

## **4. DISCUSSIÓ**

## 4.1 Homologies cromosòmiques entre *D. melanogaster* i les espècies del grup *repleta*

El 92 % dels marcadors han proporcionat resultats positius en les hibridacions heteròlogues. Totes les sondes procedeixen del braç cromosòmic 3R de *D. melanogaster*, i han hibridat al cromosoma 2 de les espècies del grup *repleta*. Només el marcador DS05426 ha produït un senyal secundari al cromosoma X. Aquests resultats són coherents amb la hipòtesi de la conservació del contingut genètic dels elements cromosòmics a *Drosophila* (Muller 1940; Sturtevant i Novitski 1941) i amb les homologies cromosòmiques proposades entre *D. melanogaster* i el grup *repleta* proposades per Schafer *et al.* (1993).

Els senyals d'hibridació que produeixen les sondes gèniques sobre els cromosomes de *D. repleta* i *D. buzzatii* s'atribueixen inequívocament als gens continguts en aquestes sondes. Però els cosmidis i els bacteriòfags P1 solen contenir més d'un gen, i no es pot determinar amb certesa quina o quines són les regions responsables dels senyals d'hibridació. Per tant hem d'interpretar el nombre de senyals obtinguts en els cromosomes de *D. repleta* i *D. buzzatii* com un nombre mínim de regions homòlogues, ja que és possible que la sonda contingui altres regions no suficientment conservades per ser detectades. Els resultats negatius obtinguts en 5 bacteriòfags P1 es deuen possiblement a què no contenen cap regió suficientment conservada.

### 4.1.1 Homologies cromosòmiques entre *D. repleta* i *D. buzzatii*

Totes les sondes que s'han cartografiat a *D. repleta* i a *D. buzzatii* s'han localitzat a la mateixa banda del cromosoma 2. Només en el cas del marcador DS05426 s'ha detectat un senyal secundari en el cromosoma X de *D. buzzatii* que no s'ha detectat a *D. repleta*. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts quan s'han comparat tots els marcadors cartografiats a les dues espècies (Ranz *et al.* 2001; González *et al.* 2002). Només un marcador dels 297 cartografiats es localitza a cromosomes diferents a les dues espècies (Ranz *et al.* 2003). Aquesta localització s'ha atribuït a la transposició gènica. El resultat ha permès estimar la taxa de fixació de transposicions gèniques al

gènere *Drosophila*, que és més baixa que la d'inversions (Ranz *et al.* 2001; González *et al.* 2002).

El cromosoma 2 és el que presenta més diferències entre *D. repleta* i *D. buzzatii*. Segons la comparació de la morfologia i el patró de bandes dels cromosomes es va proposar que s'havien fixat 7 inversions en aquest cromosoma durant la divergència entre *D. repleta* i *D. buzzatii* (Ruiz i Wasserman 1993). Posteriorment, gràcies a l'elaboració de mapes físics a les dues espècies, es va proposar l'existència de dues inversions més en la regió distal del cromosoma. La reordenació que s'ha produït en aquesta regió no es pot explicar només amb una sola inversió, i és necessària la participació de dues inversions més (Ranz 1998; Ranz *et al.* 2003). La comparació de les posicions dels marcadors utilitzats en aquest treball en les dues espècies és coherent amb aquesta darrera proposta, segons la qual hi hauria 9 inversions fixades en el cromosoma 2 entre *D. repleta* i *D. buzzatii*.

#### **4.1.2 Eficiència dels marcadors utilitzats**

Les taxes d'èxit en les hibridacions heteròlogues amb les sondes de *D. melanogaster* són del 100 per cent per als gens i els cosmidis i del 89 per cent per als bacteriòfags P1. Aquesta diferència pot ser deguda a la diferent proporció entre seqüències conservades i no conservades que hi ha entre els tres tipus de marcadors. L'èxit de la hibridació dependria del contingut dels clons utilitzats, de manera que els clons que continguin una major proporció de seqüències conservades hibridarien amb més facilitat. Els cosmidis i el bacteriòfags P1 contenen seqüències codificants i no codificants, i això podria fer disminuir l'èxit de les hibridacions. Tot i això les petites diferències en la taxa d'èxit detectades en aquest treball poden deure's al major nombre de P1 utilitzats i la petita mostra de gens i cosmidis (Taula 9, a Resultats). A González *et al.* (2002) es resumeixen els resultats de tots els marcadors que s'ha intentat cartografiar a *D. repleta* i *D. buzzatii* (excepte els de la regió 95 de *D. melanogaster* cartografiats en aquest treball). Les taxes d'èxit són de 73,7 % (gens), 82,6 % (cosmidis) i 81,3 % (bacteriòfags P1). Tot i que les diferències no són estadísticament significatives (González *et al.* 2002), aquests resultats suggereixen una explicació diferent a l'anterior. Possiblement l'èxit de la hibridació no es deu a la proporció entre seqüències conservades i no conservades sinó a la presència d'alguna seqüència conservada. Un augment en la mida dels clons faria augmentar la probabilitat de que

aquests continguessin alguna seqüència suficientment conservada. El fet que la majoria dels bacteriòfags P1 i la totalitat dels cosmidis hagin hibridat no és estrany tenint en compte que la seva mida mitja és de 40 kb i 80 kb respectivament (apartat 2.2.4.2, a Material i Mètodes). Per altra banda, el 100 % dels bacteriòfags P1 de *D. virilis* ha produït senyals d'hibridació a *D. buzzatii*. Aquest èxit es deu a la menor distància filogenètica entre les espècies del grup *repleta* i *D. virilis* (Spicer 1988).

