así como su actividad antifúngica "in vitro" están siendo investigados en este momento.

Identificación de proteínas celulares de plantas que interactúan con el virus TYLCV

Araceli G.Castillo¹, D. Colinet, J². Reina, I³. Donoso¹, MC Muñoz¹, A. Kashoggi² y E.R. Bejarano¹

1. Departameto de Genética. Universidad de Málaga. Málaga (edu_rodri@uma.es)
2. Gentech. Sophia Antipolis. Biot. Francia
3. EMBL. Heidelberg. Alemania

Los Geminivirus son una familia de virus vegetales que infectan una gran variedad de plantas causando grandes pérdidas en cosechas de todo el mundo. Estos virus se caracterizan por tener una cápside formada por dos subunidades icosaédricas y un genoma circular de DNA de cadena sencilla. Para completar su ciclo de vida los geminivirus requieren, además de las proteínas codificadas por sus genes, proteínas celulares de la planta.

Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) es un geminivirus transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y que infecta principalmente a tomate, judía y pimiento. Su genoma de 2.7kb, codifica para seis proteínas: Rep, C2, C3, C4, V1 y V2. Hemos realizado una búsqueda de proteínas celulares que interactúen con las distintas proteínas virales de TYLCV. Para ello hemos utilizado el sistema del doble híbrido (Two-hybrid system) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se han clonado las seis proteínas del virus en vectores del sistema, y se ha realizado búsquedas en genotecas de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* y *Nicotiana benthamiana*. Se expondrán los resultados de estas búsquedas, y la caracterización de dos de los clones (Ubc9 y PCNA) hallados por su interacción con las proteínas virales implicadas en la replicación del DNA del virus.

APAREAMIENTO Y FERTILIDAD EN LOS HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES I Y II DE *DROSOPHILA SUBOBSCURA*

Castro, J.A.; Oliver, P.; Christie, J.S.; Picornell, A.; Ramon, M.M.; Moya, A.*

Laboratori de Genètica. Departament de Biologia. Universitat de les Illes Balears. *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica. Universitat de València.

Estudios previos de poblaciones europeas y americanas de *Drosophila subobscura* han constatado la existencia de dos haplotipos mayoritarios y casi equifrecuentes (I y II), que se diferencian por un cambio sinónimo en la subunidad NADH5 del gen NADH mitocondrial, así como una serie de haplotipos menos frecuentes, derivados de los dos anteriores, que no sobrepasan el 5%. Con la excepción de las Islas Canarias, donde un haplotipo endémico es el más frecuente en algunas islas. En el presente trabajo hemos analizado las posibles diferencias de apareamiento y de fertilidad para los haplotipos I y II de una muestra de la Isla de Mallorca, como una aportación más en la comprensión de la dinámica poblacional de estos haplotipos. Los apareamientos formados se analizaron aplicando los índices de selección y aislamiento sexuales clásicos, así como los estadísticos descritos por Rolán-Alvarez y Caballero (*Evolution*, 54: 30-36 (2000)). Los índices de selección sexual no fueron significativos, pero todos los índices de aislamiento sexual mostraron la existencia de un apareamiento diferencial entre los dos haplotipos, con preferencia a formar parejas entre individuos del mismo haplotipo. El índice total de apareamiento (PTI) fue altamente significativo entre los individuos del haplotipo I. Sin embargo, estos estadísticos no proporcionan información de las posibles causas biológicas que están actuando. Por otra parte, analizando la descendencia de cada pareja, considerando que los componentes de la fertilidad son, principalmente, la fecundidad de las hembras y el éxito de apareamiento de los machos, no se detectaron diferencias de fertilidad entre las diferentes parejas formadas. Estos resultados, junto con otros experimentos que estamos actualmente llevando a cabo, hacen pensar en un fenómeno complejo de selección que equilibraría las frecuencias de los dos haplotipos, sin descartar fenómenos más complejos de interacción citonuclear, también selectiva y de arrastre genético; es decir, se podría tratar de un caso complejo de evolución de caracteres.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE TRANSLOCACIONES QUE IMPLICAN AL CROMOSOMA 1R DE CENTENO *Secale cereale* L.

Susana Catarino², Francisco Lacalle¹, Agustín Roca¹, Rita Clemente², Ramón Giráldez¹

(1) Área de Genética, Dpto. Biología Funcional, Universidad de Oviedo,

(2) Departamento de Botánica, Universidade de Coimbra.

En la Universidad de Oviedo se está obteniendo una colección de translocaciones en centeno, mediante la irradiación con rayos X de una línea marcada específicamente con bandas de heterocromatina-C telomérica que permite distinguir y seleccionar todas las translocaciones obtenidas en las que uno de los cromosomas implicados es el 1R.

En el presente trabajo se analizan los complejos sinaptonémicos de células en paquítena de heterocigotos para translocaciones pertenecientes a la citada colección, así como los índices centroméricos y el patrón de bandas-C (mitosis) de los cromosomas implicados en tales translocaciones, con objeto de determinar la situación relativa de los correspondientes puntos de translocación dentro del cromosoma 1R. Los resultados obtenidos con 24 translocaciones diferentes indican la existencia de una distribución no homogénea de los puntos de translocación a lo largo del cromosoma: la gran mayoría de los puntos de translocación están situados en el brazo corto.

Por otra parte, la comparación entre las longitudes relativas de los brazos del cuadrivalente en distintas células de la misma translocación indica que el punto de cambio de pareja de los cromosomas implicados en la translocación no tiene una posición fija en el cuadrivalente, lo que implica la existencia de un cierto grado de apareamiento no-homólogo alrededor del punto de translocación.

Se discute la posibilidad de que la distribución no homogénea de los puntos de translocación sea solo aparente (debida a la falta de coincidencia entre el punto de cambio de pareja y el punto de translocación), o bien se deba a una mayor letalidad de las translocaciones que afectan al brazo largo del cromosoma 1R.

PAPEL DE LA VITAMINA B₁₂ EN LA REGULACION DE UN OPERON FOTOINDUCIBLE

Cervantes M, López-Rubio JJ, Elías-Arnanz M y Murillo FJ

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia.

La bacteria *Myxococcus xanthus* responde a la iluminación con luz azul sintetizando carotenoides. La mayoría de los genes carotenogénicos se encuentran agrupados en un operón denominado *carB*, cuya expresión fotoinducible está regulada por las proteínas CarA y CarS. En la oscuridad, la proteína CarA reprime la expresión del operón *carB* y, en la luz, CarS contrarresta de algún modo ese efecto represor.

La proteína CarA presenta una combinación llamativa de dominios. Además de un dominio de unión a DNA, CarA muestra un dominio de unión a la vitamina B₁₂, similar al encontrado en la sintetasa de metionina de varios organismos. Esta asociación de dominios sugiere que la vitamina B₁₂ podría actuar modulando la actividad de la proteína represora CarA. Hemos obtenido datos concluyentes de que la activación de P_B, el promotor regulado por CarA, es absolutamente dependiente de la presencia de vitamina B₁₂. Además, ensayos realizados con proteína CarA expresada en *E. coli* sugieren que, efectivamente, la proteína CarA es capaz de unirse a B₁₂. Hasta ahora, B₁₂ había sido reconocida por su papel de grupo prostético de muchas enzimas, siendo esta la primera vez que se implica a dicha vitamina como factor auxiliar de una proteína reguladora de la transcripción.

La proteína CarS no presenta similitud con otras proteínas conocidas, y no parece contener un dominio de unión a DNA. Para analizar si el efecto activador de CarS sobre el promotor P_B depende de la interacción con CarA, se han enfrentado ambas proteínas utilizando el sistema del doble-híbrido de levaduras. Los resultados indican que la relación funcional entre CarA y CarS está mediada por la interacción física entre ambas proteínas.

OBTENCIÓN DE DELECCIONES Y TRANSLOCACIONES EN LOS CROMOSOMAS DE *H. chilense* PRESENTE EN TRITORDEO.

Cifuentes, Z.¹, Martín, A.² y Cabrera, A.¹

¹ Departamento de Genética, UCO, Apto. 3048, 14080-Córdoba.

² Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC Apdo.4048-Córdoba.

Ciertos cromosomas pertenecientes a especies del género *Aegilops* causan roturas cromosómicas cuando se introducen mediante cruzamientos en el trigo. El cromosoma 2C de *Ae. cylindrica* Host ($2n=4x=28$, CCDD) tiene una acción gametocida cuando se encuentra en monosomía en el fondo genético del trigo hexaploide ($2n=6x=42$, AABBDD) cv "Chinese Spring" (CS), causando roturas cromosómicas principalmente en aquellos gametos que no son portadores de dicho cromosoma. Este fenómeno se ha utilizado con éxito en la obtención de líneas de delección en CS. Estas líneas son útiles para la integración de los mapas genéticos y físicos y proporcionan información acerca de la distribución de genes y de la recombinación a lo largo del cromosoma.

En el presente trabajo se pretende utilizar este sistema de inducción de roturas cromosómicas con un doble objetivo: la obtención de delecciones en los cromosomas de *Hordeum chilense* ($2n=14$, $H^{ch}H^{ch}$) presentes en tritordeo ($2n=6x=42$, $AABBH^{ch}H^{ch}$) y la obtención de translocaciones intergenómicas trigo-*H.chilense*. Para ello se ha cruzado la línea de adición disómica de *Ae. cylindrica* en trigo harinero CS con tritordeo. La F_1 monosómica para el cromosoma 2C se retrocruzó por tritordeo y la descendencia se autofecundó durante dos generaciones. Las plantas se analizaron mediante FISH usando las secuencias repetidas pAs1, pAtT4, GAA y mediante GISH utilizando ADN genómico de *H. chilense* y *Ae. caudata*. Se han obtenido e identificado plantas con varias delecciones terminales en los cromosomas $2H^{ch}$, $3H^{ch}$, $4H^{ch}$, $5H^{ch}$ y $6H^{ch}$ de *H. chilense*. Paralelamente, la obtención de translocaciones entre los genomas D y H^{ch} permite utilizar este sistema como método para introducir material genético procedente del genoma D del trigo harinero en tritordeo.

**UTILIZACIÓN DE POOLS DE ADN Y RAPD PARA IDENTIFICAR
DIFERENCIAS GENÓMICAS ENTRE LA PERDIZ ROJA (*Alectoris rufa*) Y
PERDIZ GRIEGA (*Alectoris graeca*)**

Cortés, O., Cañón, J. y Dunner, S.

Laboratorio de Genética - Dpto. Producción Animal - Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid - 28040 Madrid
ocortes@eucmax.sim.ucm.es

El aumento de la presión cinegética sobre las perdices rojas en la Península Ibérica ha provocado que las parejas reproductoras en su hábitat natural sean incapaces de cubrir la demanda por parte de los cazadores, por lo que se realizan repoblaciones con individuos criados en cautividad. El descenso de los valores reproductivos en las granjas de cría cuestiona la rentabilidad económica del proceso. Sin embargo, el cruce con otras especies, principalmente con perdiz griega, aumenta dichos valores y como consecuencia la rentabilidad económica.

Las diferencias morfológicas entre la perdiz roja y griega son fácilmente identificables, mientras que el retrocruzamiento de la F1 con perdiz roja es muy difícil de diferenciar, lo que puede ser aprovechado para la repoblación.

El objetivo de este estudio consistió en identificar diferencias genómicas entre ambas especies con el fin de desarrollar un protocolo que permita identificar la presencia de híbridos en poblaciones de perdiz roja.

Debido al escaso conocimiento del genoma de ambas especies se empleó la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Sobre un total de 25 individuos de cada especie se analizaron 300 cebadores aleatorios en *pools* de ADN constituidos por cinco individuos. Del conjunto de cebadores utilizados, 33 fueron seleccionados para el análisis individual y, 6 de ellos mostraron un patrón de bandas interpretable, repetible y polimórfico, es decir presentaban una banda en todas las perdices griegas que no aparecía en las rojas, lo que se confirmó con la técnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Posteriormente, con el fin de amplificar exclusivamente la banda diagnóstica bajo condiciones más restrictivas se aplicó la técnica SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).

Con los seis marcadores tipo RAPD, suponiendo una situación de homocigosis y segregación independiente de los marcadores logramos una potencia de exclusión de 0.98. Es decir, de cada cien perdices analizadas procedentes de un retrocruzamiento con perdiz roja, 98 serían detectadas. En el caso de que se tratara de híbridos de primera generación el 100% serían detectados.

CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACIÓN *rad52F89L*

F. Cortés-Ledesma, F. Malagón y A. Aguilera.

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, 41012 SEVILLA

La recombinación homóloga en *Saccharomyces cerevisiae* requiere genes del grupo de epistasia de *RAD52*, incluidos *RAD50-59*, *MRE11*, y *XRS2*. Entre éstos destaca *RAD52*, cuyo mutante nulo presenta el fenotipo más severo, eliminando completamente la recombinación homóloga. En cambio, mutaciones nulas en *RAD51*, un homólogo de *RecA* de bacterias, dan lugar a un fenotipo mucho más suave, en el que no se ven afectados todos los tipos de sucesos de recombinación. *RAD59* parece definir una ruta independiente de *RAD51*, ya que el mutante simple presenta un fenotipo muy suave, mientras que el doble mutante *rad51 rad59* presenta un fenotipo sinérgico, similar a *rad52*. En los mutantes simples, los sucesos de recombinación serían canalizados hacia la otra ruta.

En este estudio hemos caracterizado la mutación *rad52F89L*. Dicha mutación presenta bajadas leves en los niveles de recombinación en fondo silvestre. En cambio, en fondo *rad51*, la caída es mucho más acusada. Así, el fenotipo causado por esta mutación es muy similar al causado por la delección de *RAD59*.

Discutiremos la implicación que tienen estos resultados en el desciframiento de las funciones de *RAD59*, *RAD52* y *RAD51* en recombinación homóloga.

MUTANTES DE *NEUROSPORA CRASSA* ALTERADOS EN LA FOTOACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Rocío P. Cotarelo y Luis M. Corrochano

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

La esporulación del hongo *Neurospora crassa* se induce por la aireación y la falta de nutrientes dando lugar a una abundante producción de células resistentes (conidios). Los genes *con* se activan durante la conidiación y algunos de ellos, como *con-10*, se activan también al iluminar el micelio con luz azul. La fotoactivación de *con-10* es transitoria y desaparece tras dos horas de iluminación continua (adaptación a la luz). La adaptación a la luz es un fenómeno general asociado a la visión en microbios, plantas y animales, incluyendo a la especie humana.

Para investigar los detalles moleculares de la adaptación a la luz en *Neurospora* hemos comenzado la búsqueda de mutantes alterados en la adaptación de la fotoactivación de *con-10*. Para ello hemos usado una estirpe de *Neurospora* con una fusión del promotor de *con-10* al gen responsable de la resistencia a higromicina. Esta estirpe es sensible a higromicina cuando el promotor está inactivo: durante el crecimiento vegetativo en oscuridad o en luz continua. Hemos aislado tres mutantes obtenidos con luz UV que crecen en higromicina en luz continua pero no crecen en oscuridad. En estos mutantes el gen de resistencia a higromicina se activa por la luz azul y esta activación permanece el tiempo suficiente para permitir el crecimiento micelial y formar colonias visibles. Estos mutantes deben tener alterado el mecanismo responsable de la adaptación a la luz azul.

TENDENCIAS EVOLUTIVAS DE DIFERENTES SECUENCIAS REPETITIVAS DE ADN DURANTE LA ESPECIACIÓN DEL GÉNERO *SECALE*

Angeles Cuadrado y Nicolás Jouve

Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares (Madrid).

Email: angeles.cuadrado@uah.es y nicolas.jouve@uah.es

Se analiza en el género *Secale* la presencia y distribución de dos secuencias SSR: (AAC)₅ y (AAG)₅, tres tipos de secuencias altamente repetitivas de centeno: pSc119.2, pSc74 y pSc34 de 120, 350-480, y 610 pb de motivo de repetición, respectivamente) y los loci 5SrDNA. El material vegetal incluye, varias líneas de *Secale cereale* L cultivado, y 10 especies afines relacionadas del género *Secale*. El análisis citogenético se realiza mediante la técnica de FISH. Se establecen los mapas físicos de distribución de las diferentes secuencias analizadas. En base al conocimiento detallado comparativo de los mismos se deducen las siguientes conclusiones: a) cada especie es única, o bien en el complemento o en la distribución de las secuencias repetitivas analizadas, o en ambas características; b) las secuencias repetitivas revelan múltiples loci en los diferentes brazos de los cromosomas de centeno; c) se observa un elevado polimorfismo, así como heterocigosidad entre los homólogos en la distribución de las secuencias microsatélite (AAG)₅ y (AAC)₅, en las especies alógamas del complejo *S. strictum*; d) se observan tendencias evolutivas en la complejidad de las secuencias de ADN repetitivo durante la secuenciación del género. A partir de los datos observados se construye un árbol filogenético, que incluye todas las especies silvestres primitivas y las diferentes formas geográficas afines al centeno cultivado.

EFECTO DEL PROCESAMIENTO POR RNAsaE SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS MENSAJEROS *ftsA* Y *ftsZ*.

Alicia de la Fuente, Lara Ferrero y Miguel Vicente.

-Centro Nacional de Biotecnología. CSIC Campus de Cantoblanco. 28049. Madrid

La organización transcripcional del agrupamiento génico *dcw* (por division and cell wall) de *Escherichia coli* es compleja, no observándose terminadores de la transcripción desde la cabecera hasta el final del mismo, además hay un gran número de promotores que dirigen la transcripción de los genes mas lejanos del agrupamiento. Recientemente hemos descrito que las regiones que están en la cabecera del gen *ddlB* contribuyen con el 66% de la expresión de *ftsZ* (de la Fuente *et al.*, *Biochimie* 83:109-115 2001), el gen distal de la agrupación *dcw*. FtsZ y otras proteínas del agrupamiento *dcw* son esenciales para la división. En la agrupación *dcw* se han encontrado varias señales reguladoras en *cis* (promotores) y en *trans* que dirigen la síntesis de *ftsZ*. Además existe una regulación postranscripcional a nivel de procesamiento de mensajero en al menos dos dianas para

RNAsa E que se localizan en posición 5' justo antes del gen *ftsZ*. Esta regulación postranscripcional puede generar una mayor complicación a la hora de interpretar los datos obtenidos sobre la potencia de los distintos promotores e intentar elucidar cual es el aporte de los transcritos de *ftsZ* que proporciona cada uno de ellos. Para estudiar este proceso de regulación se han obtenido estirpes en los que las dos dianas para RNAsaE de procesamiento silvestre que se encuentran entre *ftsA* y *ftsZ* han sido anuladas mediante mutagénesis dirigida. de esta manera las estirpes resultantes tendrán en el cromosoma los sitios de procesamiento de RNAsaE mutados y además están fusionadas a un gen reportero (*lacZ*) que nos permite medir la transcripción que viene desde la cabecera del agrupamiento y observar cualquier modificación con respecto a la estirpe parental.

UNA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MAP KINASA ES ESENCIAL EN LA PATOGÉNESIS DEL HONGO *FUSARIUM OXYSPORUM*

Antonio Di Pietro, Fe Isabel García Maceira, Emese Méglecz y M. Isabel G. Roncero

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba

El patógeno del suelo *Fusarium oxysporum* ataca a una amplia variedad de especies vegetales. Tras adherirse y penetrar la raíz, el hongo invade el cortex y coloniza la planta entera a través del sistema vascular. Partiendo de la hipótesis de que la transducción de señales y el reconocimiento juegan un papel clave en la patogénesis de *Fusarium*, hemos identificado un gen, *Fmk1*, responsable de una proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK), ortóloga a la MAPK que controla la respuesta a feromonas en levaduras. Mutantes de *F. oxysporum* cuyo gen *Fmk1* ha sido inactivado mediante interrupción génica, pierden la capacidad de infectar plantas de tomate, aunque crecen y esporulan normalmente en medio sintético. Tras la germinación, las hifas de los mutantes *fmk1* no se adhieren a la raíz y, por tanto, no pueden penetrarla. Dichos mutantes son también incapaces de invadir el tejido del fruto de tomate. Concluimos, por tanto, que la ruta controlada por FMK1 es esencial en *Fusarium* para el reconocimiento y la transducción de las señales de la planta. Actualmente estamos buscando otros componentes clave de dicha ruta situados, bien aguas arriba a la MAPK como son las proteínas G y los receptores, o bien aguas abajo como los factores de transcripción y sus dianas, los genes efectores. Hemos identificado un gen efector, *pl1*, cuyo nivel de transcripción está drásticamente reducido en los mutantes *fmk1*. *Pl1* es responsable de una pectato liasa, una enzima implicada en la degradación de la pared celular de la planta.

CARACTERIZACION GENETICA DE UN STOCK DE REPRODUCTORES DE LENGUADO *Solea senegalensis*.

E. Díaz-Ferguson, L. Vega, I. Cross y L. Rebordinos

Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz. 11510 Puerto Real. Cádiz. E-mail: laureana.rebordinos@uca.es.

El lenguado *Solea senegalensis* es una especie importante en Acuicultura por su alto valor comercial. Sin embargo, su cultivo a gran escala presenta limitaciones importantes, por una parte, no se ha podido completar el ciclo de vida en cautividad y, por otra, existen muy pocos estudios genéticos en la especie. La aplicación con éxito de programas de mejora genética viene determinada, en gran medida, por las características de la población a la que se aplica la selección y, principalmente, por la existencia de variabilidad genética. Las isoenzimas, que han sido los marcadores genéticos más utilizados en este tipo de análisis, presentan poco polimorfismo en peces. Por otra parte, para la caracterización de stocks de reproductores hay que utilizar órganos no invasivos (sangre, mucus, aleta) cuya eliminación no suponga una disminución de la eficacia biológica del animal.

En este trabajo hemos ensayado más de 20 sistemas enzimáticos de los utilizados habitualmente en genética de poblaciones. Sin embargo, solamente solamente dos (MDH y PGI) y utilizando extracto obtenido de aleta presentaron actividad suficiente para ser interpretada con seguridad y variabilidad. También hemos analizado proteínas de la sangre (transferrinas y hemoglobinas), porque se ha descrito mayor nivel de variabilidad en estas proteínas que en isoenzimas en peces, y porque existen correlaciones entre tipos diferentes de hemoglobinas y tasas de crecimiento. Nuestros resultados indican la existencia de 6 a 8 alelos para transferrinas y variabilidad para las hemoglobinas catódicas.

Por otra parte la caracterización citogenética es necesaria para la obtención de triploides. El cariotipo del lenguado presenta $2n=42$ cromosomas, con un alto número de cromosomas acrocéntricos y los NOR localizados en el brazo corto del par número 3.

METALOTIONEÍNAS CONSTITUTIVAS E INDUCIDAS POR EL CADMIO EN EL MOLUSCO MARINO *Littorina littorea*.

E. Díez, F. J. Pérez², A. Buxens, A. Fullaondo, A. Aguirre, L. Mazón.

Departamento de Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. Apdo. 644. 48080 Bilbao. ²Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Paseo de la Universidad N° 7. 01006 Vitoria.

L. littorea es un molusco marino capaz de soportar y bioacumular altas concentraciones de cadmio. Uno de los mecanismos implicados en la tolerancia a este metal pesado está relacionado con la presencia y actuación de las metalotioneínas. Estas proteínas tienen un peso molecular bajo, son pobres en aminoácidos aromáticos y muy ricas en cisteínas, y tienen una alta afinidad por los metales pesados. Sus funciones no son todavía bien conocidas aunque se postula que intervienen en la homeostasis de los metales esenciales, en la protección frente al estrés oxidativo y en la tolerancia a la toxicidad de los metales pesados, entre otros.

Nuestro objetivo en este trabajo consiste en analizar la inducción de las metalotioneínas cuando *L. littorea* es expuesta a la presencia de concentraciones subletales de cadmio. Para ello necesitamos un método que permita identificar y cuantificar estas proteínas, las cuáles no tienen actividad enzimática conocida. Actualmente se utilizan varios métodos basados en estimaciones indirectas y que, por lo tanto, presentan problemas de especificidad y de sensibilidad. Ante esta problemática, hemos puesto a punto varios métodos: hemo-cadmio, chelex-cadmio, saturación de cadmio, DPP en medio ácido, determinación del cadmio en las fracciones cromatográficas, y el de Brdicka, basado en el análisis de los grupos S-H. Hemos observado que el único método que no parece adecuado para la identificación y cuantificación las metalotioneínas en *L. littorea* es el de Brdicka. Mediante cromatografía de tamizado molecular (Superdex G75) hemos detectado dos tipos de metalotioneínas con pesos moleculares de aproximadamente 20 KD (MT-1) y 6,5 KD (MT-2). Los individuos control sólo presentan la metalotioneína MT-1, la cual está unida a los metales pesados cadmio, zinc y cobre. Los individuos expuestos a concentraciones subletales de cadmio, muestran los dos tipos de metalotioneína, aunque las cinéticas de inducción de ambas son muy diferentes. El análisis detallado de la inducción de ambas metalotioneínas nos lleva a considerar que ambas están codificadas por dos genes diferentes y que la MT-1 es constitutiva y muy poco inducible, mientras que la MT-2 se induce fuertemente en presencia de cadmio.

gip1: UN NUEVO GEN ESENCIAL DE *Schizosaccharomyces pombe* SUGIERE LA EXISTENCIA DE UN NUEVO CHECKPOINT EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR.

Inmaculada Donoso, M^a Cruz Muñoz-Centeno y Eduardo R. Bejarano.

Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos. 29071 Málaga.

El gen *gip1* de *S. pombe* fue aislado en nuestro laboratorio por su interacción con una replicasa esencial del virus de plantas TYLCV (Donoso *et al.*, en preparación). El análisis de su secuencia muestra que dicho gen se encuentra conservado en todos los organismos eucarióticos. La delección de *gip1* es letal y el estudio de un mutante condicional ha permitido establecer que la ausencia de Gip1 provoca un primer bloqueo en G1, acumulándose células binucleadas, septadas y con un contenido total de DNA de 2C y un posterior y final bloqueo G2/M. Las células binucleadas paradas en G1 realizan una segunda ronda de replicación del DNA y se acumulan como células binucleadas, septadas y un contenido total de DNA 4C. Además de las células binucleadas se acumula otra población de células no septadas, uninucleares y 2C que tampoco se dividen, lo que confirma la existencia del bloqueo G2/M. Este fenotipo terminal con núcleos 2C demuestra que Gip1 no es necesario para la replicación del DNA.

Las células que no expresan Gip1 presentan un septo anormal, en su grosor y estructura, desde el inicio de la septación. El fenotipo descrito podría explicarse por la existencia de un mecanismo de "checkpoint" que detecta posibles errores en el septo (o precursores) y bloquea el ciclo para evitar la progresión de una mitosis que sería aberrante. Este modelo se propone en base a: i) durante el tiempo en que el mutante está bloqueado, las células permanecen viables; ii) la ausencia de Gip1, que por su secuencia se puede proponer implicada en la síntesis de pared celular, provoca simultáneamente una parada en G2 sin segregación nuclear, una parada en el crecimiento y una ausencia de separación entre las dos células hijas.

El análisis genético de los dobles mutantes $\Delta gip1 \Delta rum1$ y $\Delta gip1 wee1-50$ parece demostrar este modelo así como la participación de las proteínas Rum1 y, especialmente, Wee1 en dicho checkpoint.

GENES DE LA HISTONA H1 EN EL GÉNERO *Mytilus*: ANÁLISIS PRELIMINAR SOBRE SU HISTORIA EVOLUTIVA

Eirín-López, J.M.; González-Tizón, A.M.; Martínez-Lage, A. y J. Méndez
Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidade da Coruña. E-15071, A Coruña, SPAIN.

Las proteínas pertenecientes a la familia de la histona H1 se asocian al ADN espaciador entre nucleosomas adyacentes de la cromatina eucariota, interviniendo en procesos de empaquetamiento y regulación de la expresión génica. Este tipo de proteínas muestra un grado de variabilidad significativamente mayor respecto a las histonas del *core* nucleosomal (H2A, H2B, H3 y H4). En el presente trabajo se ha amplificado mediante PCR y posteriormente secuenciado la región codificante del gen de la histona H1, además de segmentos no codificantes adyacentes, en 5 especies de moluscos bivalvos pertenecientes al género *Mytilus* (*Mytilus californianus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*). En todas las especies analizadas se ha identificado una región homóloga al promotor de la histona H4 (H4 box: GGTCCG), previamente descrita en la especie *M. edulis* y cuya presencia vincula estrechamente esta clase de genes de histonas en moluscos bivalvos con los codificantes para histonas *linker* de vertebrados tipo H1°, H5 y H1M. La relación entre los genes mencionados anteriormente se pone de manifiesto mediante la reconstrucción de una filogenia para el gen de la histona H1 en diferentes especies. Adicionalmente ha sido analizado el patrón de sustituciones nucleotídicas existente, a partir de secuencias ancestrales determinadas mediante máxima verosimilitud. En el presente estudio preliminar se discute el posible origen "huérfano" de los genes codificantes para la histona H1 en el género *Mytilus*, así como la dirección de la presión selectiva existente sobre ellos.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación: IFD97-1295/CICYT-FEDER (J. Méndez).

UN NUEVO MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE LAS RESTRICCIONES SELECTIVAS EN GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS BASADO EN VENTANAS DESLIZANTES

Mario A. Fares¹, Santiago F. Elena¹, Andrés Moya¹ y Eladio Barrio¹

¹ Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, y Departamento de Genética, Universidad de Valencia.

En este trabajo se presenta un nuevo procedimiento basado en la utilización de ventanas deslizantes para el análisis de las restricciones selectivas de las diferentes regiones de genes codificantes de proteínas. A diferencia de procedimientos anteriores basados en ventanas (Hughes y Nei 1988), nuestro método utiliza una aproximación estadística no arbitraria a la hora de seleccionar un tamaño de ventana adecuado para probar la posible acción de la selección en una determinada región o dominio del gen codificante. Para cada una de las ventanas deslizadas por el gen se estima las probabilidades de sustitución observadas no sinónima $P(d_N)$ y sinónima $P(d_S)$ así como la razón entre ambos tipos de sustituciones ($\omega = d_N/d_S$). La aplicación del nuevo método a las proteínas *env* y *gag* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a las proteínas de la cubierta del virus de la fiebre aftosa (VFA) ha confirmado la existencia de determinadas regiones previamente asignadas como selectivamente importantes y, además, ha puesto de manifiesto la acción de la selección en regiones ignoradas hasta ahora.

MUTACIÓN (Arg59Gly) EN UNA DE LAS DOS COPIAS DEL GEN *SRY* DE UN CROMOSOMA Y PSEUDODICENTRICO EN UNA MUJER 45,X/46,X psu dic(Y) (pter→q11.2: :q11.2→pter)

R. Fernández¹, J.A. Marchal², A. Sánchez², S. García¹ y E. Pásaro¹

¹ Dpto. de Psicobiología, Universidade de A Coruña

² Dpto. de Biología Experimental, Universidad de Jaen

Mediante la técnica de FISH con la sonda DYZ1/DYZ4 se pudo demostrar la presencia de un fragmento cromosómico dicéntrico derivado del Y en una mujer con rasgos característicos del síndrome de Turner. La reestructuración se definió como psu dic(Y)(pter→q11.2: :q11.2→pter) no fluorescente que presenta dos copias del brazo corto (Yp), dos centrómeros y dos copias de la región proximal del brazo largo (Yq). Mediante el estudio por PCR con los primers XES7 y XES2 (Berta y col., 1990) se demostró la presencia en sangre del gen *SRY*. El análisis de la secuencia demostró la existencia de dos copias del gen. En una de ellas se encontró una mutación puntual A→G en el codón 59 originando un cambio de aminoácido Arg→Gly en el extremo 5' de la caja HMG. La otra copia no presentó ningún cambio respecto al gen *SRY*. La Arg59 se encuentra en interacción electrostática con un fosfato del ADN. Este tipo de interacciones son determinantes a la hora de orientar la proteína para la realización de contactos de carácter específico (Werner y col., 1995). Por ello creemos que una mutación Arg59Gly inhabilitaría total, o al menos parcialmente, la capacidad del *SRY* de interaccionar con el ADN.

Por otro lado, la formación de un cromosoma Y pseudodicéntrico podría ser el resultado de un fallo en la segregación de cromátidas hermanas durante la meiosis paterna. La mutación Arg59Gly que se ha producido en una de las copias del gen *SRY*, ha sido posterior a la formación del cromosoma pseudodicéntrico. Debido a la inestabilidad de los fragmentos dicéntricos durante la mitosis, es muy probable que la línea 45,X se origine durante las primeras divisiones mitóticas embrionarias. Es su distribución en los diferentes tejidos, la causa del fenotipo Turner.

En la actualidad se han descrito 35 mutaciones del gen *SRY* en mujeres XY. La mayoría de ellas se localizan dentro de la caja HMG y suelen originar disgenesia gonadal, sexo invertido XY o hermafroditismo. Sin embargo, esta es la primera vez que se describe una mutación en el extremo 5' de la caja HMG del gen *SRY* Arg59Gly en una mujer con dos copias del gen *SRY* y cariotipo 45,X/46,X psu dic(Y) (pter→q11.2: :q11.2→pter).

Panel: Patología genética

MARCADORES ISSR Y RAPD PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE ADN. IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS Y ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE CEBADA CON ORIGEN CONOCIDO.

M. E. Fernández, A. M. Figueiras y C. Benito

Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad Complutense, Madrid

Hemos evaluado la capacidad de identificación de 353 marcadores moleculares obtenidos mediante PCR y análisis de bloques con 10 cebadores de RAPDs (125 bandas) y 10 de ISSRs (228 bandas). Para ello, se han analizado las relaciones filogenéticas entre 16 cultivares de cebada de diferentes países, con genealogía conocida. Los patrones de amplificación producidos fueron reproducibles para diferentes extracciones de ADN, reacciones de PCR y diferentes electroforesis. El cebador de RAPD S10 y cuatro cebadores de ISSR (811, 820, 835 y 881) fueron capaces de distinguir, cada uno de ellos por separado, los 16 cultivares de cebada. El número medio de bandas amplificadas, el número medio de bandas polimórficas, el poder de resolución, el número de genotipos identificados y el número de bandas exclusivas detectas por cebador, fue siempre muy superior con ISSRs que con RAPDs. Se observó una fuerte correlación entre el poder de resolución (Rp) de un cebador y su capacidad para distinguir genotipos. Los dendrogramas obtenidos con ambos tipos de marcadores agruparon los cultivares en clusters que coinciden bastante bien con su clasificación según sean de primavera o invierno y número de carreras (dos o seis). El dendrograma producido por los ISSRs se ajusta mejor a la genealogía conocida de los cultivares. Por tanto, el análisis de bloques de marcadores RAPD e ISSR proporciona un sistema rápido, fiable y altamente informativo para la identificación de cultivares y permite establecer relaciones filogenéticas que coinciden con el origen conocido de los cultivares.