Hi ha diferents aspectes que cal tenir en compte sobre la idoneïtat del tipus de marcadors que s'han d'utilitzar en aquests treballs. El principal argument a favor de la utilització dels gens és la major facilitat per interpretar els resultats. És molt probable que un gen doni un senyal únic, mentre que amb els bacteriòfags P1 i els cosmidis augmenta la probabilitat d'obtenir més d'un senyal, ja sigui per què continguin diferents gens o bé seqüències repetitives. El més habitual és que els diferents senyals es deguin a què el marcador conté un o més punts de trencament fixats (veure apartat 4.2). Tot i el major recobriment que s'aconsegueix amb bacteriòfags P1 i cosmidis no es pot saber amb seguretat quina és la part del marcador responsable del senyal obtingut en una hibridació heteròloga. Per tant podem tenir regions recobertes a l'espècie de referència de les quals no detectem la seva regió homòloga a les altres espècies. Aquest problema seguirà existint fins i tot quan es tingui una regió recoberta al 100 %, i es el que fa que el nombre de punts de trencament obtinguts sigui sempre una estima mínima. Tot i això aquest problema queda parcialment solucionat quan, com en el cas d'aquest treball, s'utilitzen diferents marcadors que en alguns casos són solapants, fent que algunes seqüències estiguin representades total o parcialment en més d'un marcador. D'aquesta manera és més probable que el segment conservat al que pertany la seqüència sigui identificat per algun marcador. Per altra banda, la major disponibilitat de cosmidis i bacteriòfags P1, i la possibilitat d'aconseguir clons procedents de pràcticament qualsevol regió dels cromosomes de *D. melanogaster*, són factors a favor de la utilització d'aquests marcadors.

Hi ha altres tipus de clons disponibles, com els BAC (cromosomes artificials de bacteri) o els YAC (cromosomes artificials de llevat). La seva mida mitja, de 165 i 210 kb respectivament (BDGP; Ajioka *et al.* 1991; Cai *et al.* 1994), permetria recobrir grans regions amb un nombre relativament baix de marcadors, tot i que possiblement augmentarien els problemes en la interpretació dels senyals. En el cas del YAC utilitzat en aquest treball (DY852) van aparèixer algunes dificultats tècniques que van fer que no s'utilitzessin més marcadors d'aquest tipus. Els principals desavantatges van ser el

temps necessari pels cultius de llevat (72 hores aproximadament), la utilització de l'electroforesi de camp polsant (més complicada i lenta que l'electroforesi convencional), i la poca quantitat de DNA que s'obtenia en recuperar bandes d'agarosa d'aquests gels.

## **4.2 Evolució cromosòmica a *Drosophila***

El canvi cromosòmic més freqüent a *Drosophila* són les inversions cromosòmiques. Per tant, el canvi de posició que mostren els marcadors entre *D. melanogaster* i el grup *repleta* es deu principalment a les inversions paracèntriques. La comparació de l'organització molecular dels marcadors utilitzats a les diferents espècies permet estimar la quantitat d'inversions fixades entre les espècies estudiades. Si els marcadors de la mateixa regió de l'espècie de referència hibriden a  $n$  llocs de l'espècie estudiada, aquesta regió conté com a mínim  $n-1$  punts de trencament fixats durant la divergència d'aquestes espècies.

En cinc casos s'han obtingut dos senyals d'hibridació a les espècies del grup *repleta*. Són el cosmidi 167A9 i els bacteriòfags P1 DS00184, DS02384, DS06669 i DS09067. El cosmidi 167A9 és un marcador intern del segment conservat 147A8-171D2, que hibrida a la banda B3g (Figura 7). Per tant, el segon senyal que 167A9 produeix no es deu a una nova inversió. En el cas de DS00184 i DS09067 els dos senyals que produeixen coincideixen amb els de clons contigus, amb els quals comparteixen parcialment la seva seqüència (Figura 7). Per tant es considera que aquests dos clons contenen un punt de trencament fixat entre les espècies del grup *repleta* i *D. melanogaster*. Per últim, els marcadors DS02384 i DS06669 també produeixen dos senyals d'hibridació. En els dos casos un dels senyals coincideix amb el produït per un marcador adjacent amb el que comparteix parcialment la seqüència, mentre que l'altre senyal apareix en un lloc diferent (Figura 7). En aquests dos casos, degut a la intensitat dels dos senyals, la mida del segment que formen els marcadors, i la major freqüència de les inversions paracèntriques comparat amb altres tipus de canvis cromosòmics, s'ha considerat que els clons també contenen un punt de trencament fixat entre el grup *repleta* i *D. melanogaster*. La consideració de què els clons que produeixen més d'un senyal d'hibridació contenen punts de trencament fixats durant la

divergència entre les espècies que es comparen s'ha utilitzat en altres estudis per calcular el número d'inversions fixades (Segarra *et al.* 1995).