IDENTIFICACIÓN DE ALELOS DEL GEN *MC1R* EN POBLACIONES DE CERDO IBÉRICO Y DUROC

Fernández A., Óvilo C., Barragán C., Rodríguez C., Silió L.

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología.
INIA. Crta de la Coruña, Km7. 28040 Madrid.

El gen *MC1R* codifica para el receptor 1 de melanocortina, relacionado con la pigmentación de la capa debido a su papel en la regulación del equilibrio entre la síntesis de los dos principales tipos de pigmentos: eumelanina y pheomelanina. Este locus presenta cuatro alelos conocidos en la especie porcina, que se corresponden con distintos patrones de color: El alelo *MC1R**1 presente en jabalí, el *MC1R**2 responsable de la capa negra en Large-Black y Meishan, el *MC1R**3 relacionado con los patrones de color de Hampshire, Pietrain, Landrace y Large White; y el *MC1R**4 responsable de la capa colorada en Duroc. El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de los alelos del gen *MC1R* existentes en poblaciones españolas de cerdo Ibérico y Duroc.

Se analizaron muestras de ADN procedentes de cerdos Ibéricos de distintas procedencias (40 negros lampiños y 53 colorados), 35 de raza Duroc, 9 cruzados Ibérico x Duroc y 10 jabalíes como controles. Para la identificación de los alelos del gen *MC1R* se aplicaron dos protocolos de PCR-RFLP (Kijas et al., 1998).

Los resultados mostraron la existencia de los alelos *MC1R**1 y *MC1R**3 en la raza Ibérica. El alelo *MC1R**3 es compartido por las poblaciones ibéricas negra y colorada (fijado en la primera), por lo que los polimorfismos analizados no pueden ser considerados responsables de esta variación de color. El alelo *MC1R**1 no ha sido detectado previamente en cerdos domésticos y su notable frecuencia en diversas poblaciones ibéricas coloradas no es atribuible a una introgresión reciente. Todos los animales Duroc fueron homocigotos para el alelo *MC1R**4 y los animales cruzados fueron heterocigotos *MC1R**3/*MC1R**4 ó *MC1R**1/*MC1R**4. El alelo *MC1R**4 es un posible marcador diagnóstico de la raza Duroc en problemas de determinación del origen genético de animales ibéricos.

TRANSMISIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A GENES DE RECEPTORES OPIACEOS EN RATA.

Fernández S. Henriques Gil N. Sección de Genética, Dpto de Biología, USP-CEU, Madrid.

La cepa Lewis de rata muestra una mayor adicción a la morfina que la Fisher. Se ha sugerido que las diferencias en este comportamiento podrían deberse a alguno de los genes de receptores de opiáceos: Mu, Delta y Kappa. En este trabajo hemos desarrollado marcadores para cada uno de estos genes que consisten en ampliación por PCR de segmentos cortos de cada locus y estudio de SSCP. Se seleccionaron segmentos que muestran diferencias entre las dos cepas. La F1 entre las dos cepas exhibe un comportamiento semejante a la cepa Lewis por lo que, para el estudio de segregación, se llevó a cabo un retrocruzamiento de la F1 por Lewis. Se trata de relacionar la segregación para cada marcador con el tipo de respuesta adictiva.

RELACIONES FILOGENÉTICAS EN LA FAMILIA TEPHRITIDAE INFERIDAS A PARTIR DE UN FRAGMENTO DEL GEN MITOCONDRIAL DE LA CITOCROMO OXIDASA II

M. P. Fernández, D. Segura, C. Callejas, M. D. Ochando

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

La familia Tephritidae constituye un grupo de especial importancia agronómica. La taxonomía y relaciones filogenéticas en esta familia de insectos todavía son objeto de debate. Recientemente la aplicación de diversas técnicas moleculares está ayudando en la resolución de algunos problemas biológicos dentro del grupo.

Con el objetivo de obtener información sobre las relaciones filogenéticas dentro de la familia Tephritidae, se ha secuenciado un fragmento de 259 pares de bases de la región central del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa II, en un total de 9 especies pertenecientes a 3 géneros distintos incluidos en esta familia.

En la filogenia obtenida de esta manera se aprecian dos ramas principales, conteniendo una de ellas todas las especies de uno de los géneros, mientras que en la segunda se sitúan las especies pertenecientes a los otros dos géneros. Los resultados se discuten en relación con datos publicados basados en información morfológica y molecular.

ESTIMACIÓN DEL GRADO DE DOMINANCIA EN POBLACIONES NATURALES: ESTUDIOS TEÓRICOS.

Fernández, B. y Caballero, A.

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología.
Universidad de Vigo, 36200 Vigo.

El grado de dominancia de las mutaciones es un parámetro fundamental para entender la naturaleza de la variabilidad genética de las poblaciones naturales o la tasa a la que dicha eficacia se reduce con la consanguinidad. Este parámetro puede estimarse por varios métodos, ya sea directamente mediante experimentos de acumulación de mutaciones o mediante el análisis de cromosomas extraídos de poblaciones naturales. El resultado de las estimaciones, sin embargo, es difícil de interpretar en la mayoría de las ocasiones, dado que los distintos métodos producen estimas ponderadas por otros parámetros mutacionales y, además, son susceptibles de diversos sesgos. Por otra parte, la exactitud de las estimas obtenidas de poblaciones naturales depende de la suposición de equilibrio mutación–selección.

El objetivo de este trabajo es el de analizar el comportamiento de los distintos tipos de estimadores del coeficiente de dominancia bajo el supuesto de distintos modelos mutacionales. El estudio se centra en situaciones de equilibrio mutación–selección, así como en el efecto de la selección balanceadora causada por polimorfismos para inversiones cromosómicas. Para ello se llevaron a cabo simulaciones por ordenador de poblaciones naturales con distintos modelos de mutación deletérea sobre eficacia biológica y, en su caso, mutación cromosómica. Tras un elevado número de generaciones se simularon muestreos aleatorios de dichas poblaciones y se estimaron los coeficientes de dominancia utilizando los distintos métodos.

Los resultados con equilibrio mutación–selección ilustran la gran complicación de interpretación de las distintas estimas. El factor más importante es la distribución de los coeficientes de dominancia de las mutaciones y su correlación con los efectos mutacionales. La existencia de selección balanceadora por inversiones cromosómicas puede producir sesgos importantes en las estimas del coeficiente de dominancia.

REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DEL mRNA DE E2F1

Oskar Fernández-Capetillo, Ainhoa Iglesias y Ana M. Zubiaga

Dept. de Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad del País Vasco. 48080. Bilbao.

El punto de restricción entre G_0/G_1 y S es clave en la regulación del ciclo celular. Es ahí donde el factor de transcripción E2F1 ejerce principalmente su función, activando la transcripción de genes esenciales para la síntesis del DNA, y promoviendo la entrada en fase S. Es por ello que la regulación de la expresión de E2F1 resulta clave para la homeostasis celular.

Si bien ya han sido descritos mecanismos reguladores de los niveles de expresión de E2F1 tanto a nivel transcripcional como a nivel de estabilidad de la proteína, es desconocido si existen otros mecanismos de regulación de E2F1, tales como la estabilidad del mRNA.

Con el fin de determinar si la expresión de E2F1 se halla regulada a nivel de mRNA, examinamos mediante análisis Northern su tasa de degradación, observando que era un mensajero de vida media muy corta. El análisis de la secuencia nucleotídica de E2F1 mostró la presencia de elementos ricos en adenosinas y uridinas (AREs) en la región 3' no traducida (3'UTR) de dicho mRNA, elementos previamente descritos como promotores de inestabilidad. Estos elementos se encuentran conservados evolutivamente en E2F1 humano y murino, lo que apunta hacia una función importante de los AREs en la regulación de la estabilidad del mRNA de E2F1.

Para el estudio de la degradación mediada por la 3'UTR del mRNA de E2F1 generamos construcciones plasmídicas heterólogas compuestas por la región codificadora del gen de la β -globina, seguido de secuencias contenidas en la 3'UTR del gen E2F1, y determinamos la capacidad de dichas secuencias de promover la degradación rápida del mRNA intrínsecamente estable de la β -globina. Nuestro análisis mostró la implicación de los AREs en la inestabilidad del mRNA de E2F1, lo que nos indica la existencia de un nuevo mecanismo de regulación génica para E2F1, basado en elementos de inestabilidad presentes en su mRNA.

LOCALIZACIÓN DE GENES DE ARN RIBOSÓMICO EN CROMOSOMAS DE VARIAS ESPECIES DEL GÉNERO *Rosa*

M.D. Fernández-Romero, J.I. Cubero y A. Cabrera

Dpto. Genética. ETSIAM. Univ. de Córdoba. Apdo. 3048. 14080-Córdoba.

El género *Rosa* incluye unas 200 especies y miles de cultivares originados a partir de una compleja serie de cruzamientos. El conocimiento preciso de su genealogía y de la estructura genómica de las rosas tiene un gran valor predictivo acerca de la cruzabilidad interespecífica y la fertilidad de los híbridos, siendo de gran ayuda en los programas de mejora de las especies cultivadas. Este género exhibe una serie poliploide con número básico igual a 7 y los individuos euploides varían de $2n=2x=14$ hasta $2n=8x=56$. En el presente trabajo se ha estudiado mediante hibridación *in situ* el número y la localización de regiones del organizador nucleolar (NORs) en cromosomas metafásicos de siete especies de rosas diploides (*R. sempervirens* L., *R. moschata* Herm., *R. multiflora* Thunb., *R. gigantea* Coll., *R. sericea* Lindl., *R. rugosa* Thunb. y *R. majalis* Herrm.) y de una tetraploide (*R. gallica* "versicolor" L.). Estas especies son ancestros de los cultivares modernos y su constitución genómica abarca a cuatro (A, B, C y D) de los cinco genomas de los que se compone el género *Rosa*. Se ha utilizado como sonda la secuencia de ADN_r que codifica las subunidades 18/25S aislada de soja marcada con digoxigenina-11-dUTP mediante nick-translation y detectada con antidigoxigenina-FITC. En las especies diploides con genomas A, B y C se observaron dos señales de hibridación terminal sobre una pareja de cromosomas, que correspondería a un solo NOR por genoma en todas ellas. En *R. majalis* (genoma D) se observaron cuatro sitios de hibridación localizados en posición terminal de dos parejas de cromosomas submetacéntricos y metacéntricos, respectivamente, indicando que el genoma D posee dos NORs. En la especie tetraploide *R. gallica* "versicolor" se observaron seis señales de hibridación localizadas en tres pares de cromosomas de diferente tamaño. Estas observaciones, junto con los datos de apareamiento meiótico, sugieren un origen alopoloide para esta especie, que estaría constituida por dos genomas, uno con un NOR y otro con dos NORs por genoma. En base a estos datos y a los obtenidos de número y posición de NORs en las especies diploides, se discute la composición genómica de *R. gallica* "versicolor".

SUSCEPTIBILIDAD A LINFOMAS TÍMICOS EN RATONES E2F1^{-/-}

I. García¹, I. Bernales¹, M. Herranz², J. Fdez-Piqueras², A.M. Zubiaga¹

¹ Dpto. Biología Animal y Genética. Universidad del País Vasco. Bilbao;

² Dpto. Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid

Los factores de transcripción E2F están implicados en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que E2F1 juega un papel importante en la selección negativa en el timo, actuando como inductor de la apoptosis en los timocitos inmaduros. Por lo tanto, cabe esperar que la ausencia de un gen regulador de la cascada apoptótica como es E2F1, podría resultar en una mayor susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos.

Con el fin de estudiar la función de E2F1 como supresor de tumores, indujimos la aparición de linfomas tímicos en ratones adultos E2F1^{-/-} (B6X129) y en sus respectivos controles salvajes (B6X129), mediante la exposición a radiación gamma (175 rads). El protocolo de irradiación consistió en un tratamiento semanal durante cuatro semanas consecutivas. Transcurrido un período de latencia de 6 meses a partir del último tratamiento, se sacrificaron los animales que no habían fallecido como consecuencia de la aparición del linfoma.

Al comparar los ratones carentes de E2F1 y los ratones salvajes, hemos encontrado diferencias significativas en la frecuencia de aparición de tumores. Así, el 54% de las hembras E2F1^{-/-} tratadas desarrolló linfomas tímicos, frente al 27% de las hembras E2F1^{+/+} tratadas. Estos resultados sugieren que la actividad E2F1 es esencial para la supresión de linfomas tímicos, y que una pérdida en la función de este gen convierte a las células en susceptibles a este tipo de tumores. En los ratones machos se observó una resistencia mucho mayor que en las hembras al desarrollo de linfomas, y no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos genotipos.

El análisis molecular de los tumores que estamos llevando a cabo actualmente, mediante RT-PCR y análisis Western, nos está permitiendo examinar la expresión diferencial de genes implicados tanto en la inducción de apoptosis (Fas, p73, p19) como en la proliferación (c-myc), y poder definir así el mecanismo por el que E2F1 inhibe la formación de tumores.

TRIGOS TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN ENZIMAS LÍTICAS DEL HONGO PATÓGENO *FUSARIUM OXYSPORUM*

Fe I. García-Maceira¹, M. José Páez², Antonio Di Pietro¹, Antonio Martín², Francisco Barro², M. Isabel G. Roncero¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba. ²Instituto de Agricultura Sostenible (C.S.I.C.), Alameda del Obispo, s/n, 14004-Córdoba.

La resistencia frente a un patógeno depende principalmente de la capacidad de la planta para detectar su presencia y, consecuentemente, desencadenar con suficiente rapidez la reacción de defensa. Muchos microorganismos patógenos comienzan el proceso de infección con la hidrólisis de la pared vegetal. Los productos de esta degradación actúan como inductores de la reacción de defensa en la planta. El objetivo de nuestro trabajo es la obtención de plantas transgénicas de trigo y tritordeo resistentes a hongos patógenos mediante la preactivación de su defensa tras la expresión de enzimas líticas fúngicas. Los genes *p11* y *xy13*, de *Fusarium oxysporum*, responsables de una endopectato-lyasa y una xilanasa, respectivamente, han sido previamente aislados y caracterizados en nuestro grupo. La secuencia genómica de estos genes se ha clonado en fase con los promotores constitutivos CaMV 35S y *ubi1* (ubiquitina de maíz). Estos plásmidos, en combinación con el pAHC25 que contiene el gen *bar*, se han introducido mediante el bombardeo con micropartículas en dos variedades de trigo y dos de tritordeo. Después del proceso de selección con 1-2 mg/l de fosfinotricina, las plantas transgénicas se identificaron mediante PCR. Se han obtenido en total 8 líneas transgénicas, cuatro portadoras del gen *xy13*, dos de *p11* y, otras dos, de *p11* y *xy13* conjuntamente. La expresión de estos genes, analizada mediante RT-PCR, ha puesto de manifiesto que algunas líneas no expresan el transgén. Otras líneas contienen un sólo transcrito correspondiente al ARNm sin procesar, o bien dos transcritos, uno procesado y el otro sin procesar. Estos resultados indican que algunas líneas son incapaces de eliminar los intrones del gen de origen fúngico. En el caso de las líneas con el ARNm procesado se está determinando la presencia de la proteína transgénica y la resistencia a estrés abióticos y bióticos.

CLONACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DE LA QUIMIOCINA SDF1 INHIBIDORA DE LA ENTRADA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1.

C. García-Moruja¹, J.M. Alonso², M.C. Torres¹, F. Arenzana-Seisdedos³, F. Luque¹, J. Alcami², A. Caruz¹.¹Dpto. Biol. Exp. Universidad de Jaén. ²C.N.B.F. Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ³Unidad de Inmunología Viral, Instituto Pasteur, París, Francia.

Introducción: Stromal-cell derived factor (SDF1) es una quimiocina tipo CXC que se une específica y exclusivamente al receptor CXCR4, que actúa también como coreceptor del VIH-1. SDF1 tiene una actividad pleiotrópica estando implicada en la mielopoiesis, linfopoiesis y desarrollo cardiovascular y neural. SDF1 inhibe la entrada algunas cepas del VIH-1 induciendo la endocitosis de CXCR4. La expresión de SDF1 es ubicua, pero no se conocen los detalles de su regulación, ni los tipos celulares que la producen. **Materiales y Métodos:** *Screening* genoteca ADN genómico humano en BAC. *Clonación* de la región 5'proximal del gen. Identificación del sitio de inicio de la transcripción mediante *primer extension* y construcción de 9 delecciones del promotor de SDF1 de tamaños comprendidos entre 1128pb y 135pb. Clonación en un plásmido de expresión de luciferasa de las diferentes delecciones del promotor de SDF1. *Transfección* por electroporación de células estromales MS5, astrocitos U373 y fibroblastos embrionarios LC5. *Tratamiento* 24 horas post-transfección con diferentes estímulos. *Medición actividad luciferasa*, 24 h post-tratamiento. **Resultados:** La región promotora aislada tiene un tamaño de 1129 pb localizándose el inicio de la transcripción a 30 pb de una caja TATA no consenso. Esta región tiene sitios de unión a varios factores de transcripción destacando: Sp1, MAZ, Oct1, AP-1, Ker1, etc... La región 5'proximal es extremadamente rica en G+C (70%). La regulación del promotor difiere según el tipo celular considerado: IFN- γ y FGF inhiben al promotor completo en LC5 y U373, mientras que PMA+iono, SDF1, TNF y 5 FU lo activan. Por el contrario, PMA+iono, SDF1 e IL1 inhiben al promotor en MS5. La delección de la región situada entre -720/-540 desregula la actividad del promotor, aumentando la transcripción hasta 100 veces con respecto al promotor completo. Esta delección coincide con la pérdida de varios sitios consenso de unión a factores de transcripción como Myo D. **Discusión:** Estos resultados preliminares contribuirán a la identificación y caracterización de los factores de transcripción que regulan la actividad basal e inducida de este promotor, mediante la construcción de nuevas delecciones, EMSA y precipitación de cromatina.

FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H3 EN CHROMOSOMAS DE MAMIFEROS

Africa Garcia-Orad¹, Patricia Gomez Vargas¹ and Baldev K. Vig²*

¹Dpto Biología Animal y Genética Universidad del País Vasco, Spain

* Department of Biology, University of Nevada, Reno, Nevada USA

La fosforilación de H3 es necesaria para el inicio de la condensación de los cromosomas pero no para el mantenimiento de ésta (Wei y cols 1999) . los mecanismos que determinan la condensación cromosómica mediada por la fosforilación no han sido descifrados.. Sin embargo, parece ser que la unión de H3 al ADN depende del estado de fosforilación de la proteína histónica (Matsumoto y cols 2000). Entre las histonas la fosforilación se limita a la H3 y la H1. es interesante el hecho de la fosforilación de las histonas desencadena la fragmentación del ADN en la apoptosis (Nakatsuma y cols. 1999), parece ser que existe un acoplamiento entre fosforilación y la acetilación en H3 (Cheung y cols 2000).

Algunas observaciones directas a nivel cromosómico han demostrado que la fosforilación comienza en la heterocromatina y luego se expande por el cromosoma. Sin embargo, un estudio comparativo de la fosforilación de los cromosomas en ratón (L929), hamster (CHO) y Indian muntjac (IM) muestran algunas diferencias entre las especies. Las células L929 presentan señal en la heterocromatina de los centrómeros activos e inactivos con la misma intensidad. Los cromosomas metacéntricos, originados por translocaciones robertsonianas muestran señal centromérica. Lo mismo ocurre con las células CHO. un interesante detalle de estas células es la aparición de señales a nivel de los telómeros, hecho que no se observa en L929 o IM. La región centromérica de el cromosoma X (multicéntrico) en Indian muntjac muestra tres señales y dos en los cromosomas 1 y Y2, coincidiendo con los lugares de reacción del anticuerpo anticinetocoro. Los cromosomas 1 y Y2 también presentan señal en las constricciones secundarias.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA RECOMBINACION MITÓTICA ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN.

María L. García-Rubio y Andrés Aguilera

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, SEVILLA

Desde hace más de dos décadas existen diferentes evidencias experimentales que abarcan desde las bacterias a las células de mamíferos, que indican que la actividad transcripcional induce recombinación mitótica. Esto es un proceso particularmente importante cuando se trata de recombinación entre secuencias repetidas, por las reordenaciones genéticas a las que puede dar lugar. Nosotros hemos definido recientemente una serie de nuevos genes eucarióticos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que están implicados en una posible conexión entre transcripción y recombinación. Ello nos ha permitido proponer que los errores en la elongación de la transcripción pueden ser la base de esta conexión.

Con objeto de definir qué tipo de fenómenos pueden ocasionar errores de elongación de la transcripción que sean recombinogénicos hemos estudiado el efecto del superenrollamiento en recombinación asociada a transcripción. Hemos determinado el efecto que las mutaciones en los genes estructurales de las topoisomerasas *TOP1* y *TOP2* tiene en diferentes sistemas de recombinación de secuencias repetidas en función de que se transcriban o no se transcriban. Igualmente y con objeto de probar si un posible bloqueo de la elongación de la transcripción facilita una mayor accesibilidad al DNA de metabolitos internos que dañen el mismo hemos analizado el efecto que mutágenos como el 4-NQO tienen en recombinación en función de que haya o no transcripción.

Discutiremos las diferentes posibilidades que nuestros resultados sugieren respecto a los mecanismos de iniciación de la recombinación asociados a transcripción.

FILOGENIA DEL GÉNERO *CYRTONUS* (COLEOPTERA CHRYSOMELIDAE):
ESTUDIO COMBINADO DE MARCADORES MITOCONDRIALES Y
NUCLEARES

Irene Garneria, Carlos Juan, Eduard Petitpierre

Universitat de les Illes Balears

El género *Cyrtonus* comprende unas 40 especies estrechamente emparentadas que viven principalmente en áreas montañosas (Petitpierre, 1984). Son insectos nocturnos y durante el día se encuentran escondidos bajo piedras y al pie de las plantas hospedadoras. Se trata de un género oligófago que se alimenta únicamente sobre Asteráceas (Jolivet, 1951, 1966; Petitpierre 1984). El género se distribuye principalmente en la península Ibérica, aunque tres especies pueden encontrarse en Francia, una en el norte de África y otra en Mallorca. Todas las especies son ápteras. Cobos, en 1954, diferenció dos grupos morfológicos, uno más redondeado, y otro más alargado, que consideró el más antiguo. No existe una hipótesis filogenética para este género.

Para el presente estudio se han secuenciado genes mitocondriales (16S, COII) y nucleares (ITS2) en un total de 17 especies, realizándose análisis combinados de todos ellos. Recientes estudios demuestran que el análisis combinado de dos o más regiones génicas funcionalmente independientes puede ayudar a la construcción de una hipótesis filogenética consistente. El estudio de al menos dos genes de regiones celulares separadas (mitocondria y núcleo) se considera ideal para la reconstrucción de la historia evolutiva de un organismo en lugar de la historia de un gen o un orgánulo (Lanyon, 1988).

ESTUDIOS ESTRUCTURA FUNCIÓN EN UN SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS COMPONENTES

Garzón, A. (1,2); So-ichiro Nishiyama (1) y Parkinson J.S (1).

(1)Biology Department, University of Utah, USA

(2)Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes constituyen mecanismos de flujo de información muy abundantes en bacterias y aunque hasta hace poco se creían exclusivos de ellas hoy se conocen ya muchos ejemplos en Eucariotas. Entre ellos destacan los que gobiernan procesos como patogenicidad, simbiosis y fijación de nitrógeno en bacterias, resistencia a estrés salino en bacterias y levaduras, detección de etileno en *Arabidopsis*, etc.

Las proteínas que forman parte de estos sistemas suelen funcionar por pares: típicamente un sensor (con actividad quinasa de proteínas) se autofosforila dependiendo de su grado de ocupación en un residuo de histidina. Posteriormente, la misma molécula de fosfato es transferida a un residuo de aspártico en una segunda proteína (normalmente un activador de la transcripción) cuya actividad depende de su grado de fosforilación. Esta transferencia es muy específica no detectándose comunicación cruzada entre distintos sistemas en condiciones fisiológicas. La ubicuidad de estos sistemas, la especificidad de las interacciones y la importancia de los procesos que gobiernan justifican ampliamente su estudio.

En la presente comunicación usamos la quinasa CheA de *Escherichia coli*, implicada en quimiotaxis, como modelo de quinasa que participa en uno de estos sistemas. Aprovechando su estructura modular demostramos que dominios que normalmente pertenecen a la misma proteína pueden funcionar en *trans in vivo* e *in vitro*, permitiendo adscribir funciones distintas a estructuras distintas. También describimos un ensayo genético capaz de identificar elementos importantes para los procesos de reconocimiento e interacción entre proteínas que gobiernan las reacciones de fosforilación. Con dicho ensayo hemos aislado mutaciones en el dominio de CheA donde reside el residuo fosforilable (H48) que alteran su función. Hemos purificado los dominios que portan esas mutaciones y demostrado con ensayos de fosforilación *in vitro* que dichos mutantes están afectados en la interacción con el dominio catalítico de CheA, necesaria para que se produzca la reacción de autofosforilación. Esos mutantes definen la superficie de interacción entre el dominio catalítico de CheA y su lugar de fosforilación.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DEL ÁRBOL DE ORIGEN DE SEMILLAS DISPERSADAS POR ANIMALES FRUGÍVOROS

José A. Godoy^{1,2} y Pedro Jordano¹

¹Estación Biológica Doñana. CSIC. Pabellón del Perú. Avda. María Luisa s/n. 41013 Sevilla.

²Departamento de Genética. Facultad de Biología. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla

Un reto histórico en los estudios de dispersión de semillas por animales frugívoros ha sido la caracterización espacial de las relaciones entre las semillas dispersadas y sus plantas madres, es decir, la sombra de semillas. La dificultad en asignar de forma no ambigua el origen de semillas dispersadas por frugívoros en comunidades naturales ha supuesto una limitación inevitable que ha impedido un análisis robusto de las consecuencias directas de la zoocoría. Queremos comunicar aquí cómo el genotipo del endocarpio leñoso de la semilla, un tejido de origen materno, proporciona una identificación genética no ambigua de su árbol de origen. Comparando el genotipo del endocarpio de una muestra de semillas recolectadas en trampas repartidas por el paisaje con los genotipos del conjunto de árboles reproductivos en la población pudimos identificar el árbol de origen del 82.1% de las semillas analizadas e interpretamos que el 17.9% restante de las semillas proceden de otras poblaciones. La identificación del árbol de origen de las semillas reveló una marcada heterogeneidad en la composición genética de la lluvia de semillas en distintos microhábitats, oscilando entre 1 y 5 el número de árboles madre que contribuyen semillas a un parche particular del paisaje. Las distancias de dispersión intrapoblacional variaron entre 0 y 316 m, siendo el 62% de las semillas dispersadas a menos de 15 m del árbol materno. Nuestros resultados sugieren la existencia de una fuerte limitación por distancia en la dispersión de semillas combinada con sucesos infrecuentes de dispersión a larga distancia, una acusada heterogeneidad en la composición genética en el paisaje y una variación en la diversidad de madres que contribuyen semillas a un parche particular.

RELACIONES GENÉTICAS EN ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO FESTUCA BASADAS EN AFLPS

Pedro Gómez de Nova, Juan Vicente Monte Herraiz, Marcelino de la Cruz, Carlos Casanova Pena, Consuelo Soler Llinares

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, C.I.T., I.N.I.A.
Finca La Canaleja, N II Km 36, Alcalá de Henares, Madrid

Con el fin de introducir variabilidad genética en un programa de mejora y obtención de variedades comerciales de festucas, tanto para su utilización en céspedes como para revegetación de suelos sometidos a erosión, se ha recolectado por toda España una amplia colección de poblaciones naturales del género *Festuca*. Esta colección incluye numerosas especies, entre ellas formas endémicas de nuestro país.

En el presente trabajo se presentan datos de variabilidad genética y de relaciones interespecíficas de 34 poblaciones naturales correspondientes a 16 especies del género. Para el análisis del material vegetal se utilizaron 5 combinaciones de oligonucleótidos selectivos marcados con fluorescencia sobre ADN genómico digerido con las enzimas de restricción Eco RI y Mse I; y preamplificado en una primera fase de selección. Como resultado se detectaron numerosos polimorfismos en un rango de fragmentos entre 60 y 500 bases que sirvieron para generar un dendrograma usando el índice de Jaccard con el programa NTSYS.

Aunque todas las especies tendieron a quedar encuadradas dentro de las secciones del género previamente propuestas por las clasificaciones botánicas, *Festuca ampla* apareció agrupada dentro de la sección *Aulaxiper* en coincidencia con resultados obtenidos previamente por este grupo en estudios basados en RAPDs e ITSs, lo que sugiere que dicha especie debe de ser adscrita a la sección *Aulaxiper*. De la misma manera, coincidiendo con resultados moleculares previos, *Festuca capillifolia* se segregó de la sección *Festuca* y las secciones *Scariosa* y *Shenodorus* aparecieron intensamente agrupadas por lo que se propone una revisión taxonómica del género.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CLUSTER LEUCINA EN *Buchnera*,
ENDOSIMBIONTE PRIMARIO DEL PULGON *Pemphigus spyrothecae*
(HOMOPTERA:APHIDOIDEA:PEMPHIGIDAE)

Gómez-Valero L.¹, Sabater-Muñoz B.¹, vanHam R.C.H.J.², Silva F.J.¹ and Latorre A.¹.

¹ Institut Cavanilles de Biodiversidad i Biología Evolutiva y Departament de Genètica de la Universitat de València

² Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial. Centro de Astrobiología Madrid.

Buchnera sp es el endosimbionte primario de los pulgones (Homoptera: Aphidoidea), perteneciente al grupo de las γ -proteobacterias. Se localiza en el interior de unos órganos llamados bacteriomas que están formados por células poliploides del pulgones o bacteriocitos. Estudios filogenéticos demuestran que desde que se estableció la simbiosis hace 250 millones de años, *Buchnera* y su hospedador han evolucionado en paralelo. El papel principal de *Buchnera* en la simbiosis es la sobreproducción de aminoácidos esenciales, ciertas vitaminas y lípidos que necesita el pulgón.

Uno de los aminoácidos que la bacteria proporciona al pulgón es la leucina. En la ruta de biosíntesis de este aminoácido intervienen tres enzimas codificados por cuatro genes, *leu*ABCD. Estos cuatro genes se encuentran formando un operón, *leu*ABCD, en enterobacterias como *E.coli*.

En 1995 Bracho y colaboradores (J.Mol Evol.41:67-73) descubrieron que los genes leucinas se encuentran amplificados en un plásmido con el orden *leu*ABCD. Posteriormente se han caracterizado otros plásmidos leucina en otras familias de pulgones (vanHam y col. 1997, J. Bacteriol. 179:4768-4777; 2000, PNAS. 97:10855-10860) pero con el orden de los genes diferente según familia, lo que sugiere múltiples transferencias. Sin embargo en la especie *P. spyrothecae* el cluster leucina está en el cromosoma, pero presenta un plásmido críptico con un origen común al de los plásmidos leucina pero sin los genes *leu*ABCD.

En este trabajo se ha secuenciado la región cromosómica que contiene el cluster leucina y sus regiones flanqueantes en *P. spyrothecae*. El orden de los genes encontrados es *leu*ABCD, sugiriendo que la bacteria ancestral que dio lugar al linaje de *Buchnera* presentaba el cluster leucina en el cromosoma y con el orden génico similar a las bacterias de vida libre más próximas filogenéticamente. Sin embargo, se encuentran modificaciones que afectan tanto a la estructura como a la expresión y regulación del operón.

ALTA VARIABILIDAD GENÉTICA PARA LA RESISTENCIA A LAS TOXINAS
DE *Bacillus thuringiensis* EN UNA POBLACIÓN DE LA POLILLA DE LAS
CRUCÍFERAS.

Joel González-Cabrera, Salvador Herrero y Juan Ferré.

Departament de Genètica, Universitat de València. 46100-Burjassot (València),
España.

La alta eficacia que muestran actualmente los productos basados en las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, tanto formulados como plantas transgénicas, está siendo amenazada por el desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos plaga. Los modelos matemáticos utilizados para predecir la evolución de la resistencia a las proteínas Cry asumen que está provocada por un gen con dos alelos. Además, se asume normalmente que el gen de la resistencia es recesivo. Nosotros hemos demostrado, utilizando experimentos de selección, que una colonia de laboratorio de la polilla de las crucíferas presenta dos alelos diferentes (del mismo locus o no) que le confieren resistencia a la proteína Cry1Ab. La resistencia fue dominante en una de las líneas seleccionadas y parcialmente recesiva en la otra, a la concentración de proteína utilizada en los bioensayos. La colonia de polilla de las crucíferas utilizada es derivada de una población natural de Filipinas que había mostrado resistencia en campo al producto comercial Dipel® (Abbot Laboratories). Esta es la primera vez que se demuestra directamente que una población de insectos contiene más de un gen involucrado en la resistencia a una proteína Cry determinada.

UN ÚNICO GEN CONTROLA LA TASA DE TRANSMISIÓN MASCULINA DE LOS CROMOSOMAS B DE MAÍZ

E. González-González, M. Chiavarino, M. Rosato, M. González-Sánchez, F. Molina y M.J. Puertas

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

El B de maíz se caracteriza por llevar a cabo no-disyunción en la segunda mitosis de polen, produciendo núcleos espermáticos con 0 o con 2 Bs dentro del mismo grano de polen.

La tasa de transmisión de los cromosomas B (Bs) en cruces donde los Bs se transmiten por el lado masculino (0Bx1B ó 0Bx2B) está controlada genéticamente, lo que ha permitido obtener líneas de alta (H) o baja (L) transmisión de Bs. La variación genética para la transmisión del B en estas líneas se debe a que en la línea H fecunda preferentemente el gameto que lleva los Bs, mientras que en la línea L la fecundación es al azar.

Se han obtenido los híbridos F1 HxL, así como la F2. La F1 es uniforme con tasa de transmisión intermedia. La F2 se ajusta a la segregación de un único locus con dos alelos. Todos los datos son compatibles con el modelo de que un único gen actúa en la ovocélula haploide de modo que cuando ésta tiene el alelo *H* elige el gameto masculino con Bs y cuando tiene *L* la fecundación sucede al azar.

También se han medido algunos caracteres cuantitativos (tamaño de la espiga, número y peso de granos, etc.) en los individuos segregantes de la F2, para estudiar una posible relación entre caracteres de eficacia biológica y la transmisión de los Bs. No se ha hallado ninguna relación significativa.

En el vecino panel de F. Molina y col., se demuestra que en cruces donde los Bs se transmiten por el lado femenino, se detectan alelos en los As que tienden a eliminar los Bs. Nuestros datos en conjunto muestran que el polimorfismo para Bs está controlado a dos niveles: por el lado masculino los Bs se comportan como parásitos y tienden a acumularse gracias a los mecanismos de polinización del maíz. Por el lado femenino existen alelos supresores de la acumulación, seleccionados en el genoma A para contrarrestar los efectos parasíticos.

UN *SCAR* ESPECÍFICO DEL CROMOSOMA B DE MAÍZ

M. González- Sánchez, M.J. Puertas, M. Rosato, M. Chiavarino y C. Benito

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28049 Madrid

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hemos tratado de encontrar intermicrosatélites (ISSRs) específicos del cromosoma B de maíz (*Zea mays* L.). Para ello, hemos extraído el DNA genómico de hojas de plantas hermanas con Bs y sin Bs. Inicialmente, el estudio se llevó a cabo con bloques representativos formados cada uno de ellos por el DNA de 10 individuos con Bs y sin Bs, respectivamente. Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando como *primers* oligonucleótidos de 15-18 bases que se unen a determinados microsatélites y amplifican la región comprendida entre ellos. De los 100 *primers* UBC #9 utilizados, 94 dieron patrones de amplificación en ambos bloques pero sólo uno de ellos generó una banda diagnóstico de 557 pb en el bloque de plantas con Bs (UBC-824₅₅₇). En un posterior análisis individual, esta banda apareció en cada uno de los 10 individuos que formaban el bloque con Bs y en ninguna de las plantas que se eligieron para el bloque sin Bs. La banda diagnóstico se aisló del gel y tras purificarla y clonarla en un plásmido, obtuvimos su secuencia. A continuación, diseñamos parejas de *primers* específicos que amplifican exclusivamente el DNA de plantas portadoras de Bs, obteniendo al menos un *SCAR* de 177 pb específico del cromosoma B de maíz (*SCAR*- UBC-824₁₇₇).

Utilizamos el programa BLAST para comparar la secuencia del ISSR UBC-824₅₅₇ con las que existen en el GenBank. La única similitud encontrada consiste en un microsatélite de arroz (*Oryza sativa* L.) que se encuentra entre las posiciones 267-287 del fragmento que hemos aislado. UBC-824₅₅₇ no presenta ningún parecido con la secuencia específica del centrómero del B de maíz aislada por Alfenito y Birchler (1993).

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *DmFoxF* DE *Drosophila melanogaster*

Begoña Granadino, Cristina Pérez Sánchez, Sergio Casas, Lucas Sánchez y Javier Rey Campos.

*Departamento de Biología celular y del Desarrollo,
Centro Investigaciones Biológicas, CSIC
Velázquez 144, Madrid 28006*

DmFoxF1/2 es un factor de transcripción de la familia fork head que muestra una alta identidad de secuencia con las proteínas FOXF1 y FOXF2 de vertebrados. El gen mapea en el cromosoma 3 en la región 65D4-65E1, se extiende 4 Kb y comprende 4 exones. Hemos encontrado que *DmFoxF1/2* se expresa como dos isoformas originadas por un splicing alternativo de un único gen: la isoforma L, de 664 aa y la isoforma S, de 505. Ambas isoformas son idénticas en los primeros 361 amino ácidos y difieren en la región C-terminal. Sin embargo, ambas isoformas comparten en la región C-terminal un dominio rico en histidinas de función desconocida hasta el momento. El dominio fork head o dominio de unión al DNA, de la isoforma L tiene un 73% de identidad con el dominio fork head de los factores FOXF1 y 2 de vertebrados. Además, esta isoforma también muestra homología en el dominio de transactivación AD1 localizado en la región C-terminal de los factores Fox de vertebrados. La isoforma S, sin embargo carece de los 41 amino ácidos del extremo C-terminal del dominio fork head que corresponden a las regiones W1, S2 y W2 características de estos dominios. Además, carece del dominio AD1. La proteína *DmFoxF1/2* reconoce las mismas secuencias de DNA que la proteína FOXF2 humana y no se une a otras secuencias reconocidas por otros factores fork head. Además de estas similitudes estructurales y bioquímicas entre la proteína de *Drosophila* y sus ortólogas en vertebrados, *DmFoxF1* conserva el patrón de expresión durante el desarrollo embrionario. Tanto FOXF1 como FOXF2 de vertebrados se expresan en el mesénquima adyacente al epitelio de órganos de origen endodérmico. En el caso del gen *DmFoxF1/2*, ambas isoformas se expresan en todos los estadios de desarrollo: embrión, larva, pupa y adulto. Sin embargo presenta un patrón de distribución espacial limitado al mesodermo visceral del embrión lo que sugiere un posible papel de este gen en la formación de las constricciones del tubo digestivo medio en la embriogénesis.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS AUTÓCTONAS DE MICROSPORIDIOS

M Haro, N Henriques-Gil, C del Aguila. Sección de Genética, Dpto. Biología, Universidad San Pablo C.E.U. Madrid (España).

Los microsporidios, son parásitos intracelulares obligados, que han perdido las mitocondrias durante su evolución. Se transmiten como formas de resistencia denominadas esporas y aunque son eucariotas tienen algunas características de procariotas. Infectan tanto a invertebrados como a vertebrados, entre ellos al hombre. Su distribución es cosmopolita, adquiriendo mayor importancia a medida que han ido aumentando el número de inmunosuprimidos. Hasta el momento se conocen ocho géneros patógenos para el hombre siendo mayoritarios *Enterocitoozon bienewisi* seguido de *Encephalitozoon hellem*. Producen una patología intestinal diseminada, aunque también se les ha asociado a las "diarreas del viajero".

En este estudio se procedió a la extracción de ADN procedente de esporas de cinco cepas de *E. cuniculi* (3 de hombre, 1 de conejo y 1 de ratón) y siete de *E. hellem* (5 italianas, 1 americana y 1 española, todas de pacientes de sida) y se amplificó la región ITS situada entre las subunidades grande y pequeña del gen del RNA ribosomal. El resultado obtenido indica que se puede averiguar el animal de procedencia de las cepas de *E. cuniculi* en base al número de repeticiones de cuatro nucleótidos (GTTT) que tengan en dicha región ITS. Este hecho tiene un significado epidemiológico importante, ya que aportaría información sobre las vías de contagio y los modos de prevención. La cepa española (USP-A1 y USP-A2) caracterizada en este estudio pertenece al denominado genotipo 3. En el caso de las cepas de *E. hellem*, todas ellas pertenecen al mismo genotipo, al genotipo 1, que efectivamente corresponde a hombre; sin embargo una de las cepas italianas, la PV7, pertenece claramente al genotipo 2. Todos los resultados se confirmaron mediante secuenciación.

El análisis de otras regiones intergénicas del genoma de *E. cuniculi*, mediante PCR-SSCP, ofrecen diferentes patrones de bandas entre las cepas aisladas de hombre y las de procedencia no humana.

IDENTIFICACIÓN DE DOS NUEVOS GENES *GCD* IMPLICADOS EN LA REGULACION TRADUCCIONAL DE *GCN4*.

Estela Hernández¹, Pilar Martín¹ y Mercedes Tamame¹. 1: Instituto de Microbiología Bioquímica del CSIC/Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno 37007 Salamanca, España.

Gen4p es un activador transcripcional común de múltiples genes de biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión de *GCN4* está regulada traduccionalmente en función de la disponibilidad de aminoácidos, a través de cuatro fases cortas de lectura abierta en el líder del mRNA-*GCN4* y de efectores positivos Genp y negativos Gcdp. Mutaciones recesivas *gcd* que desreprimen constitutivamente la traducción de *GCN4* (fenotipo Gcd-) y afectan a la iniciación general de la traducción han permitido identificar funciones esenciales para este proceso conservadas en eucariotas.

Caracterizando genéticamente 9 mutantes *gcd* hemos identificado alelos de genes *GCD* conocidos y dos nuevos genes, *GCD16* y *GCD17*. Su clonación revela que codifican la subunidad Rpc34p específica de la RNA polimerasa III (*GCD16*) y la proteína ribosomal Rpl33a (*GCD17*). Mutantes *gcd16* y *gcd17* exhiben un fenotipo de crecimiento lento incondicional a 28°C y termosensibilidad a 37°C; además, son resistentes a análogos de aminoácidos como el 3AT (3AT^r). La mutación *gcd16-1* es recesiva para los tres caracteres fenotípicos mientras que el carácter de 3AT^r del mutante *gcd17-1* es dominante en diploides heterocigóticos *GCD17/gcd17-1*. Perfiles de polisomas del mutante *gcd16-1* sugieren un defecto en el inicio general de la síntesis de proteínas, lo que explicaría su fenotipo de crecimiento lento y termosensibilidad. Los niveles steady-state del tRNA_i^{Met} maduro se reducen en un 50% en el mutante *gcd16-1* y se observa una acumulación de sus precursores de 4 veces; sin embargo, la mutación no afecta tan drásticamente a la síntesis/procesamiento de tRNAs de elongación. El mutante *gcd 17-1* no exhibe tal defecto, sino una disminución apreciable en los niveles de 25SrRNA. La función de *GCD16* y la de otros genes *GCD* clonados anteriormente indica que la síntesis de tRNA_i^{Met} tiene unos requerimientos especiales tanto en transcripción como en procesamiento. El estudio del mutante *gcd17* puede contribuir a desvelar la función de Rpl33a y del ribosoma en la regulación traduccional de *GCN4*.

¿ES SUFICIENTE EL RESERVORIO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PARA EL CONTROL DE PLAGAS?

Salvador Herrero¹, Baltasar Escriche¹, Marisé Borja², y Juan Ferré¹

¹Departament de Genètica, Universitat de València, València

²Departamento de I+D, Fundación PROMIVA, Madrid

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se caracteriza porque en el momento de su esporulación sintetiza un cristal de naturaleza proteica con capacidad insecticida. Estos cristales están compuestos mayoritariamente por proteínas Cry. En la actualidad se han clonado más de 200 genes *cry* con diferentes actividades insecticidas frente a un amplio rango de insectos diana. Los distintos genes *cry* se clasifican en diferentes familias en función de su homología de secuencia aminoacídica. El uso combinado en un mismo producto de diferentes genes *cry*, se está planteando como uno de los métodos más eficaces para retrasar el desarrollo de resistencia a *B. thuringiensis*. Este uso conjunto de varios genes *cry* precisa que las proteínas que producen, además de ser tóxicas individualmente, no compartan un mismo sitio de unión en la membrana epitelial de intestino medio del insecto diana. Esto último implicaría el desarrollo al unísono de resistencia a las dos proteínas Cry.

Empleando como modelo el lepidóptero *Cacyreus marshalli*, reciente plaga de los geranios europeos, se ha analizado el potencial de las 11 proteínas Cry más tóxicas para lepidópteros. De los resultados se desprende: (i) solo 7 proteínas Cry tienen elevada o media toxicidad frente a esta plaga, (ii) de las proteínas tóxicas todas menos una comparten un mismo sitio de unión. Este hecho pone en evidencia que a pesar del gran número de proteínas Cry actualmente descritas es indispensable potenciar la búsqueda de nuevos genes *cry*. Esto es necesario para garantizar la eficacia a largo plazo de *B. thuringiensis* en el control de plagas, tanto en su empleo como insecticida convencional como en su empleo en plantas transgénicas.

ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTACIONES DE LOS GENES *HPRI* Y *THO2* QUE AFECTAN DE FORMA DIFERENTE A LA TRANSCRIPCIÓN Y LA RECOMBINACIÓN

P. Huertas y A. Aguilera

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, 41012 SEVILLA, España

Los genomas eucariotas están llenos de repeticiones de ADN que por recombinación pueden dar lugar a reordenaciones genómicas como deleciones, inversiones y translocaciones. La frecuencia a la que ocurren dichos eventos está influenciada por otros aspectos del metabolismo del ADN. Especialmente interesante es la conexión que existe entre la transcripción y la recombinación. Nuestro grupo ha encontrado que mutaciones en los genes *HPRI*, *THO2*, *MFT1*, *THP1* y *THP2* presentan un efecto en la elongación de la transcripción asociado a un fenotipo de hiperrecombinación. Esto sugiere que la transcripción puede ser una importante fuente de inestabilidad genética.

Para comprender el proceso de la recombinación asociada a transcripción y su control por los genes mencionados anteriormente, hemos aislado nuevos alelos mutantes tanto de *HPRI* como de *THO2* usando la técnica de PCR mutagénica. Hemos encontrado mutantes que afectan específicamente a la transcripción o la recombinación. Especialmente interesantes son varios mutantes *hpr1* y *tho2* que causan una fuerte caída de la eficiencia de la transcripción, pero no llevan asociados un efecto en recombinación. Además hemos aislado dos mutantes de *hpr1* con un fuerte fenotipo hiperrecombinador que siguen mostrando niveles elevados de transcripción. En paralelo hemos construido una serie de deleciones del gen *THO2*.

El análisis molecular de mutantes seleccionados a nivel de la transcripción de diferentes construcciones basadas en el gen *lacZ*, así como la recombinación con diferentes sustratos de repeticiones de ADN, nos va a proporcionar nuevas pistas para comprender como la recombinación y la transcripción están conectadas *in vivo*.

EXTENSIÓN SUPERFICIAL DE CROMOSOMAS MEIÓTICOS EN BIVALVOS VENEROIDEOS.

N.S. Hurtado & J.J. Pasantes

Departamento de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía. Universidade de Vigo. E-36200 Vigo, España.

La mayoría de los estudios citogenéticos en bivalvos se han centrado en la caracterización de los cromosomas mitóticos mediante técnicas de tinción convencional con el colorante de Giemsa y/o la detección de los NORs con nitrato de plata. Aunque el estudio de los cromosomas meióticos ha aportado una gran cantidad de información en diversos organismos, la información sobre estos cromosomas es prácticamente inexistente en bivalvos.

Con el fin de analizar cromosomas profásicos meióticos en bivalvos, se han puesto a punto técnicas de extensión superficial de complejos sinapteinémicos obtenidos a partir de tejido gonadal de machos maduros de 4 especies pertenecientes al orden Veneroidea. En concreto, *Cerastoderma edule* (Cardiidae), *Dosinia exoleta* (Dosiinidae), *Venerupis rhomboides* y *Venerupis pullastra* (Veneridae). La detección del complejo sinapteinémico se realizó mediante tinción con nitrato de plata mientras que el ADN correspondiente a los homólogos apareados fue teñido con DAPI.

Las cuatro especies analizadas presentan 19 bivalentes en los que las diferencias de tamaño son relativamente escasas. Estos resultados confirman los números cromosómicos descritos en estas especies ($2n = 38$) mediante análisis de cromosomas mitóticos.

Estas extensiones superficiales de cromosomas profásicos meióticos de bivalvos se mostraron adecuadas para la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Se presentan resultados de FISH utilizando como sondas secuencias ADN_r 18+28S, procedentes de *Xenopus laevis* y *Salmo trutta*, y teloméricas humanas.

FOSFOMANANOS DE LA PARED CELULAR ACTUAN COMO RECEPTORES DE OSMOTINA. UNA PROTEINA ANTIFUNGICA DE PLANTAS

Ibeas J.I. (1,2), Pardo J.M. (3), Hasegawa P.M. (2), and Bressan R.A. (2)

(1)Center for Plant Enviro. Stress Physiology, Purdue University IN USA

(2)Dpto de Ciencias Ambientales. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

(3)Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologica (IRNA). CSIC. Sevilla

Osmotina es una proteína antifúngica de plantas del tipo PR-5. Esta proteína tiene un amplio espectro de acción entre hongos y levaduras pero presenta cierta especificidad selectiva por alguno de ellos. Utilizando *S. cerevisiae* como modelo hemos determinado que la acción antifúngica de la osmotina es dependiente de los genes MNN2, MNN4 y MNN6, implicados en la glicosilación de la pared celular. MNN2p es la responsable de la adición de la primera manosa a las ramas de poli1.6 manosas de la cadena externa en las proteínas N-glicosiladas. MNN6p es la responsable de la transferencia de una manosa-fosfato a esas ramas externas, y MNN4p su regulador. La delección de MNN2, MNN4 y MNN6 provocan la desaparición de los grupos fosfatos de la pared celular y evitan la unión de osmotina a ésta. MNN1p es una manosiltransferasa que añade las últimas manosas en las ramas y enmascara parcialmente el grupo fosfato. La delección de MNN1 hace al grupo fosfato mas accesible e incrementa la unión de osmotina y por tanto la sensibilidad a este antifúngico.

En el laboratorio hemos aislado varias manoproteínas de pared celular capaces de unirse a osmotina inmovilizada en columna. Una de ellas ha sido identificada como CWPI.

Todos estos datos sugieren un modelo en el que el grupo fosfato de las manoproteínas de pared celular actúan como receptor de la osmotina.

Existe una correlación entre la existencia de grupo fosfato en la pared celular y sensibilidad a osmotina entre varios hongos y levaduras que llevan a pensar que el modelo propuesto pueda ser general entre hongos y no específico de *S. cerevisiae*. El echo de que las manoproteínas de pared celular estén implicadas en los procesos de adhesión de patógenos humanos y fitopatógenos a los tejidos que invaden, hacen de este residuo una posible diana para el diseño de nuevos antifúngicos.

AISLAMIENTO Y LOCALIZACIÓN GENÉTICA DE SECUENCIAS DE AVENA ANÁLOGAS A GENES DE RESISTENCIA A PATÓGENOS

M. L. Irigoyen, Y. Loarce, A. Fominaya, E. Ferrer

Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Madrid

La identificación de motivos conservados en las secuencias de diferentes genes de plantas que determinan resistencia a patógenos (genes R) ha sido utilizada para diseñar cebadores específicos y, mediante reacciones de PCR, amplificar secuencias genómicas de avena. Los motivos conservados seleccionados fueron cuatro correspondientes a las regiones P-loop, Kinase-2, GLPLAC, y MDH. Se sintetizaron 15 cebadores que fueron utilizados en pares en un total de 478 combinaciones. Se seleccionaron 10 productos de amplificación de los tamaños esperados comprendidos entre 500 y 1000 pb. Estos productos fueron clonados y caracterizados por sus patrones de restricción. Se secuenciaron 37 clones que presentaron distintos patrones de restricción y de ellos 12 mostraron secuencias con un alto grado de similitud a genes de resistencia conocidos. Fueron, por tanto, identificados como secuencias análogas a genes de resistencia (RGA). Las localizaciones genómicas de los RGAs fueron determinadas mediante RFLPs y por ligamiento genético a otros marcadores moleculares utilizando una población de 70 líneas recombinantes procedentes del cruzamiento *Avena byzantina* 'Kanota' x *A. sativa* 'Ogle'. Las secuencias RGA identificaron genes de copia única y de bajo número de copias. La comparación entre localizaciones genómicas de las secuencias RGA y genes R de avena permite extraer conclusiones acerca de la clasificación de las secuencias RGA como posibles genes candidatos R y su utilización como marcadores de los mismos.

CARACTERIZACIÓN DE LA SERIE MONOSÓMICA SUNII DE *AVENA SATIVA*
MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU CON SECUENCIAS DE ADN REPETIDO

M. L. Irigoyen, C. Linares, E. Ferrer, A. Fominaya

Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Madrid.

La disponibilidad de dos secuencias satélites, As120a y Aml específicas de los genomas A y C respectivamente, y su aplicación en hibridación in situ a células meióticas en metafase I y células somáticas, ha permitido la asignación genómica de los dieciocho términos monosómicos constituyentes de la serie SunII de *A. sativa* ($2n=42$, AACDD). Las secuencias se utilizaron en combinación con secuencias ribosomales (NOR y 5S) para una mejor caracterización de los términos.

El cariotipo de hibridación in situ del cultivar SunII se comparó con los descritos previamente en el cultivar Extra Klock de *A. sativa* y Kanota de *A. byzantina*, y se utilizó para identificar cada término de la serie. Los resultados demuestran : (1) presencia de algunos términos duplicados; (2) existencia de los 7 términos del genoma A; (3) ausencia de 3 términos del genoma D y 5 términos del genoma C; (4) existencia de translocaciones intergenómicas e identificación de los cromosomas implicados. La discusión se centra en el origen de las translocaciones identificadas en comparación con las detectadas en los cultivares previamente caracterizados.

NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DEL HONGO
ZIGOMICETO *MUCOR CIRCINELLOIDES*

E.A. Iturriaga, T. Papp, A. Velayos, y A.P. Eslava*

Area de Genética, Departamento de Microbiología y Genética.

* Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE)

Universidad de Salamanca. Edificio Departamental, Avda. Campo Charro s/n. 37007
Salamanca.

Distintas especies del género *Mucor*, hongo perteneciente a la clase de los zigomicetos, son el objeto de estudio en numerosas áreas de investigación biológica, tanto básica como aplicada. El dimorfismo, la producción de enzimas extracelulares de interés comercial, o más recientemente la biosíntesis de carotenoides, son algunas de las áreas de interés. El desarrollo de técnicas moleculares en *Mucor circinelloides* fue posible en un primer momento gracias a la puesta a punto de un sistema de transformación basado en la formación de protoplastos. Con posterioridad se han desarrollado también métodos biofísicos de transformación. El sistema está basado en la complementación de mutantes auxótrofos, ya que no se conocen marcadores dominantes. En general, los plásmidos se replican autónomamente en el genoma, pero es también posible la integración.

Nuestro grupo está interesado en el desarrollo de vectores de expresión que permitan el estudio de la función de algunos genes clonados. Una aproximación para el desarrollo de este tipo de vectores es la utilización de promotores regulados por fuente de carbono. Para ello, hemos aislado el gen *gal1*, codificador de la enzima galactokinasa, la primera enzima de la degradación de galactosa. La expresión de este gen es nula cuando *M. circinelloides* crece en glucosa, y se incrementa más de 1000 veces en presencia de galactosa. El promotor de este gen podrá ser utilizado para estudios de expresión en este organismo. Por otra parte estamos desarrollando un sistema de mutagénesis dirigida por transposones, utilizando el promotor del gen *gal1* asociado al transposón Tc1 de *Caenorhabditis elegans*, una de cuyas características es la de transponerse independientemente de factores del huésped, en organismos que se encuentran alejados filogenéticamente. La utilización del promotor de *gal1* nos permitirá controlar el movimiento del transposón, mediante el crecimiento en medios con glucosa o galactosa, para el aislamiento de mutantes, y la posterior identificación del gen alterado.

DESARROLLO DE LOS OVOTESTES EN LAS HEMBRAS FÉRTILES DEL TOPO *Tupa occidentalis*. IMPLICACIONES GENÉTICAS

Rafael Jiménez Medina, Francisco Barrionuevo Jiménez, Federico Zurita Martínez y Miguel Burgos Poyatos

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 18071 Granada.

La diferenciación sexual de los mamíferos depende de la presencia o no del gen determinante testicular *SRY*, localizado en el cromosoma Y. Consecuentemente, se considera que existe reversión sexual cuando un individuo XX presenta tejido testicular, o cuando uno XY desarrolla tejido ovárico. Las hembras del topo ibérico *Talpa occidentalis* representan un caso único de reversión sexual XX, ya que todas ellas poseen ovotestes con una porción de tejido testicular disgenésico.

En esta comunicación presentamos los resultados de nuestro estudio sobre el desarrollo de estos órganos. Entre ellos podemos destacar los siguientes, en relación con el origen ontogenético del tejido testicular de tales ovotestes: 1) El primordio gonadal indiferenciado de las hembras de topo inicia un desarrollo con características testiculares, que coincide en el tiempo con el de los testículos de los machos. Esto se traduce en la formación de cordones medulares que son separados por mesénquima mesonéfrico; 2) Las células germinales desaparecen rápidamente y casi por completo de esta región medular; 3) Esta situación se prolonga durante todo el desarrollo prenatal, en el que sólo tiene lugar un considerable crecimiento de las regiones cortical y medular de la gónada femenina; 4) Coincidiendo con el nacimiento, los cordones medulares comienzan a fragmentarse y se inicia el desarrollo testicular de la región medular; 5) Cuatro días tras el nacimiento, comienza el desarrollo ovárico con la entrada en meiosis de las células germinales de la región cortical; 6) La foliculogénesis se inicia unas dos semanas después y termina coincidiendo con el destete, alrededor de los 30 días tras el nacimiento; 7) En este tiempo, el tejido testicular ya produce altos niveles de testosterona.

El desarrollo gonadal de las hembras de topo presenta, por tanto, unas características que lo hacen único entre los mamíferos. El extraordinario retraso en el inicio del desarrollo ovárico y la pérdida de las células germinales primordiales de la región medular, junto con el patrón de expresión de genes tales como *DAX1* y *SOX9* (ver el resto de nuestras comunicaciones), probablemente centren el origen de esta reversión sexual.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE THO1.

S.Jimeno y A. Aguilera

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, 41012 SEVILLA

El fenómeno de recombinación asociada a transcripción ha sido descrito en todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Nosotros hemos demostrado que la delección de los genes HPR1, THO2, MFT1, THP1 y THP2 dan lugar a un fenotipo de hiperrecombinación asociada a transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*.

THO1 fue identificado como supresor por sobreexpresión de la incapacidad de transcribir a través del lacZ del mutante *hpr1*, pero al contrario de otros supresores, la delección de este gen no muestra fenotipos ni de transcripción ni de hiperrecombinación.

Aquí mostramos, por medio de una fusión GFP-THO1, que THO1 es una proteína de localización nuclear. Además hemos purificado una versión recombinante de la proteína y con ella hemos realizado ensayos *in vitro* que relacionan a THO1 con ciertos aspectos del metabolismo del RNA.

ADITIVIDAD Y SINERGIA ENTRE LOS GENES *INCURVATA* DE *Arabidopsis thaliana*

Sara Jover Gil, Pedro Robles, Héctor Candela y José Luis Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

La hoja de *Arabidopsis thaliana* es una estructura fundamentalmente plana, cuyo tamaño y forma finales son el resultado de la división y la expansión de sus células. El crecimiento de los dominios dorsal y ventral de la hoja, cuyas superficies son similares, debe estar coordinado por medio de algún mecanismo que se desconoce, cuya perturbación podría causar la curvatura del órgano hacia el haz o el envés. Hemos obtenido y estamos analizando genéticamente mutantes que se caracterizan por la curvatura del limbo de sus hojas hacia el haz, fenotipo al que hemos denominado *Incurvata* (*Icu*).

El análisis de complementación de las estirpes *icu* nos ha permitido establecer la existencia de 14 genes *ICU*, dos de los cuales, *CURLY LEAF* (*CLF*) y *HASTY* (*HST*), han sido descritos por otros autores. Hemos obtenido todas las posibles combinaciones genéticas dobles entre alelos mutantes de 10 genes *ICU*. Manifestaron aditividad fenotípica todos los dobles mutantes en los que participan las mutaciones *icu5*, *icu6* e *icu7*, lo que indica que las funciones de *ICU5*, *ICU6* e *ICU7* son independientes, entre sí y con respecto a los otros siete genes. Se observó sinergia en muchos de los restantes dobles mutantes, lo que sugiere la existencia de interacciones, que estamos analizando, entre los genes *CLF*, *ICU2*, *HST*, *ICU4*, *ICU8*, *ICU9* e *ICU15*.

PAPEL DE LA RECOMBINACIÓN INTRAGÉNICA EN LA GENERACIÓN DE VARIACIÓN EN LOCI DRB DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EN RUMIANTES.

B.M. Jugo y A. Ortuondo

Animali Biología eta Genetika Saila. Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es una región genómica que juega un importante papel en la regulación de la respuesta inmune. Una característica remarcable de los genes localizados en el MHC es su extremado grado de polimorfismo genético. La frecuente aparición de motivos polimórficos compartidos por diferentes alelos de un mismo locus del MHC, causante de un patrón en mosaico, ha estimulado a muchos autores a proponer que el intercambio de cortos motivos de secuencia ha contribuido a la generación de diversidad en el MHC. Es posible que el mecanismo molecular de este proceso esté basado en eventos de recombinación no recíproca o conversión génica. Así, el patrón del polimorfismo en los genes altamente polimórficos del MHC resulta muy complicado, siendo reflejo de la interacción entre selección, deriva y conversión génica.

Con el fin de determinar el papel relativo de la conversión génica en la generación de variación del MHC ovino, hemos analizado el patrón del polimorfismo del segundo exón de loci MHC-DRB de varias especies de rumiantes mediante análisis de secuencias de ADN, bien secuenciadas por nosotros bien recopiladas de las bases de datos moleculares.

Nos proponemos aplicar varios algoritmos que permitan detectar segmentos en los que se hayan producido fenómenos de conversión génica. En una primera aproximación, se ha utilizado el programa PLATO (Grassly y Rambaud, 1998), que utiliza un método estadístico que identifica aquellas regiones de secuencias moleculares que no parecen evolucionar de igual forma a los modelos de probabilidad máxima global. En las 65 secuencias de ovino analizadas, se han detectado 5 segmentos con evolución anómala. Estos segmentos han sido también detectados en otras especies de artiodáctilos (77 secuencias analizadas) y varios de ellos se mantienen aún cuando se eliminan los codones de los lugares de unión al péptido.

Teniendo en cuenta que los valores más significativos corresponden a los dos segmentos de la hélice α y que esta región es particularmente propensa a procesos de recombinación, los resultados de este estudio parecen indicar que la recombinación intragénica es un factor importante en la creación de variabilidad en el gen DRB del MHC ovino.

CARTOGRAFIADO DE CARACTERES CUANTITATIVOS EN EL BASIDIOMICETO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus*

L. Larraya, E. Idareta, D. Arana, A.G. Pisabarro y L. Ramírez

Depto. de Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra, 31006 Pamplona

Pleurotus ostreatus es un basidiomiceto comestible de amplia distribución mundial. La producción incrementa cada año y en países como España e Italia ha alcanzado el segundo lugar en volumen de producción en el mercado de hongos comestibles.

P. ostreatus presenta un sistema de apareamiento heterotálico que facilita la realización de cruzamientos entre diferentes cepas. Sin embargo, existen en el mercado un número muy reducido de cepas comerciales. Las cepas dicarióticas producen los cuerpos fructíferos (setas comercializables) y generan progenies monocarióticas (haploides) incapaces de fructificar. Mediante cruzamientos entre monocariontes compatibles se restaura la condición dicariótica.

En nuestro laboratorio estamos interesados en el cartografiado de caracteres cuantitativos de interés comercial para poder realizar una selección asistida por marcadores a nivel monocariótico, pudiendo de este modo realizar los cruzamientos entre cepas de una forma dirigida. En este sentido, hemos estudiado el carácter velocidad de crecimiento del micelio vegetativo, que está directamente relacionado con la capacidad de colonización del sustrato. El análisis se ha realizado tanto a nivel monocariótico como dicariótico, y en dos sustratos diferentes, un medio artificial basado en extracto de malta y un sustrato de paja similar al del cultivo comercial. El análisis de dicho experimento permitió la localización de varios QTLs en el mapa de ligamiento obtenido previamente en nuestro laboratorio. Se ha encontrado una alta correlación entre los QTLs de micelios mono y dicarióticos, y una correlación media y negativa entre los correspondientes a la velocidad de crecimiento en los dos sustratos ensayados.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE *Mytilus galloprovincialis*. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA ENTRE MEJILLONES INTERMAREALES Y MEJILLONES DE CULTIVO.

J.L.López¹, E. Mosquera¹, J. Fuentes², A. Marina³, J. Vázquez³ and G. Alvarez¹

- 1 Departamento de Biología Fundamental, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. 15782 Santiago de Compostela, España.
- 2 Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería de Pesca, Xunta de Galicia, Pontevedra, España.
- 3 Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC Universidad Autónoma de Madrid, 28049, España.

La electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE) es un método único para la caracterización proteica a gran escala y es una poderosa herramienta en el estudio de la expresión génica a nivel proteico. En este trabajo, se establecieron las condiciones experimentales para resolver las proteínas de pie de *Mytilus galloprovincialis*. El análisis se realizó utilizando mejillones de cultivo e intermareales y usando el programa Melanie-3 de análisis de datos. Esta poderosa herramienta nos permitió visualizar de un modo reproducible un total de 750 especies proteicas expresadas en el pie de *Mytilus*. La intensidad de 92 especies proteicas previamente seleccionadas se comparó entre ambas poblaciones de mejillones, y se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el 48,9% de las proteínas analizadas. En 31 de estas proteínas, la intensidad fue más alta en la población de cultivo que en la población intermareal, mientras que en 14 proteínas se detectó lo contrario. Se analizaron las proteínas con los seis cambios más acusados mediante espectrometría de masas (MS) y programas de búsqueda de secuencias en las bases de datos. Uno de los cambios se identificó como la heat shock protein 70, y otros dos como proteínas citoesqueléticas, la miosina y la actina. La heat shock protein 70, involucrada en el transporte celular, que actúa como una chaperonina y asociada a situaciones de estrés, se expresó más en mejillones de roca que viven en la zona intermareal que en mejillones cultivados. Estos resultados se relacionan con los cambios moleculares relacionados con la adaptación de los moluscos a diferentes condiciones ecológicas.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA $\Delta 6$ -
DESATURASA DE *Echium*

López Alonso, D., Garrido, J.A., Vilches, M., Rodríguez Ruiz, J. y García Maroto, F.

Grupo de Biotecnología de Productos Naturales (CVI-722), Universidad de Almería, España

El ácido γ -linolénico (GLA) es un ácido graso poliinsaturado (18:3 Δ 6,9,12) de creciente interés por su implicación en salud humana. El GLA se encuentra de forma natural en las semillas de ciertas familias de plantas, entre las que destacan las boragináceas. Este compuesto es sintetizado a partir del ácido linoleico (18:2 Δ 9,12) mediante la introducción de un doble enlace adicional en posición $\Delta 6$, reacción catalizada por una $\Delta 6$ -desaturasa específica. Aquí presentamos la clonación del gen que codifica la $\Delta 6$ -desaturasa a partir de dos especies de *Echium* (Boraginaceae). El gen se encuentra en una sola copia en el genoma y carece de intrones. El análisis filogenético separa claramente de un lado, las $\Delta 6$ -desaturasas de *Echium* y *Borago officinalis*, y de otro las $\Delta 8$ -desaturasas, con las que están filogenéticamente muy relacionadas, lo que indica que los genes de *Echium* codifican efectivamente $\Delta 6$ -desaturasas. El análisis de la expresión del gen en plantas de *Echium* muestra que los niveles de expresión en los distintos tejidos se correlacionan con los correspondientes a la síntesis de GLA, su producto metabólico. Asimismo, se ha conseguido aislar, mediante PCR inversa, un fragmento de 1,2 Kb correspondiente a la región 5' reguladora del gen. Actualmente llevamos a cabo la caracterización funcional del gen mediante expresión heteróloga en diversos sistemas, así como el análisis del promotor mediante fusión transcripcional con GUS. El objetivo último es sentar las bases para la obtención, mediante modificación genética, de especies oleaginosas capaces de producir GLA.

UN SISTEMA DE DOS COMPONENTES REGULA EL OPERÓN DE RESISTENCIA A Ni²⁺ EN LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Luis López-Maury, Mario García-Domínguez, Francisco J. Florencio, Jose C. Reyes.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla-C.S.I.C. Av. Americo Vespucio s/n. 41092 Sevilla.

El Ni²⁺, Co²⁺ y Zn²⁺ son necesarios para la actividad catalítica de muchas enzimas redox, debido a su elevada densidad de carga que permite la polarización de los sustratos. Sin embargo por encima de ciertos umbrales se convierten en compuestos altamente tóxicos puesto que inhiben procesos esenciales para la vida como son la respiración o la fotosíntesis. En la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 existe una agrupación génica implicada en la resistencia a Ni²⁺, Co²⁺ y Zn²⁺ que esta formada por 11 pautas abiertas de lectura organizadas en seis unidades transcripcionales¹.

El sistema de resistencia a Ni²⁺ esta compuesto por 4 pautas abiertas de lectura (*nrsBACD*) que codifican para proteínas capaces de transportar hacia el exterior el Ni²⁺ cuando se alcanzan niveles tóxicos en el citosol. Estos genes están formando una sola unidad transcripcional cuya expresión es inducida por la presencia de Ni²⁺ en el medio¹.

A 138 p.b. y en orientación opuesta se encuentra un sistema de dos componentes formado por los genes *nrsR* y *nrsS* que regulan la expresión del operón de resistencia a Ni²⁺. El gen *nrsS* codifica para una proteína que presenta homología con las quinasas de histidina típicas de estos sistemas. NrsS contiene en su extremo aminoterminal un dominio con homología a las CoM reductasas, enzimas capaces de unir Ni²⁺ en su centro activo, lo que sugiere que este podría ser el dominio sensor del sistema. El gen *nrsR* codifica para una proteína que presenta homología con los factores transcripcionales de la familia PhoB/OmpR que requieren ser fosforilados por las quinasas de histidinas para unirse al DNA. Mutantes en estos genes son más sensibles a la presencia de Ni²⁺ en el medio debido a que no expresan el operón *nrs*.

1-M. García-Domínguez et al.(2000) *J. Bacteriol.* 182:1507-1514.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE *crgA*, UN REGULADOR NEGATIVO DE LA FOTOCAROTENOGÉNESIS EN *Mucor circinelloides*

Lorca-Pascual, J.M., Torres-Martínez, S. y Ruiz-Vázquez, R.

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia

Mucor circinelloides responde a la iluminación con luz azul activando la biosíntesis de carotenos. El gen *crgA* (*carotenogenesis regulatory gene*) está implicado en la regulación de la carotenogénesis por la luz. Estirpes mutantes en las que se ha eliminado el gen *crgA* mediante reemplazamiento génico, acumulan grandes cantidades de carotenos, tanto en oscuridad como en la luz. La introducción del alelo *crgA* silvestre en los mutantes nulos restaura el fenotipo silvestre para la carotenogénesis, confirmando que el comportamiento de los mutantes es debido exclusivamente a la ausencia de *crgA*. Estos datos sugieren que *crgA* actúa como regulador negativo en la fotoinducción de la carotenogénesis. El alto nivel de acumulación de carotenos mostrado por los mutantes nulos para *crgA* está directamente correlacionado con un aumento de la expresión de los genes carotenogénicos estructurales, indicando que *crgA* regula la carotenogénesis, al menos, a nivel transcripcional.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *crgA* presenta varios motivos estructurales comunes a otras proteínas reguladoras, entre ellos, un dominio RING-finger, un posible sitio de localización nuclear y un dominio de isoprenilación. Mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos, se han obtenido alelos mutantes de *crgA* afectados en residuos conservados dentro de cada uno de estos dominios. Plásmidos portadores de estas versiones mutantes de *crgA* se han utilizado para transformar mutantes nulos para *crgA*. El análisis de los transformantes obtenidos permite concluir que el dominio RING-finger es esencial para la función de la proteína CrgA en la regulación de la carotenogénesis. Recientemente se ha descrito que las proteínas RING-finger están implicadas en el proceso de ubiquitinación que marca las proteínas para su degradación por el proteosoma, actuando como ligasas de ubiquitina que reconocen sustratos específicos. La identificación de proteínas de *M. circinelloides* que interaccionan con CrgA permitirá dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la regulación por la luz de la expresión génica.

CLONACIÓN DE UNA SECUENCIA REPETITIVA INTERDISPERSA EN EL ADN SATÉLITE DE *Messor bouvieri* (HYMENOPTERA, FORMICIDAE).

T. Palomeque, J.A. Carrillo y P. Lorite.

Área de Genética, Dept. Biología Experimental. Universidad de Jaén. 23071 Jaén. E-mail: tpalome@ujaen.es

El ADN satélite de *Messor bouvieri* esta formado por monómeros de 79 pb, y de acuerdo con estudios anteriores, la misma familia de ADN repetitivo está presente en otras especies del genero. Nuevos estudios, encaminados a dilucidar las posibles causas de la baja variabilidad intra e ínter específica observada, han puesto de manifiesto la existencia de 6 clones con secuencias de 23-25 pb en su comienzo (2) o en su final (4) que no guardaban ninguna similitud con el ADN satélite. Sin embargo, existe similitud entre las mismas ya que, las que situadas al principio son inversas y complementarias respecto a las que se encuentran situadas al final de los clones. A partir de estas secuencias se diseñaron cebadores con la finalidad de amplificar la secuencia completa de ADN que interrumpía el ADN satélite.

La PCR, originó la formación de numerosas bandas, siendo las más prominentes las de 0.5, 1.3, 2 y 3 kb. Se han secuenciado las de 0.5 y 1.3 kb. La secuenciación de las primeras, determinó que están formados por dos secuencias laterales de 128 pb, con una alta similitud (90%), y palindrónicos (75%). La zona interna esta formada por ADN satélite (3 monómeros completos). Este resultado sugiere que las secuencias de 128 pb están dispersas por el ADN satélite de esta especie, interrumpiéndolo en zonas con la misma secuencia.

La secuenciación de los clones de 1.3 kb demostró que no contienen ADN satélite. Sin embargo, su comparación con la secuencia de 128 pb, parece indicar que el fragmento de 1.3 kb, es el resultado de la integración de una secuencia aproximadamente de una kb en el interior de las secuencias de 128 pb. La zona donde se produce esta integración presenta una secuencia palindrónica de ocho nucleótidos (AACATGTT). Aunque los resultados son preliminares, parecen sugerir que se trata de un elemento transponible ya que no esta insertado en todas las secuencias de 128 pb. Futuros estudios nos permitirán determinar su naturaleza y su posible papel en la evolución del genoma de hormigas.

AISLAMIENTO DE GENES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR INSERCIÓN Y TAIL-PCR

Marta P. Madrid, Antonio Di Pietro y M. Isabel G. Roncero

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba, España

Fusarium oxysporum es la especie de mayor importancia agronómica dentro del género *Fusarium*, uno de los grupos de hongos más relevantes económicamente, capaz de parasitar más de cien especies botánicas. La identificación de genes implicados en el mecanismo de patogénesis se puede abordar mediante el aislamiento de mutantes del hongo que manifiesten un comportamiento patotípico alterado y la posterior caracterización del gen responsable de ese cambio. Este enfoque puede realizarse mediante la integración aleatoria de un vector de transformación que provoque la inactivación de genes responsables del cambio patotípico. El vector de transformación utilizado y las secuencias genómicas flanqueantes pueden rescatarse del transformante y caracterizar de esa manera el gen interrumpido responsable de cambio en el patrón de virulencia del hongo. En nuestro grupo se ha obtenido un amplio número de transformantes de *F. oxysporum* portadores del marcador de resistencia a higromicina B, cuya expresión delataba la entrada y mantenimiento del DNA exógeno. Se determinó el patotipo de ciento cincuenta transformantes utilizando un ensayo en cámaras de cultivo y se identificó un transformante no patógeno. Mediante TAIL (Thermal Asymmetric InterLaced) - PCR se aislaron las secuencias flanqueantes al vector integrado, resultando ser un gen responsable de una quitinsintasa de clase V. Se está llevando a cabo la caracterización de dicho gen. Este es el primer gen perteneciente a esta clase de quitinsintasa que se descubre en *F. oxysporum*.

DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS SUBTELOMÉRICAS PRESENTES EN NEOCENTRÓMEROS DE CENTENO

S. Manzanero y M.J. Puertas

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

La actividad neocéntrica en plantas consiste en que ciertas regiones cromosómicas fuera del centrómero actúan de modo semejante a éstos, dirigiéndose hacia los polos en anafase I y II de la meiosis.

Hemos encontrado neocentrómeros en una variedad de polinización libre de centeno, que son heredables aunque muestran una intensidad variable entre células y entre individuos. En este trabajo se muestran los resultados de distintas técnicas con objeto de caracterizar las regiones con actividad neocéntrica.

Las bandas C han mostrado que todos los cromosomas del complemento son potencialmente capaces de formar neocentrómeros. Además, las regiones de heterocromatina telomérica están relacionadas con la actividad neocéntrica, pues casi siempre los neocentrómeros están en los brazos cromosómicos con banda C. Solo el 1% de los brazos cromosómicos sin banda forman neocentrómeros en anafase I y el 15% en metafase II.

Asimismo, los neocentrómeros resultaron ser positivos a la tinción de proteínas argentófilas. Nunca se observó actividad neocéntrica en los extremos de brazos cromosómicos negativos a la tinción con plata.

Se ha encontrado evidencia directa de la unión de microtúbulos a los neocentrómeros mediante inmunolocalización con el anticuerpo anti- α -tubulina, aunque la frecuencia con la que esto sucede es difícil de determinar. También se ha realizado inmunolocalización con el anticuerpo MPM2, que localiza fosfoproteínas, y por tanto marca los cinetocoros, pero en éste caso no se encontró señal en los neocentrómeros.

Por último, se llevó a cabo FISH para determinar las secuencias de DNA que están implicadas en la actividad neocéntrica, encontrándose que las secuencias repetidas subteloméricas pSc34, pSc74 y pSc200 se observan muy estiradas hacia los polos en los cromosomas con actividad neocéntrica, mientras que la secuencia telomérica de *Arabidopsis*, secuencias centroméricas de plantas y otras secuencias subteloméricas de centeno como la pSc119.2 no produce señal en el neocentrómero.

CODON USAGE OF GROUP II INTRON ORFS

A. Marín, G. Gutiérrez & S. Zimmerly¹

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

¹ Department of Biological Sciences, University of Calgary, Canada

Group II introns are self-splicing RNAs that are believed to have been ancestors of nuclear pre-mRNA introns. They are present in some genomes of mitochondria, chloroplast and bacteria, and some of them are also active retroelements due to a reverse transcriptase which is encoded within the intron.

The evolutionary relationships among G-II introns are complicated because they can be inherited horizontally as well as vertically. Horizontal transfer is suggested by an idiosyncratic distribution of introns among species and strains, and also by the observation that related introns are sometimes found in seemingly less related host genes or host organisms. In our poster we compare the compositional characteristics (G+C content and synonymous codon choices) of the intron encoded protein ORFs (IEP-ORFs) to that of the hosting gene or genome.

The DNA base composition is under the effects of mutation and functional selective constraints. It could be assumed that both, the intron and the hosting gene, are subjected to the same mutation pressure since they are replicated, repaired and transcribed by the same machinery with the same timing and the same rate. Likewise, the RNA of both hosting gene and IEP is translated in the same environment under the same constraints. Thus, this system provides an interesting opportunity to follow the evolution of putative horizontally transferred DNA: After the transfer event, the evolution of the G-II intron DNA should occur in parallel with the hosting native DNA and, in the long run, it is expected that the donor compositional vestiges will disappear, as the foreign DNA is ameliorated by the local processes.

Our results show that there is a broad variation in the base composition among IEP-ORFs which parallels, at both synonymous and replacement sites, that of their hosting genes or genomes, this suggesting that the composition of IEP-ORFs have been ameliorated in their present location. However, the synonymous codon choices do differ between IEP-ORFs and hosting genes, and this might be interpreted as vestiges of original genome signatures not yet erased by the local constraints.

PRIMEROS RESULTADOS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DEL GEN PrP EN LAS RAZAS OVINAS RASA ARAGONESA Y RASA NAVARRA.

Martín-Burriel, I.*; Acín, C.#; Rodellar, C.*; Monleón, E.#; Badiola, J.J.#; Zaragoza, P.*

* Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Centro Nacional de Referencia de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

En la Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET) que afecta al ganado ovino y caprino (scrapie) el genotipo del gen PrP parece ser el factor principal asociado a la incidencia y al periodo de incubación de la enfermedad. El genotipo del animal, principalmente el de los codones 136, 154 y 171, nos indica el riesgo a padecer esta enfermedad. Por ello la propia UE recomienda su introducción como un valor más en los índices de selección del ganado, de forma que los programas de mejora pueden servir para luchar contra la enfermedad.

En el trabajo que presentamos se han analizado 93 individuos pertenecientes a las razas Rasa Aragonesa y Rasa Navarra. Las muestras correspondientes a esta última población pertenecían a un rebaño en el que, previamente a este estudio, se habían detectado animales positivos para scrapie. De los animales que presentaban la sintomatología de la enfermedad se tomó, además de sangre para el genotipado de PrP, médula oblonga (obex) para realizar el diagnóstico de scrapie mediante inmunohistoquímica.

El genotipado de los codones 136 y 154 se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 362 pb que contiene ambos codones y posterior digestión con la enzima de restricción BspHI. De esta manera podemos diferenciar los alelos V y H de los codones 136 y 154, respectivamente. Para el testaje del codon 171 se llevó a cabo con una amplificación alelo-específica y posterior digestión con las enzimas BslI y AccI para identificar los alelos R y Q respectivamente.

Tras los análisis inmunohistoquímicos, ningún animal resultó positivo para scrapie. Una vez realizado el genotipado, se calcularon las frecuencias alélicas para cada codón y las frecuencias haplotípicas en cada una de las poblaciones analizadas.

SISTER CHROMATID EXCHANGES: A ROLE FOR TOPOISOMERASES?

Santiago Mateos*, Inmaculada Domínguez, Nuria Pastor, Felipe Cortés

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain

The role of topoisomerases in fundamental processes involving DNA metabolism has been shown to outpace by far the initial expectations. It is well known that DNA topoisomerases are involved in relaxation of chromatin to relieve tension during DNA replication and transcription, as well as for recombinational processes and chromosomal segregation and condensation. However, the possible role of these enzymes in other biological processes is still a matter of discussion. Sister chromatid exchange (SCE) is the cytological manifestation of double-strand breakage of sister chromatids, at supposedly the same locus, and exchange and rejoining of the subunits. This recombinational process, that can take place spontaneously to some extent but is highly sensitive to base damage in DNA, occurs through an as yet unknown molecular mechanism, though some favoured models have proposed the possible participation of DNA topoisomerase II in the molecular mechanism of SCEs.

In order to clarify the role of this enzyme, if any, in such recombinational event, CHO parental AA8 and mutant EM9 cells, which shows an extremely high baseline frequency of SCE, have been treated with different doses of the non-poisoning topoisomerase inhibitors ICRF-193, a bisdioxopiperazine and bufalin. The frequencies of SCEs after the treatments have been determined and the inhibitory effect of these compounds has been assessed by DNA gel electrophoresis using a topoisomerase II activity assay. The results indicate that ICRF-193 and bufalin effectively inhibit topo II activity in AA8 and EM9 cell lines. ICRF-193 induced a moderate increase in the frequency of SCEs in both types of cells, while bufalin did not modify the level of SCEs in any of them. The results are discussed taking into account the apparently unlike mechanisms of inhibition of topoisomerase II by ICRF-193 and bufalin.

Keywords: SCEs; Topoisomerase II; ICRF-193; Bufalin

* smateos@cica.es

OBTENCIÓN DE MUTANTES EN *ASHBYA GOSSYPHII* POR TRANSPOSICIÓN

L. Mateos, J. L. Revuelta y M.A. Santos

Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca,
37007 Salamanca. E-mail: gemail@gugu.usal.es

El hongo hemiascomiceto *A. gossypii* es un organismo haploide con un crecimiento micelial. Sus hifas cenocíticas y tabicadas albergan un gran número de vacuolas en las que se acumula vitamina B₂. La concentración que esta vitamina alcanza en el interior de la vacuola es tan elevada que además de conferir al micelio un color amarillo-anaranjado propio del hongo, también es responsable de la aparición de cristales. Esta propiedad natural ha convertido a *A. gossypii* en uno de los principales organismos flavinogénicos empleado, actualmente, por la industria para la producción de vitamina B₂.

El desconocimiento o la ausencia de un ciclo sexual en *Ashbya* ha limitado el desarrollo de técnicas genéticas clásicas quedando relegado cualquier enfoque genético a la aplicación exclusiva de técnicas moleculares. Estas técnicas en *Ashbya* consisten básicamente en la manipulación del DNA, transferencia de moléculas lineales e integración de las mismas en el genoma por un proceso de recombinación homóloga. Haciendo uso de estas técnicas, hemos desarrollado un método de mutagénesis que consiste en el empleo de un sistema de transposición *in vitro*. El tratamiento exhaustivo de DNA genómico con una transposasa y el transposón artificial *kanMX4-ColeI* genera una colección de moléculas mutantes. Cada molécula deriva de uno o varios sucesos de transposición en la que el transposón se inserta al azar en secuencias TA de un fragmento circular de tamaño variable de DNA genómico. La selección de moléculas mutantes por transformación en bacteria ha permitido obtener una población de clones mutantes que contine todo el genoma de *Ashbya* con al menos una mutación cada 1000 pb. La transformación del hongo con esa genoteca de DNA mutagenizado previamente linearizado permitirá obtener mutantes en *Ashbya*, seleccionar fenotipos de interés e identificar el gen o los genes responsables de los nuevos fenotipos.

DETECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES (ISSR) LIGADOS A LOS GENES DE TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO.

M. Matos², M. V. Camacho¹, O. Pinto-Carnide² y C. Benito¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad Complutense, Madrid

²Departamento de Genética y Biotecnología. Universidad de Tras-os-Montes e Alto Douro, Vila Real (Portugal)

El centeno es uno de los cereales más tolerantes al aluminio. Existen al menos tres genes diferentes situados en los cromosomas 3R, 4R y 6R que confieren tolerancia al aluminio. Los genes *All1* y *All3* muestran una herencia mendeliana dominante y han sido localizados en los brazos cromosómicos 6RS y 4RL, respectivamente.

Existen varios marcadores bioquímicos (Lap1, Aco1) y moleculares (OpR01₆₄₀, OpB15790, OpB03₆₅₅ y Opa08₄₅₁) ligados al gen *All1* en el cromosoma 6R y un marcador molecular (OpS14₇₀₅) ligado al gen *All3* en el brazo 4RL. Todos estos marcadores son RAPDs obtenidos mediante análisis de bloques que posteriormente se han convertido en SCARs.

En el presente trabajo hemos analizado la tolerancia al aluminio en dos F₂ obtenidas entre el cultivar de centeno Ailés y la línea consanguínea de centeno Riodeva. En una de las F₂ la segregación de la tolerancia al aluminio fue 3:1 (AR1-25) y en la otra fue 15:1 (AR1-6). En esta última, existen dos genes independientes de tolerancia segregando. Mediante análisis de bloques de plantas tolerantes y sensibles de ambas F₂ hemos detectado un total de cuatro nuevos marcadores ISSR obtenidos con los cebadores 811, 812 y 881 que se comportan como ligados a los genes de tolerancia al aluminio. Uno de los ISSR analizados se comporta como ligado en ambas descendencias, indicando este resultado que uno de los genes de tolerancia que segrega es común en ambos cruzamientos.

En este momento, se han aislado los ISSR que se comportan como ligados, se están secuenciado y se están diseñando parejas de cebadores específicos para cada uno de ellos.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS ADN SATÉLITE EN CINCO ESPECIES DEL
GÉNERO *Mytilus*

Méndez, J.; Rodríguez-Fariña, F.; González-Tizón, A. & Martínez-Lage, A.

Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidade da Coruña, A Zapateira
s/n. 15071 A Coruña

Los ADN satélites son secuencias repetidas en tándem, localizadas generalmente en regiones cromosómicas de heterocromatina constitutiva y que muestran gran variabilidad en su composición nucleotídica, frecuencia de reiteración y distribución. Aunque su función no está clara, se han utilizado en estudios filogenéticos, ya que suelen mostrar una homogeneidad intraespecífica muy alta, mientras que la variabilidad interespecífica aumenta en función directa con la distancia filética.

En este trabajo hemos analizado un ADN satélite en cinco especies de mejillones pertenecientes al género *Mytilus*. La longitud de la unidad monomérica es de 167pb y el contenido de A+T de alrededor del 55%. Estas secuencias constituyen aproximadamente el 0.018% del genoma en *M. edulis*, *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, siendo algo más elevada (0.11%) en *M. trossulus* y *M. californianus*. Mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, hemos observado su localización en regiones próximas al telómero en al menos tres pares cromosómicos. Así mismo, el análisis de estas secuencias revela que las mutaciones más frecuentes son las sustituciones nucleotídicas, no encontrándose agrupadas en regiones específicas.

El cálculo de las distancias genéticas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura revela que los clones de *M. californianus* son los más divergentes con respecto al resto de especies. La aplicación de diferentes métodos de inferencia filogenética muestra las relaciones entre los distintos clones analizados.

Financiación: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (FEDER, 11F97-1295).

LOCALIZACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A ANTRACNOSIS EN EL MAPA GENÉTICO DE *Phaseolus vulgaris* L.

B Méndez de Vigo¹, C Rodríguez¹, A Pañeda¹, P Garre, R Giráldez¹, JJ Ferreira²

(1) Área de Genética, Dpto. Biología Funcional, Universidad de Oviedo,

(2) SERIDA, 33300, Villaviciosa, Asturias

La antracnosis es una enfermedad de la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), producida por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.& Magn) Scrib., para la que se han descrito hasta ahora nueve genes de resistencia (*Co-1* a *Co-9*), la gran mayoría dominantes.

El objetivo del presente trabajo es la localización de estos genes en un mapa genético de *Phaseolus vulgaris* L en desarrollo, a partir de la F2 del cruzamiento entre las líneas A25 (línea derivada de la variedad Andecha, perteneciente al tipo faba granja asturiana) y A252.

La localización de los genes de resistencia *Co-1*, *Co-2*, *Co-4* y *Co-6* en los grupos de ligamiento 1H, 11J, 8F y 7A, respectivamente, se llevó a cabo mediante la utilización de marcadores moleculares descritos por otros autores como ligados a tales genes.

Por otra parte, la comparación entre isolíneas y/o la aplicación del método BSA en generaciones avanzadas derivadas de un programa de retrocruzamientos para la introducción de resistencia a antracnosis en la var. Andecha (tipo faba asturiana), permitió la identificación de un nuevo gen de resistencia presente en una de las líneas mejoradas (A1239) en el grupo de ligamiento 11J, próximo al gen *Co-2*, y la localización en el grupo de ligamiento 4B de un gen de resistencia presente en las líneas mejoradas A1231 y A1220). La realización de las correspondientes pruebas de complementación permitió establecer la existencia de ligamiento absoluto y/o identidad, entre este último gen y los genes de resistencia *Co-3* y *Co-9*.

Por último, se ha desarrollado un SCAR (SB12), obtenido a partir del RAPD ROpB12³⁵⁰, ligado a estos genes situados en el cromosoma 4B.

CONSERVACIÓN DE DOS POBLACIONES DE *APIS MELLIFERA* DE LA ISLA DE LA PALMA Y DEL PIRINEO OCCIDENTAL: CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL Y ADN MICROSATÉLITE.

I. Miguel¹, L. Garnery², A. Estonba¹

¹Animali Biología eta Genetika Dpta, UPV/EHU, Bilbao. ²Lab. populations, génétique et évolution, CNRS, Gif-sur-Yvette

El presente trabajo se enmarca en dos proyectos destinados a la conservación de la abeja local en la Isla de la Palma de Gran Canaria y en el Pirineo Occidental.

Se ha realizado el análisis del ADN mitocondrial mediante PCR-RFLP de 421 colonias procedentes de dos poblaciones aisladas de Gipuzkoa (Oñati) y Navarra (Goizueta) y de 498 colonias de poblaciones africanas de la Isla de La Palma. Además, se han analizado 10 loci de ADN microsatélite para un total de 204 muestras de Oñati y Goizueta.

Los valores obtenidos de diversidad en las poblaciones estudiadas se encuentran dentro del rango de variación observado hasta hoy en poblaciones de *Apis mellifera*. Destaca la presencia en La Palma de los dos haplotipos mitocondriales endémicos de las islas canarias (A14 y A15), siendo muy alta la incidencia de A15 ($p_{A15} \cong 0,5$). Respecto a Oñati y Goizueta, se ha detectado la presencia de dos haplotipos M nuevos (M30 y M31), descritos por vez primera en poblaciones del Oeste Europeo. Dada su baja frecuencia podríamos considerarlos alelos raros.

Los análisis de distancias sitúan la abeja del Pirineo Occidental dentro de la subespecie *A.m.mellifera* (tronco evolutivo M), y, respecto a las poblaciones de La Palma, aunque se agrupan con el tronco evolutivo africano, se aprecia su diferenciación de las subespecies del continente africano geográficamente más próximas a la Isla.

Tanto en la isla de La Palma como en el Pirineo Occidental existen reductos de abejas autóctonas: si bien, en la isla de La Palma el nivel de hibridación medio es de 11'5%, en la zona noreste no se detecta la presencia de abejas autóctonas. Respecto al Pirineo Occidental, el valor de tasa de hibridación obtenido en Oñati y Goizueta es muy bajo (1-2%). Ante estos resultados podríamos considerar que estas tres áreas son apropiadas para la conservación de la abeja local. Este estudio será completado mediante el análisis genético con nuevos marcadores moleculares, morfométricos y eco-etológicos.

EN LOS CROMOSOMAS A DE MAÍZ HAY ALELOS QUE PROMUEVEN LA ELIMINACIÓN DE LOS BS

F. Molina, M. Chiavarino, M. Rosato, M. González-Sánchez, E. González-González y M.J. Puertas

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Se realizaron cruzamientos $1B \times 0B$ en maíz de modo que el B siempre se transmitió por el parental femenino. De estos cruzamientos se seleccionaron genotipos de alta (H) y baja (L) transmisión de cromosomas B (Bs). En los cruces $1B(H) \times 0B(H)$ la transmisión del B se mantiene a tasa mendeliana, mientras que en los cruces $1B(L) \times 0B(L)$ los Bs tienden a perderse.

También se realizaron cruzamientos $1B(H) \times 0B(L)$, para obtener híbridos HL en los que el B pertenece a la línea H, y cruces $1B(L) \times 0B(H)$ para obtener híbridos LH en los que el B es de la línea L. En las descendencias se puede comprobar si la transmisión de los Bs depende de la procedencia del B o, por el contrario depende de los cromosomas A (As). Los resultados mostraron que en ambos tipos de híbridos la transmisión de los Bs fue baja, igual a la transmisión del parental L.

Se puede deducir que la tasa de transmisión baja se comporta como dominante, y por tanto debe actuar a nivel diploide. También se deduce que el control de la tasa de transmisión de los Bs depende de los As, ya que si dependiera de los Bs el híbrido HL con Bs de H habría mostrado transmisión alta.

Gracias a una sonda específica del cromosoma B de maíz se ha estudiado, mediante hibridación *in situ*, la meiosis de las líneas y los híbridos y se ha encontrado que en los fenotipos de baja transmisión el cromosoma B se retrasa en la meiosis y se pierde en las microsporas.

En el vecino panel de E. González-González y col., se demuestra que en cruces donde los Bs se transmiten por el lado masculino, se detectan alelos en los As que promueven la fecundación preferente del núcleo espermático que lleva Bs. Nuestros datos en conjunto muestran que el polimorfismo para Bs del maíz está controlado por alelos que tienden a promover su transmisión por el lado masculino y alelos que tienden a eliminarlos por el lado femenino.

INDEPENDENCIA DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *gid* Y EL CICLO CELULAR DE *Escherichia coli*

Molina Rodríguez, Felipe; Jiménez-Sánchez, Alfonso; Elena C Guzmán

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Extremadura, Badajoz 06080

Se ha especulado sobre la posible relación entre el ciclo celular de *Escherichia coli* y la transcripción de los genes *mioC* y *gid* que flanquean el origen de replicación de su cromosoma.

En trabajos previos (1) mostramos que inserciones cromosómicas en las proximidades de *oriC* producen un aumento del tiempo requerido para replicar el cromosoma (periodo C) y una disminución de la velocidad de crecimiento (μ); existiendo una relación entre la posición y el efecto de las inserciones sobre la replicación, pudiendo definirse un entorno de unas 2 Kpb alrededor de *oriC* donde las inserciones perturban el ciclo celular. Fuera de este límite las inserciones carecen de efecto sobre el mismo.

El objetivo de este trabajo era analizar la posible influencia del aumento de los niveles de transcripción de *gid* en el ciclo celular de *E. coli*.

Para ello se integró, el promotor del operón *lac* en *gid*, de modo que puede modularse el nivel de transcripción de *gid* por la adición de IPTG al medio.

El análisis de los parámetros del ciclo celular muestra que la inserción de *plac* en *gid* produce una disminución de la velocidad de crecimiento de hasta un 44% y de la velocidad de replicación cromosómica de hasta un 51%. Sin embargo este efecto es independiente de los niveles de IPTG en el medio.

Considerando el patrón de expresión en el ciclo y la orientación con respecto a *oriC* de *mioC* y *gid* puede concebirse un mecanismo que equilibre el exceso de transcripción de *gid* debido a la adición de IPTG. Para evaluar la existencia de este tipo de homeostasis se construyó el doble mutante *mioC::gid::plac* en el que se impide la transcripción de *mioC* y puede modularse la de *gid*.

El doble mutante muestra la independencia entre la transcripción de *gid* y los parámetros del ciclo celular C y τ . Sin embargo, sorprendentemente, las velocidades de crecimiento y replicación cromosómica son idénticas a la de la estirpe silvestre.

Estos resultados corroboran la relación entre posición y efecto de las inserciones y apuntan el posible requerimiento de una cierta relación de simetría en torno a *oriC* para la consecución de un ciclo celular óptimo.

1. Molina F., Jiménez-Sánchez A., Zyskind J.W., Guzmán E.C. 1999. "Chromosomal insertions localized around *oriC* affect the cell cycle in *Escherichia coli*". *Biochimie* 81:811-818

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN *nrdHIEF* DE *Escherichia coli*

Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Pueyo, C.

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

Los operones *nrdAB* y *nrdHIEF* codifican en *Escherichia coli* la síntesis de las ribonucleótido reductasas NrdAB y NrdEF, respectivamente. Se ha postulado que la síntesis de desorribonucleótidos en aerobiosis la cataliza mayoritariamente la enzima NrdAB; NrdEF sería una proteína críptica sin función aparente. Mediante retrotranscripción y PCR múltiple hemos cuantificado *in vivo* los niveles del transcrito *nrdHIEF* y determinado las condiciones de crecimiento y circunstancias de estrés bajo las que la expresión de estos genes podría ser requerida en *E. coli*.

Los niveles basales del transcrito *nrdHIEF* variaron espectacularmente en función de la fase de crecimiento y la composición del medio de cultivo: los niveles mas bajos se observaron en bacterias crecidas en medio nutritivo hasta fase estacionaria; comparativamente las bacterias al comienzo de la fase exponencial o crecidas en medio mínimo presentaron niveles entre 25 y 75 veces superiores. Estas variaciones se explican en base a la necesidad de la síntesis *de novo* de los sillares de construcción del DNA. De acuerdo con esta hipótesis, bacterias mutantes sin tiorredoxina I y glutarredoxina I (los dos principales reductores de la enzima NrdAB) presentaron niveles basales de *nrdHIEF* >100 veces superiores a los del tipo silvestre.

Los niveles del transcrito *nrdHIEF* se dispararon también en situaciones de estrés oxidativo, particularmente en bacterias sin hidroxidasa I y alquilhidroperóxido reductasa (70 veces), y en células tratadas con oxidantes (hasta 23 veces en bacterias crecidas en medio mínimo). El mecanismo que regula la expresión de *nrdHIEF* está aún por descubrir, aunque nuestros datos excluyen la participación de conocidos reguladores como RpoS, Fis, AMPc, OxyR, SoxR/S o RecA. Dado que no apreciamos diferencias entre los niveles basales de los 4 genes que configuran la unidad transcripcional *nrdHIEF*, postulamos una estrecha co-regulación de los genes que codifican la reductasa y los que codifican su reductor específico (la redoxina NrdH) y la proteína NrdI capaz de estimular *in vitro* la reducción de ribonucleótidos.

Financiación: PB98-1627

IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE ANCHOA (*Engraulis encrasicolus*) UTILIZANDO SSCPS.

Morán P y Fidalgo M

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología.
Universidad de Vigo, 36200 Vigo.

El objetivo del trabajo es la búsqueda de un marcador genético que permita la identificación de la anchoa (*Engraulis encrasicolus*) de origen Mediterraneo y anchoas de origen Atlántico y Cantábrico. La anchoa es un pez pelágico pequeño común en la zona del noroeste del Mediterraneo así como del mar negro y de las costas atlánticas de Africa y Europa llegando incluso a la zona sur del Atlántico norte. Como material de partida en este estudio se utilizan cuatro muestras de 30 individuos cada una pescadas en las dos zonas indicadas.

Dado que los marcadores genéticos son estimadores de la variación en la secuencia de nucleótidos es más rápido y económico la utilización de técnicas que estimen esta variación, las SSCPs (single-stranded conformation polymorphism) son un método de estimación de la diversidad nucleotídica basado en las diferencias de migración de las cadenas de DNA con diferente composición de pares de bases en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y posterior visualización mediante tinción con plata (revisión del método en Sunnucks y col 2000).

Para el análisis de las muestras de referencia se han diseñado a partir de secuencias consenso dos oligonucleótidos que permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pb de la región 5' del citocromo b del DNA mitocondrial mediante PCR. El análisis de estos fragmentos indican 4 tipos de patrones que han sido secuenciados para revelar la diferencia exacta en pares de bases. No se ha detectado hasta la fecha ningún patrón exclusivo de uno de los tipos de anchoas sino que son diferencias en frecuencias. Los próximos análisis pasan por la obtención de más muestras representativas de los dos grupos y el análisis de un mayor número de secuencias del genoma mitocondrial.

VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL GÉNERO *Asparagus*

Moreno, R.¹, Espejo, J.A.², Cubero, J.I.¹, Millán, T.¹ y Gil, J.¹

(1) Dpto. Genética, Univ. de Córdoba

(2) Consejo Regulador Denominación Específica Espárrago de Huétor Tájar (Granada)

La variabilidad genética de cuatro especies del género *Asparagus* (*A. acutifolius*, *A. albus*, *A. horridus* y *A. officinalis*) ha sido analizada mediante marcadores RAPD. *A. acutifolius*, *A. albus* y *A. horridus* son especies silvestres, la primera tetraploide y las otras dos diploides y *A. officinalis* es la especie cultivada. Las especies silvestres estuvieron representadas cada una por una población de aproximadamente 25 individuos y las cultivadas por una variedad población española tetraploide (n=53) y cinco variedades comerciales diploides (n=11). Diez cebadores de 10 oligonucleótidos fueron utilizados para la obtención de marcadores RAPD, obteniéndose un total de 191 marcadores polimórficos en el total de muestras analizadas. Se construyó una matriz binaria de 1 y 0 (presencia y ausencia) para el total de marcadores e individuos analizados, a esta se le aplicó el índice de Jaccard obteniéndose una matriz de similitud y mediante el método de agrupamiento UPGMA se obtuvo un dendograma. Se distinguen claramente 4 grupos principales correspondiendo cada uno a cada una de las especies estudiadas. La mayor diversidad genética fue encontrada en la especie tetraploide *A. acutifolius* y dentro de la población local española de *A. officinalis*, también tetraploide. Dentro de las cultivadas (*A. officinalis*) la variedad española se encontró bastante alejada de las variedades híbridas comerciales. Se ha encontrado un marcador monomórfico específico de la variedad local española que no se encuentra en ninguna de las variedades comerciales estudiadas.

UTILIZACIÓN DE LÍNEAS HAPLOIDES DUPLICADAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE TRITICALE

Muñiz, Luis M.; Jouve, Nicolás y González, Juan M.

Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Biología. Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares (Madrid). e-mail. juanm.gonzalez@uah.es

Las plantas haploides duplicadas obtenidas por androgénesis *in vitro* tienen un gran número de aplicaciones. Desde un punto de vista práctico, permiten acortar sustancialmente los ciclos de mejora con respecto a las técnicas tradicionales de retrocruzamiento o autofecundación, al reducir el número de generaciones necesarias para obtener una línea homocigota. Estas líneas haploides duplicadas tienen otros usos desde un enfoque más básico. Así, son un buen material para llevar a cabo la construcción de mapas genéticos. En este trabajo se presenta un mapa genético de triticale, empleando marcadores moleculares (RAPD, AFLP y RAMP) obtenido a partir del análisis de una colección de líneas haploides duplicadas, derivadas del híbrido entre las variedades 'Torote' y 'Presto', mediante androgénesis *in vitro*. Se han detectado distorsiones en la segregación de ciertos marcadores con respecto a la segregación mendeliana. Se discute sobre la utilidad de estas líneas para la elaboración de mapas genéticos y del ligamiento de algunos de estos marcadores con regiones del genoma que contengan genes implicados en la respuesta androgenética.

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLANTAS REGENERADAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* MEDIANTE ANÁLISIS CITOLÓGICO

Gloria Muñoz, Ana María Vázquez, Francisco Javier Espino

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

En este trabajo se han utilizado dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, Columbia (Col) y Landsberg erecta (Ler).

Mediante el cultivo de tejidos se han obtenido plantas regeneradas en ambos ecotipos. Para el análisis citológico de las plantas regeneradas se seleccionaron 50 plantas de cada ecotipo. El método utilizado ha sido el de tinción con DAPI y posterior extensión de los núcleos de dos o más hojas de las plantas regeneradas. También se llevó a cabo un estudio similar en plantas diploides de ambos ecotipos, que no habían pasado por cultivo, así como en plantas tetraploides de la línea CS3151 del ecotipo Col. En todos los casos se analizaron 500 núcleos por hoja, contándose en cada uno el número de cromocentros, el cual se debe de corresponder con el número de cromosomas, esto es 10, aunque en ocasiones se pueden contabilizar algunos extras, que podrían corresponderse con las zonas NOR, con lo que el número máximo esperado sería de 14. Los núcleos de las plantas controles diploides presentaron un número de cromocentros que oscilaba entre 6 y 14 mientras que en la línea tetraploide el número de cromocentros oscilaba entre 16 y 24.

En Col el 40% de las plantas regeneradas presentó en sus hojas algún núcleo del tipo $4n$, oscilando su frecuencia entre un 0,2% y un 9%, mientras que en Ler las plantas con núcleos $4n$ eran el 64% de las regeneradas, siendo la frecuencia de dichos núcleos de entre 0,2% y 4,8%. Las pruebas estadísticas empleadas indican que globalmente el ecotipo Ler es algo más inestable en cultivo que el ecotipo Col. Por otra parte, dado que no se ha encontrado ninguna planta tetraploide sólida, es probable que dichas alteraciones sean inducidas por el cultivo durante el desarrollo de la hoja, de manera que éste quede afectado generándose en algunos casos una pequeña población de células que han duplicado el número de sus cromosomas.

MUTACIONES QUE INCREMENTAN LA LONGEVIDAD Y LA
TERMOTOLERANCIA EN *CAENORHABDITIS ELEGANS*.

Manuel J. Muñoz (1) y Donlad L. Riddle(2)

(1)Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. mmunrui@dex.upo.es

(2)University of Missouri, Columbia. E.E.U.U.

El gusano *Caenorhabditis elegans* es el primer organismo donde se han aislado mutantes que incrementan la longevidad. Mutaciones en *daf-2*, un gen homólogo al receptor de insulina humano y *age-1*, la subunidad catalítica de una fosfoinositol 3-quinasa, producen una duplicación de la longevidad con respecto a un silvestre, así mismo, estos mutantes producen un incremento de la resistencia a estrés térmico.

Para aislar nuevos elementos que regulan este proceso hemos buscado mutantes termotolerantes, con la idea de aislar mutantes longevos similares a *daf-2* y *age-1*. De un total de 64 mutantes termotolerantes, 49 mostraron un incremento de longevidad significativo. Siete de ellos fueron alelos de *daf-2* y cinco alelos de *age-1*. Los otros 37 están afectados en genes distintos. A estos genes los denominamos *liv* (Long lived and viable after heat shock). En este trabajo mostraremos los fenotipos de varios de estos mutantes.

CARACTERIZACIÓN DE *MTL*, UNA NUEVA GTPASA IMPLICADA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD PLANA EN *DROSOPHILA*

Silvia Muñoz Descalzo¹, Azucena Gómez-Cabrero¹, Marek Mlodzik² y Nuria Paricio¹.

1: Departamento de Genética/Fac.CC Biológicas, Universidad de Valencia: Avd. Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, España.

2: Department of Cell Biology and Anatomy, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA.

Los tejidos polarizan sus epitelios no sólo en el eje apical-basolateral, sino que también presentan polaridad dentro del plano del epitelio. En *Drosophila*, todos los tejidos adultos derivados de los discos imaginales presentan polaridad epitelial plana (PEP). En el ojo de *Drosophila*, la PEP está reflejada en la ordenación de los omatidios con simetría especular con respecto a la línea media dorso-ventral (el ecuador). Este patrón se genera posteriormente al paso del surco morfogenético, cuando las agrupaciones de omatidios rotan 90° adoptando quiralidad opuesta dependiendo de su posición ventral o dorsal. En el ala, cada célula se orienta a lo largo del eje próximo-distal, generando un pelo en el extremo distal. La generación de la PEP en *Drosophila* es un buen modelo para estudiar rutas de señalización mediadas por el receptor transmembrana Frizzled. Estudios genéticos y bioquímicos han indicado que la ruta de PEP por debajo de Fz incluye Dsh y pequeñas GTPasas de la subfamilia Rho que actúan como interruptores celulares y lleva a la activación de un módulo MAPK tipo JNK.

En este trabajo presentamos la caracterización de una nueva GTPasa de la familia Rho de *Drosophila* denominada *mtl*, muy similar a la GTPasa Mig-2 de *C. elegans*. Presentaremos la estructura del gen y su patrón de expresión en embriones y discos imaginales. La expresión ectópica de *mtl*, así como de formas mutantes de esta GTPasa producen defectos típicos de polaridad en ojo y ala. Por ello, hemos estudiado las relaciones entre el nuevo gen y otros componentes de la ruta de transducción de señal Fz/Dsh. Todos los resultados obtenidos sugieren que esta nueva GTPasa parece estar implicada en el establecimiento de la PEP en el ojo y ala de *Drosophila*.

CARACTERIZACIÓN DEL DESEQUILIBRIO GAMÉTICO ENTRE LOCI
PROTEICOS DEL CROMOSOMA 3 DE *Drosophila melanogaster*

Núñez, C., Velasco, V. y Zapata, C.

Departamento de Biología Fundamental, Universidad de Santiago de Compostela

Desde la década de los 60, ha tenido lugar un importante desarrollo experimental encaminado a conocer los niveles de desequilibrio gamético (DG) entre loci alozímicos en poblaciones de muchas especies. Sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos realizados, especialmente en especies del género *Drosophila*, todavía no se conoce con exactitud la frecuencia, intensidad y distribución de las asociaciones no al azar a lo largo de los cromosomas. Ello se debe, fundamentalmente, al escaso número de loci analizados y a las limitaciones metodológicas y estadísticas de dichos trabajos. En el presente estudio, hemos caracterizado el DG entre pares de 15 loci proteicos situados a lo largo del cromosoma 3 de *Drosophila melanogaster* a partir de una elevada muestra de haplotipos extraída de una única población natural (Santa Cruz de Rivadulla). Nuestros resultados sugieren una mayor importancia de las asociaciones no al azar de lo que reflejaban los estudios previos. Así, se detectó DG de moderada intensidad ($D^*(+) = 0,301 \pm 0,057$) en el 30% de los pares de loci analizados. Además, el DG entre pares de loci proteicos presenta una amplia, aunque no uniforme, distribución a lo largo de todo el cromosoma 3 de *D. melanogaster*. Así, aunque la frecuencia de las asociaciones no al azar tiende a ser mayor entre loci estrechamente ligados (≤ 2 cM), también se detectó desequilibrio entre pares de loci separados por elevadas frecuencias efectivas de recombinación (20,1 cM). Destaca el hecho de que una fracción importante de los desequilibrios interalélicos significativos incluye pares de loci relacionados funcionalmente (67%). Esto sugiere que la selección natural, probablemente selección epistática actuando sobre loci relacionados funcionalmente, juega un papel fundamental en el mantenimiento del DG entre loci proteicos. Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas respecto a la distribución de las asociaciones no al azar a lo largo de los cromosomas.

Searching for protein interactions between gene products of the Geminivirus TYLCV and its vector *Bemisia tabaci* using the "Yeast Two Hybrid System"

Stephanie Ohnesorge, Gabriel Morilla & Eduardo R. Bejarano

Dept. Genética, Fac. Ciencias, Universidad de Málaga, Spain

In the circulative, non-propagative transmission pathway of TYLCV through its vector the whitefly *Bemisia tabaci* the molecular mechanisms are barely not studied. The specific adhesion of the coat protein at structures of the insect, the involved mechanism in the essential membrane passage in the insect and a proposed replication of the virus in the vector are not well determined.

To isolate insect proteins, which are involved in transmission through an interaction with viral proteins we propose to use the genetic method of "Yeast Two Hybrid Screen" (Y2HS). The first step to set up the screens was the construction of a cDNA library, cloned in the appropriate vector for this system. For the isolation of the total RNA of the whitefly a new method was set up. From the obtained mRNA, cDNA was synthesised, ligated in the plasmid pGADT7 (Clontech) and transformed into bacterias to amplify the plasmid DNA. The number of independent clones and average size of the inserts were determined. The obtained cDNA library was used to set up screens with the gene products of C1 and V2 of different TYLCV isolates

ARQUITECTURA DE UN FACTOR TRANSCRIPCIONAL BACTERIANO DE TIPO HMGA

Padmanabhan S*, Elías-Arnanz M*, Carpio E[†], Aparicio P[†] y Murillo FJ*

*Dpto. Genética y Microbiología, [†]Area de Inmunología, Univ. Murcia

El factor transcripcional CarD de la bacteria *Myxococcus xanthus* participa en al menos dos procesos independientes: la síntesis de carotenos inducida por luz azul y el ciclo multicelular de desarrollo. Es el único ejemplo conocido de una proteína procariótica con el motivo de unión al DNA denominado "gancho-AT", adyacente a un motivo muy ácido, ambos característicos de los factores arquitectónicos eucarióticos HMGA. Además, la proteína CarD presenta una región N-terminal de función desconocida que no aparece en las proteínas HMGA.

Hemos determinado la presencia de dos dominios estables en la proteína CarD purificada: (i) el dominio N-terminal, que presenta estructura secundaria y terciaria; (ii) el dominio constituido por la región ácida y los ganchos AT (la región HMGA) que, al igual que en sus contrapartidas eucarióticas, no muestra una estructura definida.

Nuestros ensayos de unión al DNA demuestran que CarD presenta la misma especificidad que las proteínas HMGA eucarióticas. Además, la región HMGA de CarD sola se une al DNA con la misma especificidad y afinidad que la proteína completa, lo que sugiere que el dominio N-terminal no está implicado en esta función de la proteína. Aunque el papel de este último dominio, estable y estructurado, es todavía desconocido, cabe plantearse la hipótesis de que promueva la interacción con la polimerasa de RNA, dada su homología con una región de las proteínas TRCFs que interacciona con dicha polimerasa. Experimentos en progreso permitirán investigar la validez de esta hipótesis.

La región ácida de CarD ejerce un papel estabilizador de la proteína, mediante su interacción con la región básica. Además de este efecto estabilizador, la región ácida modula la unión de CarD al DNA mediante su fosforilación por la quinasa II de caseína, como ocurre en las HMGA eucarióticas.

INFLUENCIA DEL TAMAÑO Y DENSIDAD DE LAS MICROPARTÍCULAS Y DEL CULTIVO *IN VITRO* SOBRE LA TRANSFORMACIÓN DE TRIGO

M. José Páez, Antonio Martín, Francisco Barro

Instituto de Agricultura Sostenible (C.S.I.C.)

Alameda del Obispo, s/n. 14080-Córdoba.

La transformación génica es una potente herramienta para introducir nuevas características agronómicas en las plantas cultivadas a partir de especies no relacionadas genéticamente. En cereales, y especialmente en trigo su aplicación practica está fuertemente limitada por la baja eficiencia de transformación. El objetivo del presente trabajo es determinar la influencia de varios parámetros sobre la transformación de trigo. Para ello se ha empleado el bombardeo con micropartículas para transformar escutelos de embriones inmaduros de trigo. Se ha utilizado el plásmido pAHC25 que contiene los genes *bar*, que proporciona resistencia a la fosfotricina (PPT), y *uidA*, que codifica para la enzima β - glucuronidasa. Entre los parámetros que se han estudiado se encuentran: el tamaño y densidad de las micropartículas, la presión de disparo, y el efecto sobre la regeneración y selección de plantas transgénicas de tres tipos de azúcares (fructosa, maltosa y sacarosa). La identificación de las plantas transgénicas se ha realizado mediante PCR y ensayos histológicos para detectar la enzima β - glucuronidasa. Los mejores resultados de expresión transitoria se obtuvieron con una combinación de microparticulas de 0.6 μ m de diámetro a una densidad de 58,8 μ g/disparo. Además, esta combinación es la que menor daño provoca en el tejido, lo que se traduce en que una mayor capacidad embriogénica del explante. No se han observado diferencias en la expresión transitoria entre las dos presiones de disparo estudiadas, 650 y 1100 PSI. Con respecto a las condiciones de regeneración y selección, la más favorable es cuando se utilizó fructosa como fuente de carbono. En este caso el número de plantas transgénicas recuperadas fue mayor que con maltosa o sacarosa.

Proyecto financiado con fondos FEDER (1FD97-0003-CO2-02)

**DETERMINANTES DE SECUENCIA DEL COMPORTAMIENTO *GEARBOX*
DEL PROMOTOR *bolA1p* DE *Escherichia coli*
Pilar Palacios¹, Miguel Vicente¹ y Martí Aldea²**

1-Centro Nacional de Biotecnología. CSIC campus de Cantoblanco, Madrid.

2-Department de Ciències Mèdiques Bàsiques. Universitat de Lleida.

El promotor *bolA1p* es el arquetipo de un reducido grupo de promotores bacterianos (*gearbox*) cuya principal cualidad es la de responder de modo inverso a la velocidad de crecimiento. Este promotor es reconocido por σ^S , un factor σ distinto del utilizado por la RNA polimerasa para unirse a otros promotores. No se conoce si su comportamiento como *gearbox* se debe a la implicación de σ^S , o si se debe a otras propiedades del promotor que modulen la cinética y/o equilibrios de los intermediarios en las distintas subfases de la iniciación de la transcripción.

Hemos obtenido por mutagénesis dirigida una colección de mutaciones puntuales de la región -10 (zona de reconocimiento por el factor σ^S) y de la zona rica en A/T previa a +1 (zona de formación del complejo abierto) en el promotor *bolA1p*. Se han utilizado oligonucleótidos con cambios en posiciones únicas para obtener mutaciones puntuales por PCR reversa para estudiar la región -10 de forma exhaustiva (30mutantes). Para la zona rica en A/T previa a +1 se han sustituido pares A-T o T-A, en grupos de tres, por pares G-C o C-G respetando el carácter purina o pirimidina de dichas bases para obtener tres mutaciones adicionales. Las mutaciones se han obtenido en un plásmido y posteriormente se han pasado al cromosoma bacteriano (monocopia) mediante un fago λ . En las estirpes obtenidas se ha analizado su comportamiento *gearbox*, así como la dependencia de su comportamiento respecto a la presencia o ausencia de σ^S .

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE DOS FAMILIAS DE ADN SATÉLITE EN *Monomorium subopacum* (HYMENOPTERA, FORMICIDAE).

J.A. Carrillo, P. Lorite y T. Palomeque.

Área de Genética. Dept. Biología Experimental. Universidad de Jaén. 23071 Jaén. E-mail: jacavila@ujaen.es

El ADN genómico de la hormiga *Monomorium subopacum* fue digerido con una batería de enzimas de restricción. La digestión con *EcoRI* generó una banda en geles de agarosa de aproximadamente 2.5 kb (secuencias MOSU, familia *EcoRI*). Este ADN repetitivo está organizado en tándem de acuerdo con los resultados obtenidos en las hibridaciones Southern realizadas, donde se obtienen las escaleras típicas de este tipo de ADN. Se obtiene un resultado similar en ADN digerido con otras enzimas como *XbaI*. La secuenciación de varios clones determinó la existencia de dos variantes de este repetitivo que diferían en 100 pb. La diferencia entre ambos se debe a la existencia de pequeñas inserciones y/o deleciones repartidas a lo largo de toda la secuencia. No se observó hibridación de este ADN repetitivo con otras once especies de hormigas, resultado que sugiere su especificidad al nivel de especie.

La digestión de ADN genómico con *HaeIII* generó otra banda que también fue clonada y secuenciada. Este ADN satélite está organizado en tándem de acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis Southern realizados. La longitud de los monómeros es de 136 pb (secuencias MOSU, familia *HaeIII*) y al igual que la familia *EcoRI*, parece ser específico de especie.

La comparación de las secuencias de la familia *EcoRI* y de la familia *HaeIII* no permite encontrar similitudes significativas entre ambas, lo que indicaría que ambos ADNs satélites no están relacionados y podrían tener orígenes evolutivos diferentes.

MARCADORES MOLECULARES DEL GEN *Fin, fin*, IMPLICADO EN LA ARQUITECTURA DE LA PLANTA EN *Phaseolus vulgaris* L.

A Pañeda¹, C Rodríguez¹, B Méndez de Vigo¹, R Giráldez¹, JJ Ferreira²

(1) Area de Genética, Dpto. Biología Funcional, Universidad de Oviedo,

(2) SERIDA, 33300, Villaviciosa, Asturias

El tipo de desarrollo en la parte terminal del tallo, el número y longitud de los entrenudos, la aptitud para trepar y el grado y tipo de ramificación son los principales caracteres que definen el gran número de alternativas que presenta la arquitectura de la planta de judía. De todos estos caracteres, el tipo de desarrollo de la parte terminal del tallo es relativamente simple, y quizá por eso sea el más conocido desde el punto de vista genético: el alelo recesivo del gen *Fin,fin* da lugar al hábito determinado (tallo terminado en botón floral, que origina una parada en el crecimiento de la planta y limita su aptitud para trepar), mientras que el alelo dominante da lugar al hábito indeterminado.

Las variedades de judía tipo faba asturiana presentan una arquitectura caracterizada por tener crecimiento indeterminado trepador con un alto número de entrenudos y ramificación escasa (hábito de crecimiento tipo IV, según la clasificación del CIAT), lo que incide negativamente en el rendimiento del cultivo, debido a la necesidad de tutores la baja densidad de siembra y la imposibilidad de mecanización en la recolección.

El objetivo del presente trabajo es la obtención de marcadores moleculares del gen *Fin,fin* que faciliten la introducción del carácter "hábito determinado" en programas de mejora genética de variedades de faba asturiana. Para ello, se está llevando a cabo una búsqueda de RAPDs ligados al citado gen mediante el análisis de descendencias agrupadas (método BSA) pertenecientes a la F2 del cruzamiento entre las líneas A25 (procedente de la var. de faba asturiana Andecha) y Brb130 (alubia de grano blanco y grande, de hábito de crecimiento determinado, procedente del CIAT). Hasta ahora se han analizado los productos de amplificación de 318 oligonucleótidos y se ha detectado ligamiento entre el gen *Fin,fin* y los RAPDs ROpI19³⁷⁵ (FR= 0.15) y ROpZ10⁸⁰⁰ (FR= 0.14).

INCREMENTO DE LA RESOLUCIÓN DEL MAPA GENÉTICO CANINO DOGMAP

Parra, D., Calonge, E., Cañón, J. y Dunner, S.

Laboratorio de Genética. Dpto. Producción Animal. Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. dparra@eucmax.sim.ucm.es

El consorcio del DogMap agrupa a investigadores de diferentes países con el objetivo de llevar a cabo la descripción de un mapa genético canino (<http://medtech.cis.msu.edu/ISL/status.htm>), de gran utilidad para el control de enfermedades hereditarias, muy frecuentes en perros. Para ello en los últimos años estos grupos han genotipado individuos pertenecientes a familias de referencia, para un número de marcadores que actualmente es de 532 loci.

Con el objetivo de incrementar la resolución del mapa genético canino, realizamos la búsqueda de nuevos marcadores de tipo microsatélite creando una genoteca parcial del genoma canino con un total de 1220 clones. Tras hibridar con las sondas (GT)₁₀ y (AAAT)₇ se aislaron 4 clones positivos con los siguientes motivos de repetición: UCMCF12: (AAAT)₁₂; UCMCF40: (GT)₂₀; UCMCF71: (GT)₁₄ y UCMCF96: (GT)₁₉ (GA)₁₂.

Las familias de referencia, formadas por 129 individuos de razas Beagle y Pastor Alemán, con un total de 212 meiosis fueron genotipadas para estos marcadores mostrando un número de alelos que variaba de 3 a 7, y un porcentaje de meiosis informativas que varió del 32 al 64% (69-116). No se observaron en estos loci la presencia de alelos nulos ni eventos de mutación.

Se llevó a cabo el análisis con el programa CRI-MAP 2.4 mediante el cual estos microsatélites se asignaron a grupos de ligamiento y se ordenaron dentro de estos. Así los microsatélites quedaron asignados a los grupos de ligamiento L28/33, L19 (ubicado en el cromosoma 5), L26 (cromosoma 1) y L18/33 (cromosoma 10) respectivamente, según la nomenclatura adoptada por el DogMap¹.

El microsatélite UCMCF40 se localiza a 4 cM del gen TP53 y a 8 cM del gen responsable del cistoadenocarcinoma multifocal renal y de la dermatofibrosis nodular hereditaria (RCND) y el marcador UCMCF96 se localiza a 8 cM del gen responsable de la toxicosis por cobre, ambos resultando útiles para el estudio molecular de estas enfermedades.

Referencias:

1. Lingaas F et al. (2001). A canine linkage map: 39 linkage groups. *J. Anim. Breed. Genet.* 118, 3-19.

PAPEL DE LA TOPOISOMERASA II DE ADN EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y ESTABILIDAD GENÉTICA

Nuria Pastor, Inmaculada Domínguez, Santiago Mateos y Felipe Cortés

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain

Las topoisomerasas de ADN (topos) son enzimas que se encargan de llevar a cabo los cambios topológicos que sufre el ADN en procesos celulares tan importantes como replicación, transcripción, recombinación y segregación cromosómica.

El interés general por el estudio de las topos ha aumentado tras el descubrimiento de que dichas enzimas son el blanco de una serie de drogas antitumorales de reconocida eficacia, conocidas como “venenos” de topoisomerasas, la mayoría de los cuales tienen como blanco la topo II.

Estos “venenos” ejercen su efecto citotóxico mediante la estabilización del complejo de rotura que forma la enzima unida al ADN, generando roturas de doble cadena que pueden dar lugar a muerte celular, probablemente por apoptosis.

Recientemente se han descubierto un segundo grupo de compuestos que actúan sobre la topo II inhibiendo su actividad catalítica en el sentido clásico, sin estabilizar el complejo de rotura; a este grupo se les conoce como “inhibidores catalíticos”. Este grupo presenta un gran interés clínico ya que parece burlar el fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR). Tratamientos combinados de estos inhibidores catalíticos con los venenos antitopo son muy eficaces en la terapia antitumoral.

En este trabajo se llevó a cabo un estudio comparativo de los efectos citotóxicos y genotóxicos de un inhibidor catalítico de la topo II, la bisdioxipiperazine ICRF-193 así como de un agente topodepresor, concretamente el bufalin.

Se utilizaron células de hámster Chino parentales (AA8) y defectuosas en la reparación del daño en el ADN (EM9), con el fin de observar además, la posible influencia del tratamiento con estos inhibidores en la reparación del ADN.

Nuestros resultados indican importantes diferencias en los efectos provocados por el ICRF-193 y el bufalin, que podrían explicarse en base a que poseen diferentes mecanismos de acción.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXTENSIBILIDAD EN TRIGOS BLANDOS

Peña, Elpidio; Jouve, Nicolás y Bernardo, Angeles.

Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Biología.
Universidad de Alcalá. Campus Universitario.28871 Alcalá de Henares
(Madrid). e-mail. Angeles.bernardo@uah.es

La calidad en los trigos blandos viene dada por una serie de parámetros tecnológicos como son el peso específico, la humedad, el índice de caída, el % de proteína y los parámetros alveográficos. Dentro del grano de trigo se encuentra el almidón relleno de una malla de fibras de proteínas que constituyen el gluten. Estas proteínas que forman el gluten son básicamente de dos tipos las gluteninas y las gliadinas. Su cantidad, interacciones entre ellas, y sobretodo la calidad determinan la calidad final de una harina. Un parámetro importante en la calidad de las harinas es la relación entre tenacidad (P) y elasticidad (L) es decir, la relación P/L alta indica harinas tenaces de masa poco esponjosa. Una relación P/L baja indica harinas de masas muy deformables. Un tipo de trigo ideal sería aquel en el que se combinaran una gran fuerza (> 300) con una gran extensibilidad (P/L <0.5). Estudios previos sobre variedades y líneas de mejora indican la existencia de un antagonismo entre los valores de fuerza y extensibilidad. En la actualidad se han identificado, localizado e incluso se dispone de marcadores de los genes que determinan la fuerza panadera. No ocurre así con los genes relacionados con la extensibilidad. Con el fin de identificar los alelos responsables de la extensibilidad en trigos blandos, se han estudiado las gluteninas HMW y LMW así como las gliadinas en 28 variedades de trigo blando previamente analizadas mediante un alveógrafo. Nuestros resultados parecen indicar que son las proteínas LMW las implicadas en la extensibilidad.

PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN EL VELO DE FLOR

Peñate, X; Codón, AC; Castrejón, F y Benítez, T

Dpto. de Genética, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes, 6, 41012, España.

En la elaboración de los vinos de Jerez se distinguen dos etapas claramente diferenciadas: una primera etapa de fermentación alcohólica del mosto y una segunda denominada crianza biológica, precedida por una fortificación (adición de etanol destilado de vino hasta alcanzar una concentración del 15%). Las levaduras responsables de la crianza biológica crecen de forma característica dando lugar a una película en la superficie del vino denominada velo de flor. Las levaduras de flor, soportan condiciones de estrés muy acosado (altas temperaturas, alta concentración de etanol y acetaldéhid, ausencia de fuentes de carbono fermentables, estrés hídrico, estrés oxidativo, etc).

Utilizando protocolos para la purificación de proteínas hidrofóbicas hemos aislado una proteína que parece estar relacionada con la capacidad de la cepa de formar el velo de flor.

Las secuencias de varios péptidos de esta proteína muestran una homología del 100% con la superóxido dismutasa 1 (SOD1), una enzima que se ha relacionado con la resistencia a estrés oxidativo.

Para determinar la influencia de SOD1 en la formación del velo de flor estamos estudiando la expresión del gen *sod1* y la actividad superóxido dismutasa en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* formadora de velo B16 en las distintas fases de crecimiento (exponencial, estacionaria y velo) comparando su comportamiento con el de una cepa de laboratorio. Por otro lado se ha clonado el gen SOD1 bajo el control de un promotor constitutivo estamos transformando la cepa B16 con objeto de caracterizar la influencia que la sobreexpresión de SOD1 pueda tener sobre la formación del velo de flor.

EFFECTOS DE LA BIOACUMULACIÓN DEL CADMIO EN EL MOLUSCO MARINO *Littorina littorea*.

F. J. Pérez², A. Buxens¹, B. Jugo¹, A. Estonba¹, A. Aguirre¹, L. Mazón¹.

¹Departamento de Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. Apdo. 644. 48080 Bilbao.

²Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Paseo de la Universidad N° 7. 01006 Vitoria.

Algunos invertebrados marinos, entre los que están incluidos los moluscos gasterópodos, acumulan metales pesados en concentraciones relativamente altas sin ningún efecto perjudicial aparente. Un ejemplo es el caso de *L. littorea*, el cual puede acumular y tolerar altos niveles de metales pesados, entre ellos el cadmio. Aunque se desconoce el mecanismo molecular por el que esto sucede, existe un tipo de proteínas denominadas metalotioneínas que se unen a metales pesados, por lo que el "secuestro" de metales tóxicos, tales como cadmio, podría estar relacionado con la tolerancia a estos contaminantes. Sin embargo, el efecto tóxico del cadmio, no se debe sólo a su presencia directa sino también al desplazamiento de otros metales pesados, como el zinc, de los centros activos de proteínas esenciales.

Los objetivos de este trabajo son: realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de la incorporación de cadmio en diferentes tejidos de *L. littorea*, la interacción de esta bioacumulación con metales esenciales y la inducción de las metalotioneínas en relación a la bioacumulación de cadmio. Para ello, se han utilizado diversos tejidos (partes duras y blandas) de individuos de *L. littorea*, expuestos a concentraciones subletales de cadmio durante 20 días.

Las muestras obtenidas se han sometido a varios tipos de análisis, como espectrofotometría, absorción atómica y polarografía de pulso diferencial, que han permitido estimar la tasa de incorporación de cadmio, la concentración de zinc y de metalotioneínas en diferentes tejidos, a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir: a) que el cadmio se acumula en los tejidos con diferentes cinéticas; b) que la presencia de cadmio produce una redistribución del zinc en diferentes tejidos; c) que el cadmio induce un incremento en la concentración de metalotioneínas; y d) que la relación cadmio/metalotioneína permanece constante a lo largo del tiempo de exposición. Se propone un modelo intracelular de actuación del cadmio en *L. littorea*.

UTILIZACION DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA OBTENCION DE
VARIEDADES ESPAÑOLAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA*) CON
RESISTENCIA A *BREMIA LACTUCAE*.

G. Perez¹; E. Palacios¹; J.A. Pascual²; y L. Ramirez¹.

¹ Depto. de Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra. 31006 Navarra.

² Depto de Mejora Vegetal. Semillas Arnedo, Calahorra. La Rioja.

La lechuga es un cultivo de gran importancia económica, poco exigente en energía y escalonable durante todo el año. Se trata de una de las hortalizas más consumidas en España cuya producción se ve drásticamente mermada por ataques de mildiu en la hoja que redundan en disminución de calidad y rendimiento del producto.

En este trabajo se pretende determinar la presencia de genes de resistencia a *Bremia lactucae* en la descendencia procedente del cruzamiento entre la variedad sensible Cherry y la variedad LRB 98/1 portadora de 16 genes de resistencia. Para ello se han utilizado marcadores moleculares tipo SCAR (previamente descritos por el grupo de Michelmore, Davies, California) así como el primer que amplifica el marcador de RAPD ligado al gen *Dm 13* para identificar los 3 clusters de resistencia a *Bremia* en la F1 y F2 procedente del cruzamiento citado anteriormente. Los resultados obtenidos muestran que : a) la variedad Cherry no es una variedad sensible sino que por el contrario presenta resistencias parciales y b) la mitad de las plantas F2 procedentes del cruce entre Cherry y LRB 98/1 son resistentes. Habida cuenta que la presencia de clusters de resistencia a *Bremia* en plantas F2 no significa que dichas plantas sean homocigóticas para todos los genes de resistencia se procedió a la autofecundación de las mismas y posterior infección de su descendencia con diferentes aislados de *Bremia*. Los resultados obtenidos nos han permitido identificar plantas portadoras de 16 genes de resistencia a *Bremia*.

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA EN POBLACIONES NATURALES DE
DROSOPHILA GUANCHE: CONTRASTE DE LA TEORIA CASI-NEUTRALISTA
DE LA EVOLUCIÓN MOLECULAR

José A. Pérez, Julio Rozas, Carmen Segarra y Montserrat Aguadé

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

La teoría casi-neutralista hace predicciones específicas sobre el patrón de variación nucleotídica en especies con distinto tamaño efectivo poblacional. En *Drosophila* la variación sinónima se halla sometida a selección débil (ligeramente adaptativa o deletérea) y en consecuencia se verá afectada por el tamaño efectivo poblacional. Así, en especies con tamaño efectivo suficientemente pequeño las constricciones selectivas a variar se relajarán hasta tal punto que las mutaciones sinónimas se comportarán como efectivamente neutras. En cambio, en especies con mayor tamaño efectivo la fracción de mutaciones afectadas por la selección será superior.

Con la finalidad de estudiar el efecto de las diferencias en el tamaño efectivo sobre la variación sinónima hemos elegido dos especies del grupo oscuro de *Drosophila*, *D. guanche* y *D. subobscura*. *D. guanche* tiene un tamaño poblacional pequeño y es endémica de Tenerife, mientras que *D. subobscura* tiene un tamaño poblacional grande y su área de distribución original en la zona paleártica es amplia. En el presente estudio se analiza la variación nucleotídica en un gen que codifica la subunidad grande de la RNA polimerasa II (*RpII215*). Este gen parece especialmente idóneo por el tamaño de su zona codificadora (1889 codones) y por encontrarse en un ambiente recombinacional similar en las dos especies estudiadas.

Al secuenciar la región *RpII215* en 24 líneas de *D. guanche* se ha detectado que, a diferencia de lo observado en *D. subobscura*, el número de mutaciones segregantes que implican un cambio de codón preferente a codón no preferente (p → u) es muy superior al de mutaciones segregantes que implican un cambio en sentido inverso (u → p). Asimismo, el análisis de los cambios fijados en ambos linajes confirma el exceso ya detectado previamente de cambios no preferentes en el linaje de *D. guanche*. Ambas observaciones son consistentes con el menor tamaño poblacional de la especie insular.

SELECCIÓN ARTIFICIAL Y CONSANGUINIDAD PARA VIABILIDAD EN
DROSOPHILA MELANOGASTER.

**Pérez-Figueroa, A., Rodríguez-Ramilo, S.T., Fernández, J. y
Caballero, A.**

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología.
Universidad de Vigo, 36200 Vigo.

En una población en la que los genes que determinan la viabilidad se encuentran a frecuencias correspondientes al equilibrio mutación-selección, se espera que la respuesta a la selección artificial para aumento de viabilidad sea pequeña o inapreciable. Sin embargo, experimentos anteriores han mostrado una respuesta considerable y repetible durante las primeras generaciones de selección, sugiriendo que la población no se encontraba en equilibrio. Por otra parte, los diseños de subdivisión, consanguinidad local y selección y cruzamiento de líneas no han producido resultados superiores a los de la selección en poblaciones sin subdividir.

En el presente trabajo se llevó a cabo un experimento de selección artificial sobre una población de *Drosophila melanogaster* recién capturada, con objeto de contrastar los resultados previos y de investigar la posible eficiencia de la combinación de selección y consanguinidad forzada. Para ello se seleccionó el carácter huevo-adulto (porcentaje de adultos emergentes de un total de 30 huevos) escogiendo 10 parejas de 40 en dos tipos de líneas. En un tratamiento se evitó el apareamiento entre hermanos en los cruces de los individuos seleccionados, en tanto que en el otro se realizaron un 75% de tales cruces. Asimismo, se llevaron a cabo controles no seleccionados de ambos tipos. Cada tratamiento se replicó tres veces y el experimento se continuó durante 5 generaciones de selección.

Los resultados parecen indicar que la población natural debe estar próxima al equilibrio mutación-selección, dado que no se observó una respuesta apreciable en ninguna de las réplicas seleccionadas. Por su parte, las líneas consanguíneas sufrieron depresión con una tasa similar a la obtenida en experimentos previos para el mismo carácter y especie, sugiriendo una variabilidad normal para esta población.

EL ORIGEN INTESPECÍFICO DE LOS CROMOSOMAS B. EVIDENCIA
EXPERIMENTAL EN *Nasonia*

Francisco Perfectti¹ y John H. Werren²

1. Depto. de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 18071 Granada

2. Dept. of Biology. University of Rochester. Rochester, NY 14627, USA

Un fragmento céntrico fue generado durante la introgresión de una región cromosómica de la avispa parasítica *Nasonia giraulti* en el genoma de *Nasonia vitripennis*. Esta región cromosómica porta el gen *or123*⁺ que produce color oscuro de los ojos (tipo salvaje). Gracias a este marcador fenotípico hemos seguido la transmisión de este neo-cromosoma B en una línea de ojos naranja (*or123*) de *N. vitripennis*. Este cromosoma supernumerario mostró inestabilidad mitótica, manifestada en la aparición de individuos mosaico para el color de los ojos, y una segregación irregular durante la meiosis, manifestada por una recuperación de individuos con el carácter, menor que la proporción mendeliana esperada. Sin embargo, la estabilidad y el índice de transmisión aumentó en sucesivas generaciones. La transmisión a través de la gametogénesis masculina fue cercana al 100%.

Estos resultados apoyan el modelo de origen interespecífico de los cromosomas B y muestran que la inestabilidad de los cromosomas introducidos en una especie diferente puede persistir durante varias generaciones. Si este modelo es generalizable a un mayor número de cromosomas B podría investigarse en zonas híbridas, donde cabría esperar una alta tasa de formación de neo-Bs.

DETECCIÓN DE MUTACIONES EN GENES p53 Y Bcl-2, MEDIANTE PCR-SSCP, EN PRÓSTATA DE RATAS TRATADAS CON CADMIO.

Perucho, T.¹; Henriques-Gil, N.¹; Pozuelo, J.M.²; Codesal, J.³; Martín, R.⁴; Santamaría, L.³

¹Secc. Genética, Dpto. Biología, Univ. San Pablo C.E.U., Madrid; ²Secc. Citología, Dpto. Biomédicas I, Univ. San Pablo C.E.U., Madrid; ³Dpto. Morfología, Fac. Medicina, Univ. Autónoma de Madrid; ⁴Dpto. Patología, Hospital N. S. Sonsoles, Ávila.

El Cadmio es un agente mutagénico sospechoso de inducir tumores prostáticos y lesiones proliferativas en ratas. Dicho efecto carcinógeno puede verse incrementado en presencia de Zinc ya que, aunque con efecto protector en la formación de tumores testiculares o en el pulmón, incrementa la incidencia de tumores de próstata inducidos por este metal.

Se ha estudiado el efecto que la administración crónica de Cadmio y Zinc provoca en dos genes relacionados con el desarrollo de lesiones tumorales en la próstata ventral de ratas Spragel: el oncogen **Bcl-2** y el exon 7 del gen supresor de tumores **p53**.

Partiendo de muestras de ADN extraídas de la próstata ventral de animales de 6 meses de edad, a los que se les ha administrado en el agua de bebida Cadmio (90 ppm) y Cadmio con suplementos de Zinc en la dieta (90 y 60 ppm, respectivamente), así como de animales no tratados, se ha estudiado la presencia de mutaciones mediante el método PCR-SSCP (*Polimerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*) en un segmento de 254 pb del gen Bcl-2 y uno de 237 pb del gen p53. Los resultados se han analizado primero mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones especiales de desnaturalización y posterior tinción con nitrato de plata, y se han comprobado mediante secuenciación directa.

El fragmento amplificado del gen Bcl-2 no presenta ninguna variación en el patrón de bandas entre los distintos tratamientos ni en las porciones de próstata estudiadas en cada rata; sin embargo, en el fragmento analizado del exón 7 del p53 se ha observado una diferencia en el patrón de migración en una de las ratas tratadas con Cadmio y Zinc conjuntamente, lo que permite discutir la respuesta de dicho gen al tratamiento crónico con Cadmio.

UN ELEMENTO REGULADOR TIPO "ENHANCER" EN UN GEN FOTOINDUCIBLE DE LA BACTERIA *Myxococcus xanthus*

Polanco MC, Martínez-Argudo I y Murillo FJ

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia

En la bacteria *Myxococcus xanthus* la expresión de gen *crtI* (implicado en la síntesis de carotenos) requiere **simultáneamente** la iluminación con luz azul y la entrada de las células en fase estacionaria. La actividad de su promotor (P_1) requiere de un factor sigma de la familia ECF, llamado CarQ, cuyo sitio de unión incluye dos pequeños tramos de DNA centrados en las posiciones -31 y -10.

En este trabajo se demuestra que la actividad normal de P_1 depende estrictamente de un tramo de DNA situado aguas abajo del punto de inicio de la transcripción y que llega a incluir parte de la región traducida (elemento DRE).

Igualmente se demuestra que la acción de ese tramo se corresponde con la de un elemento regulador tipo "enhancer". Se han diseñado varias construcciones, que utilizan el gen *lacZ* como gen chivato, en las que se ha podido observar que el elemento DRE resulta ser activo tanto en una orientación como en la opuesta. También es activo incluso si se coloca aguas arriba de la región de unión de CarQ al promotor. Es más, situado junto a un promotor heterólogo (constitutivo), el elemento DRE estimula la actividad de dicho promotor cuando las células alcanzan la fase estacionaria.

En este trabajo se presentan también los resultados de distintos experimentos diseñados para delimitar el tramo de DNA que forma el elemento DRE.

OBTENCIÓN DE INSULINA HUMANA EN *Arabidopsis thaliana*

María Rosa Ponce, Pedro Piqueras y José Luis Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

La insulina es una hormona secretada por el páncreas cuya función primordial es la regulación del metabolismo de la glucosa. La diabetes, consecuencia de las alteraciones en la síntesis o la percepción de la insulina, es una enfermedad de gran incidencia en la población y elevado coste económico. El número de afectados por la diabetes en el mundo era de 135 millones en 1995, una cifra que se habrá duplicado con creces en 2025, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud.

Para la producción de proteínas humanas, son varias las ventajas de la utilización de plantas transgénicas como alternativa a la fermentación bacteriana, ya que los transcritos y las proteínas sufren modificaciones postranscripcionales y postraduccionales similares en las células vegetales y en las humanas. Su cultivo y recolección son procesos de bajo coste, en los que se eluden además los problemas asociados al uso de animales como factorías de productos proteicos. Con el objetivo de conseguir la expresión del gen de la insulina humana en un genoma vegetal, el del organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, hemos construido una molécula recombinante en la que el segmento codificante del gen de la insulina humana (hIns) se encuentra flanqueado por un promotor constitutivo y muy activo, el del virus del mosaico de la coliflor (35S), y una secuencia de terminación de la transcripción, de la región 3' del gen de la nopalina sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (3'nos), en el plásmido pBI121, un vector que incluye las secuencias del ADN-T que hacen posible su integración en el genoma de una planta. Hemos llevado a cabo varios intentos de transformación *in planta* de *Arabidopsis thaliana*, mediante infección con una estirpe virulenta de *Agrobacterium tumefaciens* portadora de la construcción pBI121-hIns, obteniendo líneas transformantes cuyo genoma incluye al menos una copia del gen de la insulina humana. Hemos comprobado la integridad estructural del transgén en las líneas transformantes, así como los niveles de su transcripción.

DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES (MICROSATÉLITES) EN LA ESPECIE PISCÍCOLA CULTIVADA. *Solea senegalensis*

Porta, J., Álvarez, M.C.

Dpto. de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Uno de los retos planteados por la acuicultura actual es la domesticación de nuevas especies de peces, a fin de diversificar su oferta para consumo humano. Tal es el caso de los peces planos y más concretamente los lenguados (*Solea*). Los resultados obtenidos de su cultivo son enormemente esperanzadores, si bien esto contrasta con la escasa información que se tiene de su genética, la cual se limita casi exclusivamente a *S. solea*. De otras especies de lenguado como *S. senegalensis*, cuyo cultivo se está iniciando en nuestro país, no existe información alguna. Sin embargo, para el aprovechamiento óptimo de los recursos genéticos de una especie, es necesario conocer la cantidad y distribución de su variabilidad genética como referente de su capacidad de adaptación a condiciones de cultivo, debiendo por tanto considerarse como un prerequisite antes de establecer un stock de reproductores.

Dada la importancia económica de *S. senegalensis*, hemos iniciado el desarrollo de marcadores genéticos tipo microsatélites en esta especie, a fin de resolver distintas cuestiones relacionadas con su cultivo. Por un lado se pretende hacer una valoración de un stock de reproductores en la empresa en que se está poniendo a punto el cultivo de esta especie. Este stock está constituido por 250 individuos provenientes del medio natural. Con ello se pretende conocer la situación de partida de esta población y hacer un seguimiento de la evolución de su variabilidad y estructura genética en sucesivas generaciones de cultivo. Además, en el cultivo de esta especie se ha detectado una gran variabilidad en su tasa de crecimiento, así como un elevado índice de albinismo. Para abordar convenientemente estos problemas, desde una perspectiva genética, es necesario poder realizar análisis de parentesco de los individuos afectados.

En este trabajo se presentan los resultados del aislamiento de 14 locimicrosatélites específicos de la *Solea senegalensis* a partir de una genoteca parcial de DNA genómico. Su nivel de variabilidad y su utilidad para resolver las cuestiones anteriormente planteadas, están siendo evaluadas en el momento actual.

DESARROLLO DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE LA PROTEASA NS3a del VIRUS DE LA HEPATITIS C.

S. Portal-Núñez*‡, F. J. Novo*, M. García-Delgado* y F. Borrás-Cuesta‡.

Universidad de Navarra. *Departamento de Genética. ‡Medicina Interna.

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA de polaridad positiva, cuyo genoma tiene un tamaño de 9.200 pares de bases. Este virus produce una hepatitis crónica que puede llegar a dar cirrosis hepática y hepatocarcinoma. Se estima que actualmente hay unos 250 millones de infectados por VHC en todo el mundo. Los tratamientos con interferón alfa y rivabirina no son eficaces en muchos casos, por lo que es de gran importancia intentar desarrollar nuevos antivirales capaces de controlar al VHC. El presente trabajo es una aproximación a este nuevo tipo de antivirales. Se ha desarrollado un ensayo *in vitro* con el cual poder probar la capacidad inhibitoria de ciertos péptidos a la hora de bloquear la acción de una proteasa viral (la NS3a) cuya función es vital para la correcta replicación del virus. El sistema se basa en la producción y purificación de la región N-terminal de la NS3a (aminoácidos 1-181). Esto se ha conseguido tras el clonado de dicha región en *E. coli* en un vector de expresión para procariotas (pET14 b+, Novagen©). Tras la clonación en este vector se puede purificar la proteína recombinante gracias a una cola de histidinas que se expresa en el extremo N-terminal de la proteasa. Una vez expresada se realiza la prueba de actividad de esta proteasa frente a un péptido sustrato que mimetiza una de las regiones de corte propias de la poliproteína vírica. Este péptido sustrato emite fluorescencia al ser cortado y esta señal es cuantificable. Se están desarrollando péptidos inhibidores a partir de péptidos modificados correspondientes a regiones de corte de la poliproteína vírica. Esto permitirá seleccionar péptidos inhibidores de una alta actividad.

GENES DE LA CAROTENOGÉNESIS DE *FUSARIUM*

Maria del Mar Prado¹, Pia Linnemannstons², Alfonso Prado¹, Bettina Tudzynski² y Javier Avalos¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

²Institut für Botanik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Alemania

La síntesis de neurosporaxantina en *Fusarium fujikuroi* requiere cuatro actividades enzimáticas: la sintetasa de fitoeno, una deshidrogenasa, una ciclasa y una oxidasa. Tres de las cuatro actividades están determinadas por dos genes, llamados *carRA* y *carB*, que se encuentran contiguos y en la misma orientación en el genoma de este hongo. El primero es responsable de una proteína bifuncional con las actividades sintetasa y ciclasa. El segundo determina la deshidrogenasa.

Se ha determinado la secuencia de *carRA* y *carB*, que dan lugar a polipéptidos de 612 y 541 aminoácidos, respectivamente. La función del gen *carB* se determinó anteriormente por mutagénesis dirigida (Fernández-Martín et al. 2000 Mol. Gen. Genet. 263: 838-845). La disrupción génica de *carRA* produce un fenotipo albino, concordante con la pérdida de la actividad de síntesis de fitoeno. La expresión de ambos genes es mayor en la luz y en mutantes superproductores que en la oscuridad en la estirpe silvestre.

Próximo al gen *carB* se encuentra un gen que determina una proteína de la familia de las opsinas. La expresión de este gen aumenta también en la luz y en mutantes superproductores. Este resultado, y su ubicación junto a *carRA* y *carB*, sugieren una función en la síntesis de carotenoides. Estamos investigando su función mediante mutagénesis dirigida.

A fin de identificar los genes reguladores de la carotenogénesis en *F. fujikuroi*, hemos hecho análisis de complementación en heterocariontes de mutantes productores de carotenoides en la oscuridad. La mayoría de los mutantes pertenecen a un único grupo de complementación, que define el gen *carS*. Un segundo mutante complementa con todos los anteriores y se ha denominado *carD*. Se investiga actualmente la posible ubicación de estos genes en el entorno de los genes *carRA* y *carB*.

DISTRIBUCIÓN DE SECUENCIAS TELOMÉRICAS Y SUBTELOMÉRICAS EN *Hordeum chilense* MEDIANTE HIBRIDACIÓN *in situ*.

Prieto, P.¹; Martín, A.¹ y Cabrera, A.²

¹ Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Córdoba.

² Departamento de Genética. UCO. Córdoba.

La caracterización de los telómeros y regiones subteloméricas se ha llevado a cabo en dos líneas de *Hordeum chilense* (H1 y H7) mediante hibridación *in situ* en metafases somáticas con la secuencia telomérica pAtT4 de *Arabidopsis thaliana* y la subtelomérica HVT01 de *Hordeum vulgare*, respectivamente. La secuencia telomérica pAtT4 hibrida en los extremos finales de los 7 pares cromosómicos en ambas líneas indicando que los telómeros de *H.chilense* contienen repeticiones homólogas a la secuencia consenso (TTTAGGG)_n. Por el contrario, las secuencias asociadas al telómero (TAS), localizadas inmediatamente adyacentes a las regiones teloméricas en *H.chilense*, muestran variabilidad para el tamaño, intensidad y posición de los lugares de hibridación dentro de cada línea y entre ambas líneas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en *H.vulgare* en los que la secuencia subtelomérica HVT01 está presente en 13 de los 14 extremos cromosómicos.

La caracterización de las regiones subteloméricas de cada par cromosómico en las líneas H1 y H7 de *H.chilense* se ha realizado mediante hibridación *in situ* con la secuencia repetida GAA. El patrón de hibridación de esta secuencia en cada par cromosómico es diferente en ambas líneas permitiendo la identificación y caracterización citogenética de los 7 pares cromosómicos en H1 y H7.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEOCÉNTRICA DEL CROMOSOMA 5RL EN TRIGO

M.J. Puertas¹, S. Manzanero¹, J. Vega²

1.Dep. Genética, Facultad de Biología, Univ. Complutense, 28040 Madrid.

2.Div. Biological Sciences, Univ. Of Missouri, Tucker Hall, Columbia, Missouri 65211

Se describen algunas propiedades estructurales y funcionales de una constricción con actividad neocéntrica localizada en el brazo largo del cromosoma 5R de centeno (5RL). Esta constricción no se observa en centeno normal, pero en líneas de adición mono o ditelosómicas la constricción se alarga mucho y en algunas células en metafase I de la meiosis, actúa como neocentrómero puesto que adquiere actividad cinética y coorienta con los verdaderos centrómeros.

El FISH nos ha permitido determinar que la secuencia repetida subtelomérica pSc119.2 de centeno está presente en la constricción, mientras que otras secuencias centroméricas, teloméricas o subteloméricas no producen señales que se puedan detectar con esta técnica.

Se ha encontrado evidencia directa de la unión de microtúbulos al neocentrómero mediante inmunolocalización con el anticuerpo anti- α -tubulina. Mediante tinción con nitrato de plata también se ha detectado la acumulación de proteínas argentófilas en la constricción, semejante a la que se observa en los cinetocoros de centeno.

El anticuerpo anti-5metil-citosina no permitió detectar un patrón definido de bandas de hipermetilación, ya que algunos bivalentes de trigo mostraban diferente señal en ambos homólogos. Sin embargo, se puede observar que ni los neocentrómeros ni los cinetocoros muestran bandas de hipermetilación.

La frecuencia de células en metafase I con neocentrómero varía mucho entre generaciones, o entre plantas de la misma generación cultivadas en diferente año. Esto sugiere que la activación neocéntrica es epigenética y depende de características ambientales internas y externas, independientemente de la secuencia de DNA.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES DE *Mucor circinelloides* REGULADOS POR *crgA*, UN GEN REGULADOR DE LA CAROTENOGÉNESIS

Quiles-Rosillo, M. D., Gómez-Mateo, J., Torres-Martínez, S., Garre, V.

Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia

Mucor circinelloides, como otros hongos, muestra varias respuestas a la luz azul. Una de estas respuestas es la acumulación de β -caroteno. El estudio de los genes implicados en la regulación por la luz de la biosíntesis de carotenoides llevó a la identificación del gen *crgA* (*carotenogenesis regulatory gene*), que actúa como un represor de la transcripción de los genes carotenogénicos en la oscuridad. El empleo de la técnica de *differential display* permitió la clonación de dos genes, *cigA* y *cigB*, cuya transcripción es reprimida por el gen *crgA*. La expresión de uno de estos genes, *cigA*, es además inducida por la luz. Con el objetivo de determinar el papel de los genes *cig* se han generado mutantes nulos, mediante reemplazamiento génico, tanto para el gen *cigA* como *cigB*. Los mutantes nulos del gen *cigB* no presentan ningún fenotipo reconocible, mientras que los mutantes en el gen *cigA* muestran una ligera reducción del crecimiento. La introducción del alelo *cigA* silvestre en estos mutantes nulos restaura el crecimiento silvestre, confirmando que el fenotipo de los mutantes es exclusivamente debido a la ausencia de *cigA*. El gen *cigA* muestra una homología de 73,7 % con otro gen, denominado *cigC*, estrechamente ligado al gen *crgA*. La existencia de genes homólogos a *cigA* podría explicar la reducción parcial en el crecimiento que muestran los mutantes nulos para *cigA*. El análisis de la expresión del gen *cigC* indica que es activada por la luz, aunque la cinética es diferente al gen *cigA*. Cuando se analiza la expresión en mutantes nulos para el gen *crgA* se observa que la transcripción es constitutiva, indicando que el gen *crgA* actúa como un represor sobre este gen. Estos resultados sugieren que el gen *crgA* está implicado en la regulación de otros procesos celulares aparte de la respuesta a la luz.

FENOTIPO DE RESISTENCIA A CICLOHEXIMIDA CODIFICADO EN *cyh2*: ¿RECESIVO, CODOMINANTE O DOMINANTE?

Manuel Ramírez^{1*}, Jesús Ambrona¹, Antonia Vinagre¹, Felipe Molina² y José E. Rebollo².

¹Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

²Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

La resistencia a cicloheximida codificada en el gen *cyh2* de *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito como un fenotipo recesivo, dominante parcial y dominante. Se presenta un estudio en el que se demuestra que este fenotipo es recesivo. No obstante, en poblaciones de híbridos heterocigóticos (*cyh2^R/cyh2^S*), la mutación puede presentar un comportamiento semidominante o dominante como consecuencia de la aparición de subpoblaciones de levaduras homocigóticas para la mutación de resistencia (*cyh2^R/cyh2^R*). Mutantes espontáneos resistentes a cicloheximida aislados a partir de levaduras diploides homotálicas son homocigóticos para la mutación, segregando 4 resistentes : 0 sensibles cuando se analiza el fenotipo de las tétradas correspondientes. La cartografía de las mutaciones revela que están localizadas en el gen *cyh2*. Por otra parte, en presencia de cicloheximida, los híbridos heterocigóticos obtenidos por micromanipulación forman papilas o crecen formando un césped (en general, más lentamente que el parental resistente). El análisis de tétradas de estos híbridos revela la existencia de una subpoblación de células que segrega 4 resistentes : 0 sensibles. La frecuencia de estos homocigóticos es menor de 10^{-4} para los híbridos que forman papilas y de $1-20 \times 10^{-2}$ para los que crecen formando un césped en presencia del antibiótico. Estos resultados explican el extraño comportamiento de este fenotipo y las diferencias en el crecimiento de los distintos híbridos heterocigóticos. Las células homocigóticas *cyh2^R/cyh2^R* que surgen en las poblaciones de híbridos podrían originarse por recombinación mitótica, conversión génica mitótica o hipermutación.

*Dirección postal: Dr. Manuel Ramírez. Departamento de Microbiología (Antiguo Rectorado). Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. 06071 Badajoz. Spain. Tel: 34-24-289426. Fax: 34-24-271304. e-mail: mramirez@unex.es.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CUATRO RAZAS BOVINAS DEL PIRINEO OCCIDENTAL, MEDIANTE DNA MICROSATÉLITE.

F. Rendo¹, B. Jugo¹, J.M. Plazaola², M. Gómez³, A. Estonba¹.

¹Animali Biología eta Genetika Dpta., UPV/EHU, Bilbao. ²Diputación de Gipuzkoa; ³Diputación de Bizkaia.

Dentro de un proyecto global constituido para el análisis de la diversidad de las razas locales Cantábrico-Pirenaicas, se han analizado 384 individuos, con el menor grado de parentesco posible, de 4 razas bovinas autóctonas: Pirenaica, Betizu, Monchina, y Terreña, estando Betizu y Monchina en estado crítico de conservación y Terreña en peligro de extinción. Estas dos últimas han sido analizadas por vez primera.

Se han analizado la variabilidad genética intra e interracial y las relaciones filogenéticas interraciales. Para ello se utilizaron secuencias altamente polimórficas, como son los *loci* de DNA microsatélite. Se han analizado 11 microsatélites, coamplificados por PCR, mediante el kit comercial "Bovine II ver. 2", y detectados con el "ABIPRISM 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems).

En cuanto a los resultados obtenidos, respecto a la variabilidad genética intrarracial, la raza Pirenaica (la única sometida a mejora) ha mostrado los menores valores de Número Medio de Alelos por *locus* (6.27) y de Heterozigosidad Observada ($H_o=0.689$); en el resto, la diversidad genética intrarracial observada ha sido mayor y relativamente semejante en todas ellas (CERVUS)

Con el programa GENEPOP 1.2, y aplicando la corrección de Bonferroni, se ha observado que todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para todo el panel de microsatélites, exceptuando la raza Betizu para el *locus* TGLA126.

Los valores de F_{ST} obtenidos (FSTAT), indican que el 2,4% de la diversidad total observada puede ser atribuida a las diferencias entre las cuatro razas ($F_{ST} = 0.024$, $p<0.001$), siendo tres veces menor a la observada entre 18 razas bovinas locales de España, Portugal y Francia.

En los árboles filogenéticos basados en las distancias de Nei y elaborados utilizando el método Neighbour-Joining (PHYLIP), los dos extremos están marcados por las razas Pirenaica y Monchina. La posición adoptada por Betizu y Terreña es intercalar entre ambas.

ESTRUCTURA GENÉTICA DE CUATRO RAZAS OVINAS DEL PIRINEO OCCIDENTAL MEDIANTE DNA MICROSATÉLITE

F. Rendo, B. Jugo, L.I. Mazón, A. Estonba

Animali Biologia eta Genetika Dpta: UPV/EHU. Bilbao.

La variabilidad genética dentro y entre poblaciones ovinas del Pirineo Occidental de raza Latxa, Carranzana, Sasi Ardi y Cárnica Navarra ha sido cuantificada mediante el cálculo del número medio de alelos, heterocigosidades observadas y esperadas, estimaciones de F_{IS} , F_{ST} y Distancias D_S .

Se han analizado un total de 513 individuos, siendo 264 de raza Latxa en la que se han diferenciado dos variedades, Cara Negra y Cara Rubia. Además, dentro de la variedad Cara Negra se consideran tres subpoblaciones: tipo Aizkorri, tipo Gorbea y tipo Navarro. En la variedad Cara Rubia se diferencian dos poblaciones de Aralar -una dentro y la otra fuera del programa de mejora-, y una muestra aleatoria de Cara Rubia. En los análisis se ha incluido también una muestra de raza Castellana.

En cuanto a la diversidad, las heterocigosidades medias observadas difieren poco en las poblaciones estudiadas, y quedan dentro del rango descrito en otras razas ovinas ($H_o \cong 0.7$).

En cuanto a la distribución de la diversidad genética observada dentro y entre las 5 razas se refiere, el 2.7% puede ser atribuida a las diferencias entre razas ($F_{ST}=0.027$, $p<0.001$).

En los dendrogramas obtenidos, las dos razas del tronco entrefino, Cárnica Navarra y Castellana, se diferencian claramente del resto, las cuales, atendiendo a su vellón largo, son clasificadas en el tronco Churro. Este resultado apoyaría la hipótesis de un origen genético independiente para los dos grupos. Las razas Carranzana y Sasi ardi se sitúan entre las razas de vellón largo, si bien se diferencian genéticamente de ellas.

En cuanto a la raza Latxa se refiere, destaca la agrupación de todas las subpoblaciones, -Caras Negras por un lado y Caras Rubias por otro- si bien el tipo Navarro de Cara Negra aparece claramente separado de los anteriores, lo que indicaría un alto grado de aislamiento genético del mismo.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA MORFOGÉNESIS DEL FRUTO EN *Arabidopsis thaliana*

Juan José Ripoll, Isabel Ochando, Hugo Alonso, Cristina Ferrándiz, Antonio Martínez-Laborda y Antonio Vera

División de Genética, Departamento de Biología Aplicada,
Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante
jjripoll@umh.es, ios@umh.es, hugoacb@umh.es, cferrandiz@umh.es,
laborda@umh.es, avera@umh.es

El fruto de *Arabidopsis*, al igual que ocurre con las más de 3.000 especies de Brassicáceas, es una silicua. Cabe esperar que el análisis de su desarrollo, dadas las propiedades que hacen de *Arabidopsis* un organismo ideal para la disección genética y molecular de fenómenos biológicos, permitirá la elaboración de modelos aplicables a otros vegetales que expliquen, a nivel de la expresión de genes y la función de sus productos, de qué manera se regulan los procesos morfogénéticos que dan lugar a la formación del fruto. Estamos llevando a cabo una búsqueda de mutantes afectados en el tamaño o la forma de la silicua en una población de *Arabidopsis thaliana* mutagenizada con T-DNA. Se ha realizado el escrutinio en diversos grupos parentales de dicha colección, habiéndose obtenido 20 mutantes con distintas morfologías y tamaños en el fruto, que muestran heredabilidad del fenotipo. Centramos nuestra atención en dos de ellos, afectados por mutaciones recesivas ligadas a inserciones únicas. Actualmente, se están desarrollando experimentos que permitan establecer la naturaleza de los genes implicados en los fenotipos mutantes.

Por otra parte, la decisión para iniciar el desarrollo del fruto de *Arabidopsis thaliana* a partir del ovario depende de que se produzca la polinización y la posterior fertilización de los óvulos. Esta coordinación se puede perturbar, como pone de manifiesto la existencia del fenómeno de partenocarpia (formación del fruto en ausencia de fertilización). La entrada en esta vía de desarrollo implica la activación o represión de genes específicos. Nosotros proponemos una estrategia de análisis genético para desentrañar el fenómeno de la partenocarpia. Hemos llevado a cabo una mutagénesis con EMS de semillas de *Arabidopsis thaliana* en un fondo mutante androestéril condicional, *cer6* (*ecceriferum6*). En la actualidad estamos realizando el escrutinio de plantas que muestran un desarrollo aparente del fruto en condiciones no permisivas de fertilización.

ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTACIONES QUE PERTURBAN EL DESARROLLO DE LA HOJA EN *Arabidopsis thaliana*

Pedro Robles y José Luis Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Con el objetivo de diseccionar genéticamente el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, hemos llevado a cabo un estudio de la variabilidad natural de la morfología foliar en 188 estirpes silvestres, un análisis genético de 115 mutantes aislados por autores anteriores, y dos búsquedas de nuevos mutantes, inducidos mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo o bombardeo con neutrones rápidos. Hemos cartografiado 91 de los genes cuyas mutaciones perturban el desarrollo de la hoja, sentando así las bases para su clonación posicional.

En nuestra búsqueda de mutantes inducidos por neutrones rápidos, se sometieron a escrutinio 23.445 individuos M₂, descendientes de 2.931 líneas parentales expuestas al **mutágeno**, aislando 904 presuntos mutantes con morfología foliar aberrante, de los que 523 resultaron fértiles. Hemos analizado genéticamente 25 de estos mutantes, cuyo fenotipo se manifestó con penetrancia completa y expresividad poco variable, comprobando que corresponden a 9 grupos de complementación. Los fenotipos foliares de estas nuevas mutaciones se caracterizan por la aparición de indentaciones en el margen y la disminución en el número de células del mesófilo (*denticulata29* y *30*), la alteración de la simetría bilateral del órgano (*asymmetric leaves3*), su curvatura hacia el haz (*incurvata8* y *15*), o la disminución de su tamaño (*exigua9*). También hemos obtenido nuevos alelos de genes previamente descritos, como *CURLY LEAF* y *ASYMMETRIC LEAVES1*.

Hemos analizado las interacciones genéticas entre las mutaciones inducidas por neutrones rápidos, comprobando que la mayoría de los dobles mutantes mostraban aditividad **fenotípica**. Constituyeron excepciones las plantas *asl den29* y *asl den30*, cuyo fenotipo es sinérgico y sugiere que los genes *AS1*, *DEN29* y *DEN30* están implicados en el establecimiento y/o el mantenimiento de la dorsoventralidad de la hoja.

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTRACNOSIS EN *Phaseolus vulgaris* L. MEDIANTE PRUEBAS DE ALELISMO.

C Rodríguez¹, B Méndez de Vigo¹, A Pañeda¹, R Giráldez¹, JJ Ferreira²

(1) Area de Genética, Dpto. Biología Funcional, Universidad de Oviedo,

(2) SERIDA, 33300, Villaviciosa, Asturias

En la judía común (*Phaseolus vulgaris*) se han descrito hasta ahora 9 genes (*Co-1* a *Co-9*), la gran mayoría dominantes, que proporcionan resistencia a un espectro más o menos amplio de razas del patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, responsable de la antracnosis.

El objetivo del presente trabajo es la identificación, mediante pruebas de alelismo, de genes de resistencia presentes en diferentes materiales de *Phaseolus vulgaris*, entre los que se incluyen varias líneas utilizadas como donantes de resistencia en programas de mejora (PI-207262, BAT93, SEL 1308, SEL 1360, A321; A252, A493), así como en cuatro líneas mejoradas para resistencia a antracnosis del tipo faba asturiana (A1183, A1239, A1231 y A1220), obtenidas en el SERIDA (Villaviciosa, Asturias). Las pruebas de alelismo se llevaron a cabo mediante el análisis de la respuesta a la inoculación de descendencias F2 de diferentes cruzamientos entre estos materiales entre sí, así como entre estos materiales y las variedades diferenciales portadores de genes de resistencia conocidos Cornell 49-242 (*Co-2*), Sanilac (*Co-2*), México 222 (*Co-3*), To (*Co-4*), Tu (*Co-5*), AB136 (*Co-6*). Las inoculaciones se realizaron con la raza 38 del patógeno, la más frecuente en Asturias.

Dos grupos de descendencias F2 no mostraron segregación para la resistencia. Uno de ellos, constituido por cruzamientos entre los materiales A1231 y A1220, Mexico 222, SEL 1360, BAT 93 y PI-207262. El otro, constituido por cruzamientos entre A1183, A1239, Cornell 49-242 y Sanilac. Estos resultados indican que los materiales dentro del mismo grupo comparten sistemas de resistencia comunes o estrechamente ligados. Se discute la identidad de los genes implicados en la resistencia presente en los distintos materiales, así como la importancia de la raza patogénica en la identificación de tales genes.

ANÁLISIS GLOBAL DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS POR FRÍO EN *Saccharomyces cerevisiae*

Sonia Rodríguez-Vargas^{1,2}; Francisca Randez-Gil¹;
Francisco Estruch^{1,2}

1.- Departamento de Biotecnología. Instituto de Agroquímica y tecnología de los Alimentos (IATA). CSIC. Ap. Correos 73. 46100 Burjassot, Valencia e-mail: soniarv@jata.csic.es.

2.- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia. C/ Doctor Moliner 50. 46100 Burjassot, Valencia.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido históricamente un organismo eucariota modelo para el análisis de la expresión génica. La secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae* en 1997 (Goffeau, *et al* 1997) abrió las puertas al análisis funcional a gran escala, permitiendo analizar miles de secuencias de DNA simultáneamente mediante experimentos de hibridación. Estos experimentos realizados con *microarrays* permiten identificar genes cuya expresión depende de determinadas condiciones genéticas y/o fisiológicas y han contribuido a entender mejor los procesos celulares de la levadura.

El análisis de la expresión génica, a nivel de todo el genoma, en microorganismos implicados en procesos industriales resulta también de particular interés ya que proporciona información que puede ser aplicada en ingeniería metabólica, mejora de los microorganismos como factorías celulares y en la caracterización de su respuesta a estrés (Kuipers, 1999).

Concretamente en este trabajo hemos utilizado *microarrays* de DNA para analizar la expresión génica de la levadura *S. cerevisiae* cuando es sometida a estrés por frío y por congelación. Este análisis nos ha permitido identificar un patrón global de expresión génica, característico de la respuesta de la levadura a estas condiciones de estrés. En esta respuesta hemos encontrado implicadas rutas del metabolismo de amino ácidos, biosíntesis de ácidos grasos y esteroides. Además se han identificado grupos de proteínas relacionadas con el mantenimiento de integridad de la pared celular, proteínas ribosomales y de procesamiento de RNA.

Goffeau, A. *et al.* (1997) *Nature* 387 (suppl.) 1-105.

Kuipers, O.P. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 511-516.

EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE ACEITES DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE EL TEST SMART EN ALAS DE DROSOPHILA

Rojas-Molina, M.M.^a; Campos-Sánchez, J.^a; Idaomar, M.^b; Analla, M.^b; El-Hamss, R.^b; Muñoz-Serrano, A.^a y Alonso-Moraga, A.^a

^aDepartamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Córdoba, España.

^bDepartamento de Biología, Universidad Abdelmalek Essaadi, PO Box 2121, 93002 Tetuán, Marruecos.

Se ha probado el potencial genotóxico de aceites vegetales usados en alimentación y cosmética (sésamo, girasol, germen de trigo, soja, lino, almendras, oliva) utilizando el test de mutación y recombinación somáticas en alas de *Drosophila melanogaster*. Se han seleccionado dos formas de presentación distintas para el aceite de oliva: de primera clase (virgen extra) y de clase inferior (orujo). Se han utilizado dos tipos de cruces: el estándar (STD) y el de alta bioactivación (NORR). Las larvas transheterocigóticas para los genes *mwh* y *flr*³ han sido tratadas con concentraciones de aceite que oscilan entre el 3 % y el 25%. Los resultados muestran que a las dosis más bajas ensayadas sólo han resultado genotóxicos los aceites de sésamo y almendra. A altas concentraciones, sólo los aceites de oliva resultaron ser no genotóxicos. La razón de tal efecto podría estar relacionada con la composición diferencial en ácidos grasos de los aceites ensayados. Los bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados presentes en los aceites de oliva contrastan con los altos niveles del resto de los aceites estudiados. El aceite de oliva virgen extra muestra un posible efecto antígenotóxico, mientras que los resultados del aceite de orujo son inconcluyentes. El alto contenido en polifenoles del aceite de oliva virgen extra comparado con el bajo contenido en el aceite de orujo podría confirmar su papel modulador en la posible capacidad destoxificadora de los aceites de oliva de alta calidad. Tanto el cruce STD como el NORR han proporcionado similares resultados.

COMPORTAMIENTO SINÁPTICO DE HAPLOIDES DE TRIGO HEXAPLOIDE CON DIFERENTE EFICACIA EN EL MECANISMO DE DIPLOIDIZACIÓN

C. Romero¹, C. Cuadrado¹, D.A. Laurie², M. Martínez¹.

¹Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 España. ² Cambridge Laboratory, John Innes Centre, Norwich, NR4 7UJ. Reino Unido.

Se obtuvieron haploides de tres cultivares de *T. aestivum* (Thatcher, Chris y Chinese Spring) mediante cruzamientos por maíz. Los haploides de Thatcher y Chris tenían una media de brazos unidos en metafase I significativamente superior a los de Chinese Spring, indicando que había diferencias en la eficacia del mecanismo de diploidización.

En los mismos tipos de plantas, se analizaron los complejos sinaptonémicos en núcleos profásicos. Se pudo ver, en todos los casos, que la sinapsis empezaba por las regiones subteloméricas en el área del bouquet y que esta estructura desaparecía a medida que progresaba la sinapsis. Los pocos núcleos que se pudieron reconstruir, mostraban asociaciones, presumiblemente homeólogas, y elementos laterales solos sin conexión ninguna.

Los valores máximo y medio del porcentaje de sinapsis eran diferentes en los haploides de los tres cultivares, siendo los de Thatcher los mas altos y los de Chinese Spring los mas bajos. La correlación positiva observada entre sinapsis y comportamiento en metafase I, indica que las diferencias encontradas en esta última fase meiótica entre los distintos tipos de haploides se deben principalmente al nivel variable de sinapsis observado en la profase I. Se discute el comportamiento del locus *Ph1* en dosis simple.

EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *uidA* EN EMBRIONES HAPLOIDES DE TRITICALE UTILIZANDO EL MÉTODO BIOLÍSTICO.

Rubio, Silvia; González, Juan M.; Muñoz, Luis M. y Jouve, Nicolás.

Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares, Madrid. e-mail: juanm.gonzalez@uah.es

Las técnicas actuales de transformación, permiten la introducción de genes específicos en el genoma de una gran parte de las plantas cultivadas. En el caso concreto de los cereales, el método biolístico es el que ha dado mejores resultados. Actualmente, cuando se introduce un gen en una planta receptora, no es posible controlar ni el lugar de inserción ni el número de copias que se insertan. De ahí que en la progenie de la planta transgénica, haya descendientes que no porten y otros que porten en un número variable de copias el gen introducido. Una alternativa que evita esta segregación, es la utilización de células haploides como diana para la introducción del gen de interés. La posterior duplicación de los cromosomas de las plantas regeneradas en el medio selectivo, dará lugar a una planta haploide duplicada y homocigótica para todos sus genes, incluyendo el transgen. En este trabajo se presenta la puesta a punto del método biolístico empleando como material de experimentación embriones haploides obtenidos por androgénesis *in vitro* de líneas de triticale y utilizando un cañón de partículas. Para ello se ha determinado la expresión transitoria del gen *uidA* (β -glucuronidasa) bajo el promotor 35S del CMV. Se han analizado distintos parámetros de disparo como son la presión del disco de ruptura, la distancia del blanco y se ha determinado la influencia del precultivo del material a bombardear.

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A GENES DE RESISTENCIA A RABIA EN GARBANZO (*Cicer arietinum*)

J. Rubio², M. Iruela¹, A. Peralbo², M.T. Moreno¹, J. Gil², T. Millán

¹ Departamento de Mejora y Agronomía, CIFA Alameda del Obispo, Apdo. 4240, 14080 Córdoba.

² Departamento de Genética, ETSIAM Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080, Córdoba.

El garbanzo en nuestro país se ha sembrado tradicionalmente en primavera y al ser un cultivo de ciclo corto, en general, tiene bajos rendimientos. El principal inconveniente para introducir la siembra otoñal en las variedades españolas de calidad es su susceptibilidad al hongo aéreo *Ascochyta rabiei*. Por lo tanto, la obtención de líneas resistentes facilitaría la siembra otoñal y con ello un fuerte incremento de la producción. El uso de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia puede servir de gran ayuda para clarificar la genética de éste carácter y a la selección del material resistente en un programa de Mejora. Nuestro grupo ha iniciado la búsqueda de marcadores moleculares asociados a la resistencia a rabia cribando, en primer lugar, líneas parentales previamente evaluadas para ésta enfermedad. De un total de 109 marcadores RAPD y 99 ISSR hemos obtenido 13 marcadores inicialmente asociados a éste carácter. Para comprobar esta relación, hemos evaluado una población de líneas recombinantes en F₆ derivadas de un cruzamiento entre una línea resistente (ILC3279) y otra susceptible (CA2156). Esta población ha sido evaluada en campo y en invernadero. Las líneas que presentaron valores extremos para la resistencia/susceptibilidad las hemos analizado molecularmente con los marcadores anteriormente citados. Los marcadores que mantienen las diferencias entre líneas resistentes y susceptibles serán incluidos en un análisis de ligamiento utilizando todos los individuos de la población segregante. En el caso de conseguir marcadores RAPD o ISSR estrechamente ligados a la resistencia se obtendrán marcadores SCAR para hacerlos universales.

EFFECTO DE LOS GENES ESTRUCTURA DE PLANTA Y NUMERO DE VAINAS/NUDO SOBRE EL RENDIMIENTO EN GARBANZO.

J. Rubio², A. Peralbo², B. Del Río³, C. Martínez¹, R. Laguna³, A. Ramos³ M. T. Moreno¹ y J. Gil².

¹ Dpto. de Mejora y Agronomía, CIFA Alameda del Obispo, Apdo. 4240, 14080 Córdoba.

² Dpto. de Genética, ETSIAM Universidad de Córdoba.

³ SIA, Valladolid, Junta de Castilla y León

El efecto del gen Hg/hg (erecto/postrado) y del gen S/s (vaina simple/vaina doble) sobre el rendimiento y su estabilidad en garbanzo ha sido estudiado empleando 12 líneas F7 procedentes de un cruzamiento entre una línea homocigótica de doble vaina y porte postrado con otra de vaina simple y porte erecto. Las líneas F7, seleccionadas teniendo en cuenta ambas características (Nº vainas y porte) y su combinación, fueron sembradas en invierno a lo largo de tres años en diferentes localidades siguiendo un diseño de campo de bloques al azar con tres repeticiones, la parcela unidad fue de cuatro surcos de 9 m. y 0.5m. entre surcos. En total se evaluaron las 12 líneas en 16 ambientes diferentes, el rendimiento (kg/ha) fue evaluado cosechando sólo los dos surcos centrales. A los datos obtenidos se le aplicó el análisis de la varianza combinada para todos los ambientes, y el efecto de los citados genes sobre el rendimiento se estudió mediante descomposición ortogonal del efecto línea y de la interacción línea-ambiente. Diferencias altamente significativas fueron obtenidas para el factor línea y para la interacción línea-ambiente, indicando una fuerte dependencia de los genotipos respecto al ambiente. Respecto al gen Hg/hg las líneas de porte postrado (hghg) tuvieron mayor producción que las de porte erecto (HgHg) explicando sus diferencias un 74% de la variación total detectada entre todas las líneas. En cuanto al gen S/s no se apreciaron grandes diferencias entre las líneas de doble vaina (ss) y vaina simple (SS) explicando éstos solo un 10% de la variación total entre líneas. Respecto a la interacción línea-ambiente se observa una mayor tendencia a la estabilidad de los genotipos ss (doble vaina) y HgHg (erecto) ya que éstos explican un menor porcentaje de la variación total de la interacción.

EXPRESIÓN DE UN PROMOTOR INDUCIBLE POR CHOQUE TÉRMICO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana* DEFICIENTES EN METILTRANSFERASA

Julia Rueda¹, Donna Crone² y Joseph Mascarenhas³

¹Departamento de Genética, Facultad de Biología, UCM.

²Biology Department, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York.

³Biology Department, SUNY Albany, Albany, New York.

En plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado, mediante tinción histoquímica con X-gluc, la expresión en las flores de una construcción realizada con el promotor de un gen inducible por choque térmico procedente de soja (GmHSP 17.5E/GUS/NOS). Tras mantener las inflorescencias durante 1 hora a 42°C se ha observado que este promotor es activo en los sépalos, en los filamentos de los estambres y en los estilos, en función del estado de desarrollo de la flor. No se ha observado expresión en pétalos, en ovarios, sacos embrionarios y papilas estigmáticas, ni en anteras (Crone et al., 2001, *Plant Cell & Environment*, en prensa). Esta falta de actividad podría ser debida a represión inducida por metilación en pétalos y tejidos reproductivos. Para contrastar esta hipótesis se han cruzado estas plantas con una línea de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en metilación portadoras de una construcción antisentido del gen MET1 (Finnegan et al. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8449-8454). Se ha estudiado la expresión en inflorescencias de plantas pertenecientes a la F3 seleccionadas en kanamicina. El patrón de expresión tras el choque térmico, fue difícil de establecer debido a la existencia de transformaciones homeóticas parciales de unos verticilos en otros, pero parecía ser básicamente el mismo que en las plantas que portaban únicamente la construcción inicial, excepto porque se observó también expresión en ovarios y sacos embrionarios. Los resultados, aunque no son concluyentes, parecen indicar que los niveles de metilación pueden estar involucrados en la expresión diferencial de este promotor en los distintos órganos florales.

ANÁLISIS DE QTLs DE LA RESISTENCIA AL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.

Ruiz, C., Carbonell, E.A., Cambra, M., Puchades, J. y Asíns, M.J.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
Ctra. Moncada-Naquera, Km 4.5. 46113 Moncada (Valencia).

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) produce la principal virosis que afecta al cultivo de los cítricos en el mundo. El CTV es un virus de ARN perteneciente a la familia de los closterovirus. Actualmente no se conoce ningún cítrico resistente a todos sus aislados. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. es resistente a la mayoría de los aislados, en cambio el naranjo amargo, *Citrus aurantium* L., está muy bien adaptado a las condiciones edafo-climáticas mediterráneas pero es muy sensible al CTV cuando se utiliza como patrón.

El conocimiento de los genes responsables de la enfermedad sería de gran interés en la obtención de nuevos patrones de cítricos resistentes a CTV y adaptados a nuestras áreas de cultivo.

Con el fin de localizar regiones genómicas en *Poncirus* y en *Citrus* implicadas en la multiplicación del virus por la planta, se injertaron sobre naranjo dulce 66 híbridos *C. aurantium* x *P. trifoliata*. y se inocularon con un aislado de CTV de la colección del IVIA. La presencia del virus fue evaluada mediante dos métodos: un método cualitativo, por inmunopresión, y un método semicuantitativo, mediante la técnica de ELISA-DAS.

El análisis de mas de 150 marcadores de ADN (SSRs, SCARs e IRAPs) ha permitido la obtención de un mapa genético para cada especie parental. La utilización de estos mapas en el análisis de QTL ("Quantitative Trait Loci") de multiplicación del virus pone de manifiesto la implicación de mas de una región genómica. La de mayor contribución corresponde al locus *Ctr* de *P. trifoliata*, aunque también se han localizado otras regiones en el genoma de *C. aurantium* implicadas en la multiplicación del virus (*Ctx*). Una de éstas regiones mapea en el mismo grupo de homología donde se localiza *Ctr* en *P. trifoliata*.

Estos resultados son directamente aplicables a la elección de parentales y a la selección precoz dentro de programas de mejora de patrones de cítricos.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ALÉLICA EN ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Ruiz-Casares E¹; Henriques-Gil N¹; Orea M²

¹Sección de Genética. Fac. CC Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo CEU, Madrid. ²Unidad de Genética, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

A partir de una muestra de ADN en la que existan dos o más alelos, y **si no** hay preferencias en la replicación, la cantidad de producto de PCR debe **reflejar** la proporción de las secuencias diana iniciales. Puesto que ciertas aneuploidías y reordenamientos cromosómicos pueden implicar dotaciones dialélicas descompensadas, la determinación de la dosis de cada alelo es importante para conocer el origen de la anomalía. Así, hemos desarrollado una técnica sencilla **para esta cuantificación**: amplificación por PCR de varios marcadores STR a lo **largo del cromosoma problema**, separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida, y densitometrado directo de los geles teñidos con nitrato de **plata**.

En condición disómica normal la proporción de la intensidad entre las dos bandas electroforéticas en caso de heterocigosis es 1:1; **sin embargo, en** individuos trisómicos un locus trialélico presentará una proporción 1:1:1, y un **locus dialélico** una relación 2:1, existiendo diferencias estadísticamente **significativas entre** individuos, especialmente entre disómicos heterocigóticos y trisómicos dialélicos.

Aplicado a un **caso** concreto de trisomía 21 **por reordenamiento** cromosómico, demostramos que el producto de la **amplificación mediante PCR es proporcional** a la cantidad de ADN molde de partida. Se estableció la naturaleza del cromosoma crítico como un isocromosoma de origen paterno.

EVOLUCIÓN DEL CLUSTER LEUCINA EN *Buchnera* ENDOSIMBIONTE PRIMARIO DE LOS PULGONES.

Beatriz Sabater-Muñoz¹, Roeland vanHam², Francisco J. Silva¹, Andrés Moya y Amparo Latorre¹.

¹ Institut Cavanilles de Biodiversidad i Biología Evolutiva y Departamento de Genética de la Universitat de València

² Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial. Centro de Astrobiología, CSIC. Madrid.

Los pulgones son insectos pertenecientes a la superfamilia Aphidoidea, que se alimentan de la savia de las plantas y que viven en simbiosis con *Buchnera*, una γ -proteobacteria. Estudios filogenéticos indican que la simbiosis se inició hace unos 200-250 MA, y desde entonces hospedador y huésped han coevolucionado. Dentro de esta superfamilia se encuentran 5 familias de pulgones, Pemphigidae, Thelaxidae, Lachnidae, Drepanosiphidae y Aphididae (Heie, 1987).

Estudios genéticos en varias especies han revelado, entre otros, la eliminación de dominios reguladores en los enzimas de biosíntesis de fenilalanina y cisteína (Jiménez y col., 2000; Baumann y col., 1995), así como cambios en las rutas de biosíntesis del triptófano y la leucina mediante transferencia a plásmidos, de los genes codificantes de las enzimas limitantes de la síntesis de los mismos (Bracho y col. 1995; Lai y col., 1994; Soler y col., 2000; van Ham y col., 1997, 1999, 2000)

Este trabajo se centra en el estudio de la evolución del cluster leucina en especies de las cinco familias de pulgones. Tres de ellas (Lachnidae, Thelaxidae y Aphididae) presentan el cluster leucina amplificado en plásmido, mientras que las dos familias restantes (Pemphigidae y Drepanosiphidae) lo presentan en el cromosoma. En la familia más ancestral, Pemphigidae, se presentan dos ordenes génicos distintos, *leu*ABCD y *leu*BCDA, con diferente localización en el cromosoma bacteriano. En la familia Drepanosiphidae el cluster leucina presenta el orden *leu*BCDA, y una localización cromosómica diferente a la presentada por los dos anteriores. Se discuten diferentes escenarios evolutivos que indican o bien múltiples inserciones en el cromosoma a partir de uno o varios plásmidos ancestrales, o bien, múltiples amplificaciones a plásmidos pero en este caso con drásticas reorganizaciones en el cromosoma.

ESTRATEGIAS "DOBLE HÍBRIDO" EN EL ANÁLISIS DE LAS
INTERACCIONES MOLECULARES IMPLICADAS EN TRANSDUCCIÓN DE
SEÑALES DE NITRÓGENO

Paloma Salinas, Rafael Maldonado, Isabel Martínez-Argudo y Asunción
Contreras.

División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain

El sistema de dos componentes NtrBC juega un papel fundamental en la regulación transcripcional de los operones implicados en la asimilación de fuentes pobres de nitrógeno. A diferencia de otros sistemas de transducción de señales "ortodoxos", NtrB, el componente sensor del par, es una proteína citoplásmica, cuyas actividades quinasa y fosfatasa son moduladas por PII en función de la relación carbono/nitrógeno. Datos recientes indican que, contra todo pronóstico, PII interacciona con el dominio C-terminal (dominio transmisor conservado) de NtrB, arrojando dudas sobre la función del dominio N-terminal, hasta ahora denominado "sensor".

En nuestro laboratorio hemos utilizado con éxito el sistema del doble híbrido de levaduras para el análisis de interacciones entre dominios concretos de las proteínas NtrB y NtrC, demostrando la especificidad de las interacciones entre los dominios transmisor y receptor. Con el fin de aprovechar el potencial del sistema del doble híbrido en el estudio de las interacciones moleculares implicadas en la transducción de señales en el sistema *ntr*, hemos incluido en los análisis la proteína PII y analizado derivados mutantes de NtrB. Los resultados obtenidos se discuten en relación con los modelos actuales de regulación de NtrB. Paralelamente hemos construido genotecas de *E. coli* y *K. pneumoniae* en el sistema del doble híbrido y estamos buscando proteínas que interaccionen con los componentes de la ruta de transducción de señales. La especificidad de las señales detectadas en el sistema del doble híbrido nos permite ser optimistas sobre la relevancia fisiológica de las interacciones con nuevas proteínas halladas con este sistema.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *REN* Y *eNOS* CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL EN UNA POBLACIÓN DEL SURESTE DE ESPAÑA.

F. Sánchez¹, E. Martínez², L. Carrión², J. A. División², M. Artigao², E. Nava³, J. A. Fernández⁴ y J. Escribano^{1,4}.

¹Área de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete.

²Grupo de Enfermedades Vasculares de Albacete (GEVA).³Área de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete. ⁴Sección de Biotecnología, Instituto de Desarrollo Regional, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete.

La hipertensión arterial esencial es una enfermedad compleja, en cuyo desarrollo intervienen múltiples factores genéticos y ambientales. Se han realizado numerosos estudios de asociación de polimorfismos de genes potencialmente implicados en esta enfermedad en poblaciones de distinto origen (afro-americanos, japoneses, árabes, etc.) habiéndose obtenido resultados contradictorios. Sin embargo, son pocos los estudios de este tipo realizados en la población española.

En este trabajo hemos investigado la asociación entre polimorfismos de dos genes implicados en el control de la presión arterial sanguínea (el gen de la renina, *REN*, y el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial, *eNOS*), con la hipertensión arterial esencial en una población del sureste de España, empleando un diseño de casos-control.

El grupo de casos estuvo formado por 69 hipertensos, y el control por 50 normotensos. El alelo polimórfico *BgII+*, localizado en el intrón 1 del gen *REN*, y caracterizado por la presencia de una diana de restricción para la enzima *BgII*, mostró una frecuencia significativamente superior en la población hipertensa ($\chi^2=30,85$; $p<0,001$). Los polimorfismos analizados para el gen *eNOS* han sido: T→C en la posición -786 de la región promotora, Glu298Asp, y una VNTR bialélica localizada en el intrón 4. Sólo el polimorfismo Glu298Asp mostró asociación con la hipertensión en la población analizada ($\chi^2=8,5$; $p<0,05$). Un análisis preliminar del contenido de óxido nítrico no ha mostrado diferencias significativas en ambas poblaciones. Los resultados obtenidos sugieren que tanto el alelo *BgII+* como el alelo 298Asp pueden ser factores de susceptibilidad para la hipertensión esencial en la población analizada.

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA EN GENES DEL SISTEMA OLFATORIO:
REGIÓN QUE INCLUYE LOS GENES *OS-E* Y *OS-F* EN *DROSOPHILA*

Alejandro Sanchez-Gracia y Julio Rozas

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Las proteínas OS-E y OS-F de *Drosophila* son proteínas de bajo peso molecular que actúan como OBPs (odorant binding protein) y que participan en el proceso de detección y codificación de la señal olfatoria. Los genes que codifican estas dos proteínas se encuentran situados en tandem en la misma región genómica y presentan una elevada similitud en su secuencia de aminoácidos.

Con el objetivo de inferir que fuerzas evolutivas que gobiernan la variabilidad en estos genes se ha realizado un análisis del nivel y patrón del polimorfismo en la región genómica que incluye los genes *OS-E* y *OS-F* en *Drosophila melanogaster*, así como un estudio de la divergencia nucleotídica entre diferentes especies del grupo melanogaster. Los resultados muestran acusadas diferencias entre los dos genes: la tasa evolutiva del gen *OS-E* es mucho más alta en todo el conjunto de especies analizadas destacándose un acúmulo significativo de cambios en la zona codificadora en el linaje de *D. melanogaster*. Los patrones de variabilidad observados permiten inferir la acción de diferentes de fuerzas selectivas sobre estos dos genes.

DESEQUILIBRIO GAMÉTICO ENTRE LOCI MICROSATÉLITES DEL CROMOSOMA X HUMANO

Sande, E., Rodríguez, S. y Zapata C.

Dpto. de Biología Fundamental. Área de Xenética.
Universidade de Santiago.
15782 Santiago de Compostela. essala@usc.es

El estudio de la distribución de las asociaciones no al azar entre alelos de loci diferentes (desequilibrio gamético, DG) a lo largo de los cromosomas, es fundamental para conocer su arquitectura multiloci así como para diseñar e interpretar una experiencia de localización de genes implicados en enfermedades. El objetivo de este trabajo es caracterizar la distribución del DG a lo largo de una región extensa del cromosoma X humano. Con este propósito se analizó el desequilibrio entre todos los posibles pares de 11 loci microsatélites localizados en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X humano, a partir de una elevada muestra de individuos residentes en Galicia. La región cromosómica analizada comprende aproximadamente 18 Mb y 21 cM.

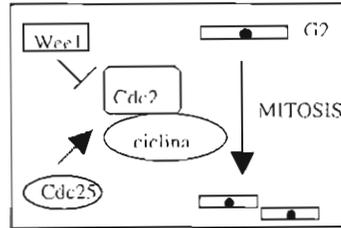
El desequilibrio para cada par de loci microsatélites se analizó teniendo en cuenta el signo de las asociaciones interalélicas, procedimiento que confiere a los tests estadísticos de significación una mayor potencia y permite una estimación más precisa de su intensidad. Los resultados del análisis muestran que los desequilibrios entre loci microsatélites son bastante frecuentes y se distribuyen a lo largo de toda la región cromosómica estudiada. Además, la frecuencia del DG detectada es sustancialmente superior a la descrita previamente en la literatura para marcadores microsatélites del cromosoma X en otras poblaciones europeas. Probablemente, esta discrepancia es más una consecuencia de los distintos métodos analíticos utilizados que de las diferencias de los niveles de desequilibrio entre poblaciones.

HSP 90 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Andrea Santino, Manuel J. Muñoz, Andrés Garzón y Juan Jiménez.

Laboratorio Andaluz de Biología. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla. España.

La proteína encargada de disparar la entrada en mitosis en *S.pombe* es Cdc2, una proteína quinasa dependiente de ciclina. Cdc2 a su vez es regulada por la quinasa Wee1 (que inhibe la entrada en mitosis) y por Cdc25, una fosfatasa que actúa como activador. Este mecanismo es universal para las células eucariotas y su estudio es extrapolable a organismos superiores. *S. pombe* posee estos genes en copia única, lo que facilita su estudio.



La sobreexpresión del inhibidor Wee1 produce una parada del ciclo celular en G2 que causa letalidad. Con el objetivo de encontrar nuevos reguladores de la mitosis se buscaron supresores en multicopia de este fenotipo letal. Así, se identificó el gen *wos2* (M.J.Muñoz et al, Genetics 153:1561-1572, 1999). *wos2* codifica para una proteína homóloga a P23, una cochaperona asociada al complejo Hsp90. Consistentemente, se encontró que dos alelos mutantes de *swol* (el homólogo a Hsp90 en *S.pombe*), *swol-26* (Aligue et al, EMBO J. 13, 6099-6106, 1994) y *swol-w1* (Muñoz y Jiménez, Mol Gen Genet, 261, 242-250, 1999) también suprimían dicho fenotipo. Estos resultados sugieren una relación entre la maquinaria del complejo Hsp90 y el control del ciclo celular, ya que tanto la sobreexpresión de *wos2*, como las mutaciones *swol-26* y *swol-w1* son capaces de suprimir el exceso de actividad de Wee1.

Además, ambas condiciones (la sobreexpresión de *wos2* o la mutación *swol-w1*, producen un fenotipo letal sintético en combinación con determinados alelos de *cdc2* (*cdc2-33* y *cdc2-M26*). Esta interacción genética indica que el complejo de Hsp90 interacciona con Cdc2 y que esta interacción es importante para mantener la función de Cdc2.

Para comprobar si las interacciones genéticas se corresponden con interacciones físicas, se han realizado ensayos de copurificación *in vitro* utilizando extractos crudos de proteínas. Estos experimentos confirman la interacción física entre *Wos2* y Hsp90, apoyando la idea de que *Wos2* es un homólogo funcional de P23. Datos preliminares demuestran una interacción física entre Hsp90 y Cdc2 sugiriendo que Cdc2 podría actuar *in vivo* como un complejo Hsp90-Cdc2.

EVIDENCIAS DE UN MECANISMO EPIGENÉTICO DE INACTIVACIÓN REGIONAL EN EL CROMOSOMA 19 DE RATÓN EN LINFOMAS INDUCIDOS CON RADIACIÓN GAMMA.

Santos J, Herranz M, Fernández M, Vaquero C, López P y Fernández-Piqueras J.

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Unidad de Genética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. 28049-Madrid.

Nuestro equipo ha puesto a punto un modelo animal para el estudio de los linfomas T, con híbridos de ratón (altas tasas de heterocigosidad) sensibles a la inducción de este tipo de tumores con radiación gamma. Este modelo es muy apropiado para la búsqueda de genes supresores mediante la detección de con pérdidas alélicas específicas (regiones candidatas) (Santos *et al.*, 1998; Herranz *et al.*, 1999). Siguiendo esta estrategia hemos detectado una de estas regiones en el cromosoma 19 entre los microsatélites *D19Mit106* (22cM) y *D19Mit100* (27 cM), que contiene dos genes supresores candidatos: *Cd95/Fas* y *Pten*. Ninguno tiene mutaciones en sus regiones codificantes (SSCP-secuenciación), pero ambos están inactivados (RT-PCR) en un alto porcentaje de los casos (34 de 68 tumores, 50%). Sorprendentemente, otro gen (*Jak2*), de conocidas propiedades oncogénicas, situado entre ambos, está también inactivado en 24 de aquellos linfomas (70.6%) y tampoco presenta alteraciones mutacionales. Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que otros genes implicados se inactivan por metilación de sus regiones promotoras, proponemos la existencia de un mecanismo de inactivación epigenético de carácter regional en el cromosoma 19 de ratón que estaría operando durante el desarrollo de los linfomas T.

Santos J, Herranz M, Pérez de Castro I, Pellicer A & Fernández-Piqueras J. 1998 Oncogene 17: 925

Herranz M, Santos J, Salido E, Fernández-Piqueras J & Serrano M. 1999 Cancer Res 59: 2068

Trabajo financiado por Ministerio de Educación y Cultura (PM99/0003)

IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO LOCUS DE RESISTENCIA A LA INDUCCIÓN DE LINFOMAS T CON RADIACIÓN GAMMA EN CEPAS DE RATÓN INTER-ESPECÍFICAS CONGÉNICAS*

Santos J, Vaquero C, Fernández M. , López P, Matabuena M, De Isidro Y, y Fernández-Piqueras J.

Laboratorio de Genética Molecular Humana. Unidad de Genética. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049-Madrid.

La radiación gamma es un potente carcinógeno capaz de inducir linfomas T en cepas sensibles de ratón. Nuestro equipo ha detectado tasas muy altas de inducción en C57BL/6J (cepa muy sensible con una incidencia de tumores en torno al 73.4%) y reducciones significativas en *Mus spretus* (cepa muy resistente con una incidencia de sólo el 3.4%; $\chi^2= 36.4$ P< 0.000001). Los híbridos F1 desarrollan un claro fenotipo de resistencia (incidencia de tumores del 3.2%; $\chi^2= 62.4$ P< 0.000001) sugiriendo la existencia de factores de resistencia de carácter dominante en *M. spretus*. La utilización de cepas consómicas interespecíficas (CI) y cepas congénicas recombinantes interespecíficas (CRI) nos ha permitido identificar un locus de resistencia entre los marcadores D19Mit28 y D19Mit82 del cromosoma 19 responsable de una reducción en la incidencia de tumores hasta el 32.1% ($\chi^2= 20.51$ P< 0.0000007). El alelo resistente podría ser una variante polimórfica funcional de un conocido gen supresor.

* Las cepas consómicas y congénicas utilizadas en este trabajo han sido obtenidas en los laboratorios del Dr. JL Guenet (Inst. Pasteur) y E. Salido (Univ. De La Laguna)

Este trabajo ha sido financiado por la Unión Europea (BIOMED 2. BMH4-98-3426)

ACTIVACION DE ORIGENES DE REPLICACION Y RECOMBINACION EN *Schizosaccharomyces pombe*

Mónica Segurado, María Gómez y Francisco Antequera

Instituto de Microbiología Bioquímica
CSIC/Universidad de Salamanca
Campus Miguel de Unamuno
37007-Salamanca

La recombinación genética tiene un papel importante en la reparación de daños en el DNA durante la replicación. Mutaciones que afectan a proteínas que intervienen en la replicación como DNA polimerasas, helicasas o ligasas aumentan la frecuencia de recombinación mitótica. En eucariotas se ha propuesto que la recombinación entre cromátidas hermanas está implicada en la reparación de lesiones producidas durante la replicación.

Hemos estudiado la recombinación mitótica en *Schizosaccharomyces pombe* durante la fase S del ciclo celular mediante electroforesis bidimensional de intermediarios de replicación. Nuestros resultados indican una mayor frecuencia de recombinación en regiones que contienen orígenes de replicación. El análisis de cultivos sincrónicos revela que la aparición de intermediarios de Holliday sigue la misma cinética que la activación de los orígenes. Además, la integración de marcadores en varios loci genómicos revela que la frecuencia de recombinación homóloga es mucho mayor en regiones próximas a orígenes de replicación. Por otra parte, mutantes de genes de reparación de DNA están simultáneamente afectados en replicación y en recombinación.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los orígenes de replicación en *S.pombe* podrían ser "hotspots" de recombinación y sugieren una posible relación funcional entre la iniciación de la replicación del DNA y la recombinación.

ANÁLISIS DE LA COLONIZACIÓN DE AMÉRICA POR *D. SUBOBSCURA* A NIVEL MOLECULAR

Serra¹, L., Mestres¹, F., Balanyà¹, J., Pascual¹, M., Solé¹, E., Abad¹, L., Latorre², A. and Sabater², B.

¹ Dept. Genètica, Facultat. de Biologia, Universitat de Barcelona

² Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, València

La colonización de América por *Drosophila subobscura* es un fenómeno evolutivo de gran transcendencia. Se han utilizado marcadores moleculares (*loci* microsatélites y el gen *Odh*, Octanol deshidrogenasa) para analizar diferentes aspectos de dicha colonización. Así, se ha estudiado la estructura genética en poblaciones europeas, norteamericanas y sudamericanas de dicha especie mediante 10 *loci* microsatélites (7 autosómicos y 3 ligados al sexo). No se ha detectado diferenciación genética entre las poblaciones europeas indicando que el flujo genético entre ellas es muy elevado. Las poblaciones colonizadoras presentan una elevada reducción del número de alelos, una disminución significativa de la heterocigosis y la misma varianza en el número de repeticiones que las poblaciones europeas, lo que puede explicarse por efecto fundador con una expansión rápida. Mediante esta técnica se ha estimado que el número más probable de individuos colonizadores fue de 4 a 11, suponiendo que todos los alelos presentes en las áreas colonizadas provinieron de Europa. Existe una elevada coincidencia en los alelos observados en las dos áreas colonizadas. Respecto al gen *Odh*, se han obtenido 53 secuencias nucleotídicas a partir de líneas cromosómicas americanas y europeas. En América se han detectado 10 haplotipos, por lo tanto el número mínimo de colonizadores sería de 5. Se encontraron 3 haplotipos distintos en los mismos ordenamientos cromosómicos tanto en Norte como en Sudamérica, confirmando la estrecha relación entre ambos hemisferios. Por último es de destacar que ciertos ordenamientos cromosómicos presentan haplotipos particulares (O_5 , O_{2+4+7} , O_{3+4+7}), mientras que otros no (O_{51} , O_{2+4+8} , O_{3+4}). Posiblemente es debido a la localización del gen *Odh* en los ordenamientos cromosómicos permitiendo diferentes grados de recombinación.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE ESPECIES DE *Lycopersicon*
COLECTADAS TRAS EL AUMENTO POBLACIONAL ASOCIADO AL
FENÓMENO DE EL NIÑO

Sifres, A; Picó, B.; Fernández de Córdova, P.; Soler, S; De Frutos, R.;
Nuez, F.

Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana
(COMAV). Universidad Politécnica de Valencia.

Dada la estrecha base genética del tomate (*Lycopersicon esculentum*), las especies silvestres del género *Lycopersicon* constituyen un recurso genético muy valioso para la mejora de esta hortaliza.

El fenómeno de El Niño de 1997-98, uno de los más severos del último siglo, originó fuertes lluvias sobre algunas regiones desérticas del norte de Perú y sur de Ecuador, hábitat de especies del género *Lycopersicon*. Este cambio climático produjo un fuerte aumento de los tamaños poblacionales de dichas especies. Aprovechando esta circunstancia se efectuó una recolección de entradas de *L. pimpinellifolium* y *L. hirsutum*.

Empleando análisis de Componentes Principales y análisis cluster UPGMA se analizó la variabilidad morfológica de las entradas, entre y dentro de especie, evaluando caracteres de planta, flor, inflorescencia y fruto. Los caracteres de flor e inflorescencia fueron los que presentaron un mayor nivel de variación, encontrándose en *L. hirsutum* una diferenciación altitudinal para estos caracteres.

En ambas especies se identificaron nuevas fuentes de resistencia a tres de las virosis más importantes del tomate a nivel mundial TYLCV, TSWV y ToMV, así como variación para color y contenido en sólidos del fruto.

Cerca de Olmos (Lambayeque) se localizó una reducida área, zona de confluencia de varias corrientes de agua, donde se observó gran variabilidad para *L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum* y *L. esculentum* simultáneamente.

El análisis mediante marcadores moleculares, principalmente microsatélites, está completando la caracterización de la colección.

TRANSFERENCIA DEL GEN DE RESISTENCIA A *Heterodera avenae* (Cre7) DESDE *Aegilops triuncialis* A TRIGO HEXAPLOIDE.

Sin E,³ Montes MJ,¹ Romero MD,² López-Braña I,¹ Andrés MF,² Martín-Sánchez JA,³ Martínez C,³ Benavente E,¹ Gómez-Colmenarejo M¹ y Delibes A.¹

¹Dpto. de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. U.P.M. Avd/ Complutense sn., 28040-Madrid. ²Centro de Ciencias Medioambientales-CSIC. Serrano 115, 28006-Madrid. ³UdI-IRTA. Av. Rovira Roure 177, 25006-Lleida.

Se ha demostrado la transferencia a trigo hexaploide, de un gen dominante de resistencia a *Heterodera avenae* (Cre7) procedente de *Aegilops triuncialis* (líneasTR), mediante el cruzamiento [*Triticum turgidum* (AABB) x *Ae. triuncialis* (UCC)] x *Triticum aestivum* (AABBDD). La resistencia de la línea de 42 cromosomas, TR-353, que se seleccionó por su buen comportamiento en los ensayos de campo e invernadero, se ha transferido a líneas avanzadas de mejora mediante cruzamientos recurrentes con trigos de alta calidad y/o producción, de las que se han estudiado algunos caracteres agronómicos. El gen Cre7 en alguna de estas líneas incrementa significativamente el rendimiento (Kg/ha) en terrenos infestados naturalmente y no introduce efectos deletéreos en ausencia de nematodos.

La segregación del carácter resistencia en las generaciones F₂ de los cruzamientos de líneas con la resistencia conferida por Cre7 y trigos portadores de otros genes de resistencia a *Heterodera avenae* (Cre1, Cre2, Cre3 y Cre4), apoyan la hipótesis de que el gen Cre7 no es alélico con ninguno de ellos. La línea TR-353, que ha sido caracterizada por métodos citológicos (GISH) y fraccionamiento electroforético de 27 sistemas isoenzimáticos de los 7 grupos de homeología, parece no tener ni grandes fragmentos cromosómicos ni cromosomas completos de la especie silvestre donadora. Marcadores de *Ae. triuncialis* de los grupos de homeología 4 [Fosfatasa ácida (AcpH-1), Alcohol deshidrogenasa (Adh-1)], 5 [Malato deshidrogenasa (Mdh-3)] y 7 [Endopeptidasa (Ep-1)] se han encontrado en la línea TR-353, pero no están ligados a la resistencia. Así mismo, ha sido observado en esta línea la ausencia de otros marcadores del grupo de homeología 4 del trigo (□ Amy-D1, Aco-D2/B2 y Amp-B2) sin detectar la presencia de los marcadores correspondientes de *Ae. triuncialis*. El conjunto de los datos parece sugerir que el par de cromosomas 4D ha sido sustituido, en esta línea, por un par del 4B.

CONTROL DE PATERNIDADES Y POTENCIAL DE ASIGNACIÓN RACIAL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MICROSATÉLITES EN 4 RAZAS EQUINAS DEL PIRINEO OCCIDENTAL

A. Solís, B. Jugo, A. Estonba

Animali Biología eta Genetika Dpta., UPV/EHU, Bilbao

En este trabajo se han analizado más de 400 animales pertenecientes a 4 razas equinas del Pirineo Occidental. Euskal Herriko Mendiko Zaldia (EHMZ), Burguete, Pottoka y Jaca Navarra. La genotipificación para doce microsatélites se ha realizado mediante dos PCR multiplex y posterior análisis mediante el Analizador Genético ABI-PRISM 310. El tamaño de los fragmentos amplificados fue estimado mediante el software Gene Scan y la nomenclatura estandarizada en el Test de Comparación organizado por la Sociedad Internacional de Genética Animal en el año 2000.

En cuanto a la aplicación de la genotipificación por marcadores moleculares al control de paternidades, las probabilidades de Exclusión medias obtenidas a partir del análisis de estos doce marcadores en los casos de un parental conocido o ambos no conocidos son del 0.9997 en la raza Burguete y 0.9999 en las tres razas restantes en el primer caso, y sus valores oscilan entre 0.9902 y 0.9970 en el segundo caso.

Por otro lado, se ha realizado una simulación genotípica basada en una distribución de frecuencias alélicas específicas de raza. En este análisis la mayoría de los individuos pudieron ser asignados a su población de origen, aún cuando según nuestros resultados este método se correlaciona negativamente con la variación genética intrarracial.

Por último, se ha realizado un árbol filogenético basado en la proporción de alelos compartidos respecto a todos los loci analizados, utilizando animales individuales como unidades taxonómicas. En el árbol, en el que se incluyen todos los animales genotipados, aparecen diferenciadas las dos razas cárnicas y las dos razas de poney, aún cuando el agrupamiento no es estricto.

Los análisis que estamos realizando permitirán una identificación basada en marcadores moleculares como apoyo a los Planes de Conservación y Mejora que se están desarrollando en las razas analizadas.

MUTANTES CONDICIONALES SENSIBLES A FORMAMIDA EN LA ENZIMA FOSFOFRUCTOQUINASA. UN POSIBLE REGULADOR DEL CICLO CELULAR DE *S.POMBE*.

V. A. Tallada y J. Jiménez.

Laboratorio Andaluz de Biología / Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Estudios genéticos en la levadura de fisión *Schizosacharomyces pombe* permiten el análisis *in vivo* de las funciones de los genes requeridos para el control del ciclo celular.

Con propósito de identificar nuevas funciones implicadas en eventos del ciclo celular buscamos genes causantes de defectos en la división celular por sobreexpresión. Entre los clones aislados identificamos un cDNA parcial correspondiente al gen de la enzima fosfofructoquinasa (pfk), una enzima clave en la regulación del metabolismo energético.

Con objeto de caracterizar en detalle la posible participación de la PFK en el control del ciclo celular, se buscaron mutantes condicionales de esta enzima hipersensibles a formamida. Para ello se mutagenizó un plásmido conteniendo el cDNA completo del gen bajo un promotor regulable usando hidroxilamina (NH₂OH), mutágeno que produce transiciones GC-AT.

Después de analizar 30.000 clones independientes se aislaron 10 distribuidos en distintos grupos fenotípicos. En el presente trabajo se presenta una caracterización más detallada de 5 de ellos.

APROXIMACIÓN FUNCIONAL A USP25 Y USP28, MIEMBROS DE UNA NUEVA SUBFAMILIA DE UBIQUITIN PROTEASAS.

Valero, R., Marfany, G., González-Angulo, O y González-Duarte, R.

Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Barcelona

La búsqueda de genes en el cromosoma 21 humano permitió la caracterización del gen USP25, localizado en 21q11.2 (Valero *et al.* 1999). Mediante ensayos *Northern* y hibridaciones *in situ* demostramos que se expresaba en cerebro fetal y en testículo de ratón. Además ensayos de RT-PCR pusieron de manifiesto transcritos diferenciales en músculo esquelético, testículo y corazón, cuya relevancia funcional es aún desconocida. Recientemente, mediante un análisis comparativo de secuencias (TBlastX) hemos identificado una secuencia homóloga a USP25 en 11q23, el gen USP28. Este nuevo gen, de más de 80 kb, está formado por 25 exones, codifica una proteína de 1077 aminoácidos y presenta isoformas específicas de músculo, corazón y cerebro. USP25 y USP28 comparten un 55.7% y un 51.36% de identidades nucleotídicas y aminoacídicas respectivamente. Este elevado grado de homología estructural junto con su capacidad de hidrolizar ubiquitina *in vivo* sugiere que ambos genes forman una nueva subfamilia dentro de las UBPs (ubiquitin specific proteases). Las UBPs son esenciales para mantener la tasa de recambio proteico intracelular e intervienen en una gran variedad de procesos biológicos: reparación y empaquetamiento del ADN, ciclo celular y presentación de antígenos entre otros (D'Andrea and Pellman, 1998). Además, varios miembros de las UBPs están relacionados con efectos de dosis génica ya que aparecen implicados en síndromes causados por aneuploidías. Si bien desconocemos la contribución de USP25 al síndrome de Down, el hecho que se sobreexpresen en cerebros fetales Down concordaría con las evidencias a favor del efecto de dosis descrito para estas otras UBPs.

Bibliografía:

-D'Andrea and Pellman. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**: 337-352

-Valero, R; Marfany, G; González-Angulo, O; González-González, G; Puellas, L; González-Duarte, R. *Genomics*: **62**, 395-405 (1999)

PROTEÍNAS DE PERED CELULAR DE *Trichoderma harzianum*.

Valle I., Codón A.C., Govantes J., y Benitez T.

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla. Avenida de Reina Mercedes, 6. 41012. Sevilla, España.

T. harzianum es un agente de biocontrol de diversos hongos fitopatógenos, a los que ataca produciendo enzimas, antibióticos o compitiendo por el espacio. Sin embargo, existen pocos estudios sobre los aspectos defensivos de *Trichoderma* frente al ataque de estos hongos fitopatógenos.

Nosotros hemos aislado un gen llamado *qid74* que se expresa solamente bajo condiciones desfavorables tales como hambre de carbono o nitrógeno, y que parece codificar una proteína de pared. La sobreexpresión de *qid74* podría proteger a *T. harzianum* en condiciones hostiles tales como estrés osmótico, hídrico o conferir resistencia a enzimas líticas.

Hemos cotransformado la cepa de *T. harzianum* CECT 2413, con el plásmido pLMRS3 que porta el gen *qid74* bajo el control del promotor constitutivo *pki*, sobreexpresando este gen, y con el plásmido p3SR2 que lleva el gen *amdS* que permite al hongo crecer usando como fuente de nitrógeno la acetamida. También hemos llevado a cabo la disrupción de *qid74* insertándole el marcador *amdS*. Hasta ahora no se ha observado ningún fenotipo diferente con respecto al silvestre, tanto en los transformantes que sobreexpresan *qid74*, como en las cepas con el gen interrumpido.

Por último, se ha llevado a cabo la fusión del gen *qid74* con el gen de la proteína verde fluorescente para determinar la localización de la proteína.

ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL HETERÓLOGA EN LEVADURA.

Manuela Vanti y Sebastián Chávez

Departamento de Genética. Universidad de Sevilla. Avda. de Reina Mercedes. 6. Facultad de Biología. E41012 Sevilla (España).

Se están describiendo cada vez más genes eucarióticos cuya regulación se desarrolla a nivel de la elongación de la transcripción. Recientes estudios, la mayoría de ellos realizados *in vitro* mediante técnicas bioquímicas, han llevado a la identificación de varios factores generales de transcripción que actúan a nivel de la elongación. Algunos de estos factores, como TFIIF, CSB y la elonguina, influyen sobre la elongación suprimiendo pausas de la RNA polimerasa II; TFIIS previene la parada de la RNAPII e induce el corte del transcrito nascente; DSIF contrarresta el efecto de factores positivos de elongación; el complejo FACT facilita la transcripción sobre moldes de cromatina. Se han descrito homólogos putativos de cada uno de estos factores en *Saccharomyces cerevisiae* y se dispone de estirpes de levadura mutantes en los genes que codifican para ellos. Hemos decidido aprovechar todo ello para estudiar la elongación transcripcional de genes animales. En primer lugar, estamos reconstruyendo sistemas transcripcionales de algunos genes de mamífero en *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello hemos fusionado elementos reguladores *in cis* con genes marcadores de levadura y hemos expresado los transactivadores específicos de los genes. Mostramos los primeros resultados de esta estrategia y discutimos el uso de levaduras como herramienta genética para investigar elongación transcripcional heteróloga.

ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN EN LOCI MICROSATÉLITES DE *Drosophila melanogaster*.

J. F. Vázquez, J. Albornoz y A. Domínguez.

Dpto. de Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo.

Se estudiaron las mutaciones en loci microsatélites en un conjunto de 175 líneas de acumulación de mutaciones, procedentes de una única población homocigótica de *Drosophila melanogaster*. Cada una de estas líneas se mantuvo independientemente mediante el cruce de una pareja de hermanos, y durante 80 generaciones.

En estas líneas se probaron 28 loci microsatélites y se detectaron dos mutaciones. Una de las mutaciones se localizó en el locus microsatélite *DROYANETSB*, y consiste en la adición de una única unidad del dinucleótido repetido (TG). La otra mutación se detectó en el locus *DMSGG3*, en este caso se trata de una delección de cinco unidades del trinucleótido repetido (CAG).

Se obtuvo una tasa de mutación media de 5.1×10^{-6} . Este dato confirma dos estimaciones previas realizadas por otros autores en líneas de acumulación de mutaciones, que señalaban que los loci microsatélites en *D. melanogaster* tienen tasas de mutación medias del orden de 10^{-6} .

IDENTIFICACIÓN DE LAS PERMEASAS DE TREONINA Y HOMOSERINA EN *Saccharomyces cerevisiae* Y SU PAPEL EN EL NIVEL INTERNO Y EXTERNO DE ESTOS AMINOÁCIDOS.

Velasco, I.* ; André, B.** y Calderón, I.L.*

*Departamento de Genética. Universidad de Sevilla. Ap. 1095. 41080-Sevilla, España

** Laboratoire de Physiologie Cellulaire. Université Libre de Bruxelles. Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires. 6041-Gosselies, Bélgica

La excreción de aminoácidos por microorganismos que los superproducen constituye un fenómeno ampliamente observado pero aún poco caracterizado. Nuestro grupo dispone de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que superproducen hasta 400 nmoles de treonina/mg PS, treonina que se distribuye de manera variable entre el interior celular y el medio de cultivo. Este fenómeno se observa también para la homoserina, intermediario en la ruta biosintética de la treonina. Según hemos podido constatar, existen factores genéticos y ambientales que modulan la excreción de estos aminoácidos.

En *S. cerevisiae* la treonina entra en la célula mediante al menos dos sistemas de transporte, los determinados por los genes *GAP1* y *AGP1*. El doble mutante *gap1 agp1* es capaz de crecer en treonina como única fuente de nitrógeno, lo que implica que debe haber otras permeasas para este aminoácido. Con el fin de investigar cuales son estas permeasas, se han construido mutantes con deleciones en seis genes de la familia de permeasas de aminoácidos AAP. Los resultados demuestran que *GNP1* es una permeasa de treonina y que su contribución a esta actividad es mucho más importante cuando crece en una fuente rica de nitrógeno (amonio), que en una fuente pobre (prolina), donde *AGP1* es la permeasa más importante tras *GAP1*. La homoserina parece compartir con la treonina todas sus permeasas. Por último, la medida de las concentraciones interna y externa de treonina y homoserina sugiere que las permeasas actúan contrarrestando la salida que tiene lugar por vías aún desconocidas pero que están siendo investigadas.

CONTROL GENÉTICO DE LA CAPACIDAD DE ORGANOGÉNESIS *IN VITRO* EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. I.- OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DESCENDENCIAS F1.

Velázquez I., de la Peña A., Candela M.

Departamento de Genética. Universidad Complutense de Madrid.

En este trabajo se analiza el control genético de las diferencias detectadas en la capacidad para rediferenciar brotes aéreos a partir de cultivos *in vitro* iniciados con distintos explantes (hoja y raíz), en líneas de los ecotipos Landsberg *erecta* (Ler), Columbia (Col) y Cape verde island (Cvi), que fueron usadas como parentales de líneas recombinantes consanguíneas (RILs), cruzando Ler x Col (Lister y Dean, 1993) y Ler x Cvi (Alonso-Blanco et al., 1998). Se han analizado varias réplicas no simultáneas, para minimizar la variación ambiental. Se ha medido la capacidad de regeneración mediante distintos índices : tasa de regeneración (RR), media de brotes regenerados por callo (SRC) y por callo que regenera (SRRC) en las líneas parentales y en las F1.

Tanto en los parentales como en las F1 los cultivos de raíz regeneran mejor que los de hoja. En cultivos de raíz la capacidad de regeneración de Ler es muy alta, la de Col alta y la de Cvi baja, mientras que en los cultivos de hoja, la de Ler es media-alta, la de Cvi baja y la de Col muy baja, resultados que confirman observaciones previas (Candela et al., 2001).

Las F1 no muestran diferencias significativas debidas a la dirección del cruzamiento, por lo que pueden descartarse efectos maternos sobre este carácter.

En los cultivos de hoja, en ambos cruzamientos un parental tiene regeneración media-alta (Ler) y el otro baja o muy baja, y en los dos casos la F1 es más parecida, aunque algo más baja, al parental que mejor regenera (Ler), lo que indicaría la existencia de genes dominantes con un efecto positivo sobre la capacidad de regeneración.

En los cultivos de raíz cuando, como antes, uno de los parentales tiene capacidad de regeneración muy alta (Ler) y el otro baja (Cvi), la F1 se parece más al parental que más regenera. Sin embargo, cuando los dos parentales tiene capacidad de regeneración alta (Col) o muy alta (Ler), la F1 es algo mejor que el parental que más regenera.

Estos resultados indicarían herencia poligénica, efecto aditivo y dominancia de, al menos, algunos de los alelos que favorecen la capacidad de regeneración.

CONTROL GENÉTICO DE LA CAPACIDAD DE ORGANOGÉNESIS *IN VITRO* EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. II.- FACTORES QUE AFECTAN A LA IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE QTLs MEDIANTE ANÁLISIS DE RILs.

Velázquez I., de la Peña A., Candela M.

Departamento de Genética, Universidad Complutense de Madrid.

En un análisis preliminar en el que se utilizaron muestras de 30 RILs del cruzamiento Ler x Col (Lister y Dean, 1993), se identificaron distintos QTLs implicados en la capacidad de regeneración de brotes aéreos (medida como la media de brotes regenerados por planta, SR) a partir de explante de hoja cultivados en CIH/SIH y de raíz cultivados en CIR/SIR (Schiantarelli et al, 2001).

Con el fin de precisar mejor la situación de estos QTLs y descartar, en su caso, falsos positivos se han analizado muestras de mayor tamaño (100 RILs), se han utilizado diferentes índices para medir la capacidad de regeneración, como son el porcentaje de callos que regeneran (tasa de regeneración, RR) o la media de brotes regenerados por callo (SRC) y se han empleado matrices con diferente número de marcadores moleculares.

Para determinar la existencia de QTLs que se expresan en función del tipo de explante (y no de otras variables, como los medios de cultivo), se han analizado muestras de 30 RILs cultivando simultáneamente explantes de hoja y raíz en los mismos medios. Se han utilizado solamente los medios CIH/SIH (modificados de Feldmann y Marks, 1986), puesto que en los CIR/SIR (modificados de Valvekens et al., 1988) los cultivos de hoja regeneran con tasas muy bajas (Candela et al., 2001).

Asimismo, se han analizado muestras de 25 RILs Ler x Cvi y 25 Cvi x Ler (Alonso-Blanco et al., 1998).

Se discuten los resultados del mapeo en función de las distintas variables introducidas: tipo y número de RILs, matriz de marcadores moleculares, índices utilizados para medir el carácter y explante de partida.

CONTROL DEL TAMAÑO FLORAL EN *ANTIRRHINUM MAJUS*.

Weiss, Julia; Ruth Puche; Amalia Roca; Ignacio Garcia-Escudero, Carlos Miras, Luis Cervantes, Francisco Bel y Marcos Egea-Cortines

julia.weiss@upct.es; marcos.egea@upct.es

Área de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Cartagena, 30868 Cartagena

<http://www.upct.es/~genetica/Investigacion.htm>

En angiospermas, el tamaño de las flores parece estar bajo un control muy superior al observado para otros órganos, cuya variabilidad en tamaño es más afectada por condiciones ambientales. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, mutantes que afectan el tamaño de la flor afectan también a su arquitectura, lo cual impide estudiar como se controla en tamaño final de las flores. Estamos estudiando el tamaño de la flor utilizando mutantes de la colección de germoplasma de Gatersleben, cuyo fondo genético común es la línea Sippe50. Hemos identificado mutantes que producen plantas más pequeñas y flores más pequeñas, que incluyen *nana*, *rotundiflora* y *unilabiata*, mutantes que no afectan al tamaño de la parte vegetativa pero sí a las flores, que incluyen *compacta*, *compacta ähnlich*, *Nitida* y *abreviata*, mutantes que producen flores grandes o muy grandes que incluyen *formosa* y *Grandiflora*. La hipótesis que hoy se acepta es que grupos de células del meristemo apical adquieren una identidad de primordio y posteriormente adquieren una identidad vegetativa o floral, dependiendo del programa que se encuentre activo. Si esto es cierto, debe de existir en la planta salvaje un sistema que determina el número mínimo de células que forman un primordio floral, o controlar su expansión para que el tamaño final no varíe. Estamos desarrollando cruces entre mutantes que producen más primordios florales de lo normal (*densiflora*) o cuya dominancia apical está comprometida (*densirramea* y *caperucita roja*), con el objeto de determinar si la partición excesiva del meristemo puede tener efectos adicionales sobre los fenotipos observados. Así mismo estamos analizando cruces con *eramosa*, incapaz de producir primordios laterales, con el objeto de determinar el efecto contrario.

Los resultados iniciales de análisis de *compacta* y *unilabiata* muestran que dentro de los pétalos existen bordes de identidad cuyo crecimiento es independiente del crecimiento de las zonas anteriores, lo que sugiere un control complejo del desarrollo de la flor en lo que a tamaño se refiere.

AISLAMIENTO DE UNA FAMILIA ANÁLOGA A LOS GENES DE RESISTENCIA EN LE GENERO *LENS*

Yaish, M.W.F. y Pérez de la Vega, M.

Area de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León

Las secuencias que codifican motivos conservados de las proteínas de resistencia se han considerado como Análogos de Genes de Resistencia (RGA). Se han usado cebadores degenerados homólogos a las zonas NBS y LRR de las proteínas de resistencia para amplificar estas secuencias del género *Lens* (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides* y *L. negricans*) usando la técnica de PCR. Se han obtenido fragmentos de tamaño aproximados entre 500 y 800 pb, dependiendo de la combinación de los cebadores. Digestiones de los productos de PCR con enzimas con dianas de 4-pb indican la presencia de una familia multigenica. La clonación y el análisis de las secuencias nucleótidas mostraron por lo menos cinco familias de este tipo de genes con un porcentaje alto de homología (hasta un 84%) con otros genes de resistencia pertenecientes a otras géneros de plantas. Las secuencias del aminoácidos que codifican estas secuencias indican que todas tienen las zonas conservadas de los aminoácidos (motivos P-loop, Kinase2a, Kinase3a, GLPL y MHD) presentes en la mayoría de los genes de resistencia. Los árboles filogenéticos indican que las secuencias del (RGA) del género *Lens* están presentes entre la mayoría de las clases de otras familias de (RGA) aislados de otras plantas. Dado que se posee poca información tanto de la genética como la naturaleza de la resistencia a las enfermedades de la lenteja, creamos que este trabajo muestra un paso inicial para la identificación de los genes de resistencia en esta especie.

NUEVOS GENES DE LA CAROTENOGÉNESIS DE *NEUROSPORA*

Loubna Youssar¹, Tom Schmidhauser² y Javier Avalos¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

²Department of Biology, U. of Louisiana at Lafayette, LA, E.E.U.U.

Los únicos genes reguladores de la carotenogénesis conocidos en *Neurospora* son *wc-1* y *wc-2*, que median la inducción por la luz de los genes estructurales *al-1*, *al-2* y *al-3*. Estos dos genes no son específicos de la carotenogénesis, ya que median también otras fotorrespuestas.

Un mutante de *Neurospora*, denominado *ovc* (Harding et al. *Neurospora* newslett. 1984, 31:23-25), es sensible al incremento de la presión osmótica en el medio y acumula más carotenoides que la estirpe silvestre en la luz. Hemos clonado el gen responsable del fenotipo *ovc* seleccionando complementación de la sensibilidad a presión osmótica tras transformación con una cosmidoteca ordenada. Hemos identificado un segmento de ADN de 3.6 kb, capaz de complementar la mutación, que contiene un gen con similitud con una sintetasa de fosfatidilo de *S. pombe*. Se investiga actualmente la relación de este gen con el fenotipo pleiotrópico del mutante.

A fin de identificar nuevos genes reguladores de la carotenogénesis de *Neurospora* hemos buscado mutantes productores de carotenoides en la oscuridad. No se identificó ningún mutante entre 500.000 supervivientes de la estirpe silvestre a una exposición a radiación ultravioleta, pero se han aislado dos mutantes entre 20.000 supervivientes de la estirpe *ovc*. Los dos mutantes, denominados *lic* (de carotenogénesis independiente de la luz) crecen de forma colonial y acumulan más carotenoides en la oscuridad que la estirpe silvestre.

Los genes *al* median la síntesis de carotenoides hasta toruleno. No se ha identificado aún el gen responsable del último paso de la ruta biosintética, la rotura oxidativa del toruleno para dar neurosporaxantina. Como primer paso para la identificación del gen, hemos aislado mutantes que acumulan toruleno, a los que hemos llamado *red*.

Esta comunicación describe el fenotipo de los mutantes *ovc*, *lic* y *red*, y la clonación del gen *ovc*.

CLONACIÓN PARCIAL Y ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN *SOX9* DE *Talpa occidentalis*

Federico Zurita Martínez, Francisco Barrionuevo Jiménez, Miguel Burgos Poyatos y Rafael Jiménez Medina

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.

La determinación del sexo en mamíferos depende de la interacción entre productos y secuencias reguladoras de genes tales como *SFI*, *DAX1*, *WNT4* y el gen determinante testicular *SRY*, localizado en el cromosoma Y. Además, múltiples evidencias sugieren que el gen *SOX9* es imprescindible para que se produzca la citodiferenciación de las células de Sertoli, un hecho que juega un papel central en el proceso de diferenciación testicular. Se asume que estas células son las que inducen al resto de componentes del primordio gonadal indiferenciado a seguir una ruta de desarrollo testicular. Esto implica la diferenciación de: 1) células de Leydig, que producen testosterona, 2) células mioideas que envuelven los túbulos seminíferos, 3) una túnica albugínea que envuelve al testículo, y 4) un profuso sistema vascular que evacua las hormonas testiculares. Además, las células de Sertoli producen hormona antimülleriana, que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller, precursores de la mayor parte del tracto reproductor femenino.

Las hembras del topo ibérico *Talpa occidentalis* representan un caso extraordinario de reversión sexual XX ya que, aunque son fértiles, todas ellas poseen dos ovotestes con una porción de tejido testicular disgenésico.

Actualmente estamos estudiando en el topo el perfil de expresión de varios genes implicados en la determinación sexual de mamíferos. Aquí presentamos los datos preliminares del estudio sobre *SOX9*, que incluyen la clonación y secuenciación de un fragmento de este gen, y su patrón de expresión en machos, mediante la técnica de RT-PCT.

Tanto la alta homología encontrada entre el gen *SOX9* de *T. occidentalis* y el de otras especies de mamíferos, como su patrón de expresión suponen datos adicionales que demuestran el alto nivel de conservación evolutiva de este gen. Este hecho afianza la hipótesis de que *SOX9* ejerce varias e importantes funciones, no solo durante el desarrollo gonadal, sino también en el de otras partes del organismo de mamíferos y otros vertebrados.

DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS EN EL BASIDIOMICETO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus*

Z. Zurutuza, N. Alonso, A. Eizmendi, M. Peñas, A.G. Pisabarro, y L. Ramírez

Depto. de Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra. 31006 Pamplona

Pleurotus ostreatus es un hongo basidiomiceto cultivado industrialmente para la producción de setas comestibles sobre restos vegetales que además tiene interés biotecnológico por su capacidad para producir enzimas y metabolitos secundarios de interés aplicado. El número de cepas con interés industrial es reducido y, por otra parte, éstas están relacionadas genéticamente entre sí aunque se comercialicen como variedades diferentes. En nuestro laboratorio estamos interesados en desarrollar sistemas de identificación y tipificación de cepas industriales que, a su vez, nos informen de las relaciones filogenéticas entre ellas. Para estos, hemos desarrollado las dos estrategias que se describen a continuación.

En primer lugar, se ha desarrollado un sistema de tipificación basado en microsatélites. Estas secuencias repetidas están distribuidas por todo el genoma y pueden ser amplificadas por PCR usando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias de los microsatélites aislados de una genoteca genómica construida para tal fin. Hemos conseguido obtener cinco parejas de cebadores que amplifican cinco microsatélites que están presentes y muestran polimorfismo en la mayoría de las cepas estudiadas. Estas secuencias, por otra parte, se pueden usar como marcadores de RFLP que revelan un perfil único para cada una de las cepas de origen europeo o norteamericano estudiadas.

Por otra parte, se ha clonado y secuenciado la región ITS correspondiente al complejo de genes de rDNA en *P. ostreatus*. La amplificación de las correspondientes regiones en las diferentes cepas producen fragmentos de ADN que pueden ser diferenciados por los diferentes patrones de fragmentos de restricción que producen como consecuencia de la digestión con enzimas de corte frecuente.

Los dos sistemas de tipificación descritos permiten evaluar la similitud de las diferentes cepas y construir dendrogramas que facilitan la reconstrucción de la filogenia de las variedades industriales de *P. ostreatus* utilizadas actualmente.

AGRICULTURA

GANADERÍA

PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIAS

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A.

ISBN 84-8474-031-5



9 788484 740315

P.V.P.: 1.850 ptas.
11,11€



JUNTA DE ANDALUCÍA

Consejería de Agricultura y Pesca