A la Taula 19 es resumeixen els resultats obtinguts en les tres regions estudiades en aquest treball. També es mostren els resultats de l'estudi de la regió 95A-96A (Ranz *et al.* 1999). Les quatre regions es troben al braç cromosòmic 3R de *D. melanogaster* i s'ha estudiat detalladament quina és la seva organització molecular a les espècies *D. repleta* i *D. buzzatii*. Els marcadors procedents de les regions 83E1-84E1, 86A4-E2, i 97B1-E6 hibriden en 7, 8 i 7 llocs independents respectivament dels cromosomes de *D. repleta* i *D. buzzatii* (Figura 7). Per tant les regions 83E1-84E1 i 97B1-E6 contenen com a mínim 6 punts de trencament i la regió 86A4-E2 en conté 7. Es tracta d'un nombre mínim, degut a què algunes seqüències poden no estar suficientment conservades i per tant no detectem la seva seqüència homòloga, o bé degut a un recobriment insuficient de la regió. El recobriment de la regió és el quocient entre les seqüències incloses als marcadors o als segments conservats i la mida total de la regió. L'elevat recobriment que s'ha aconseguit en les quatre regions, i el fet que molts marcadors comparteixen seqüències, suggereix que el nombre de punts de trencament no detectats ha de ser petit.

**Taula 19.** Resum dels resultats obtinguts a les quatre regions cromosòmiques .

<b>Regió</b>	<b>Mida (Mb)</b>	<b>Número de marcadors</b>	<b>Recobriment</b>	<b>Punts de trencament mínims</b>	<b>Densitat (punts de trencament per Mb) ± SD</b>
83E1-84E1	1,814	21	74,89 %	6	3,31 ± 1,31
86A4-86E2	1,139	13	81,79 %	7	6,15 ± 2,27
95A-96A <sup>a</sup>	1,217	41	75,46 %	12	9,86 ± 2,78
97B1-97E6	0,732	25	74,79 %	6	8,20 ± 3,30
Total	4,902	100	76,62 %	31	6,32 ± 1,03

<sup>a</sup> Ranz *et al.* 1999.

#### 4.2.1 Distribució dels punts de trencament en el cromosoma

La comparació dels resultats obtinguts en les quatre regions permet analitzar si els punts de trencament es reparteixen homogèniament per de tot el cromosoma. Per comprovar si hi ha una desviació de la distribució a l'atzar dels punts de trencament s'ha comparat el nombre de punts de trencament esperats en cadascuna de les regions estudiades amb el nombre de punts de trencament observats (Taula 20). No s'han detectat diferències significatives entre les diferents regions ( $\chi^2 = 5,42$ ; g.l.l = 3; P = 0,144), i per tant sembla que els punts de trencament de les inversions es distribueixen a l'atzar per tot el cromosoma.

**Taula 20.** Distribució dels punts de trencament a l'element cromosòmic E.

Regió	Mida (Mb)	Punts de trencament esperats	Punts de trencament observats
83E1-84E1	1,814	11,47	6
86A4-E2	1,139	7,20	7
95A-96A	1,217	7,70	12
97B1-E6	0,732	4,63	6
Total	4,902	31	31

A la regió 83E1-84E1 el nombre de punts de trencament observats és bastant inferior als esperats (Taula 20). Això sembla ser degut principalment a què en aquesta regió s'han trobat dos segments conservats entre *D. melanogaster* i el grup *repleta* de 355 kb i 599 Kb. El segment de 355 kb inclou els gens del complex Antennapedia (Kaufman *et al.* 1990). La mida dels dos segments és més gran que la mitja calculada per tot el cromosoma (122 kb) (apartat 4.2.3).

#### 4.2.2 Taxes d'evolució cromosòmica

A l'apartat anterior s'ha comprovat que les regions analitzades no presenten diferències significatives en el nombre de punts de trencament que contenen. Per tant es pot considerar que aquestes regions són representatives del comportament de tot el

cromosoma. D'aquesta manera es pot obtenir una estima del grau de reorganització cromosòmica a partir del que s'ha observat en elles (Nurminsky 1986; Vieira *et al.* 1997b; Ranz *et al.* 1999; González *et al.* 2000). La suma de les quatre regions es pot considerar com una regió de 4,902 Mb, recoberta en un 76,62 % amb 100 marcadors i que conté 31 punts de trencament (Taula 19). Es pot considerar que aquesta regió, que constitueix aproximadament una sisena part de tot el cromosoma, està lliure d'un possible efecte de la seva posició, ja que les quatre regions estan localitzades a diferents parts del cromosoma. L'extrapolació del comportament d'aquesta regió a tot el cromosoma dóna una valor de  $176 \pm 29$  punts de trencament o  $88 \pm 14$  inversions. Tot i l'elevat recobriment que s'ha aconseguit a les quatre regions cal recordar que és possible que no s'hagi detectat algun punt de trencament, i per tant que aquest resultat és una estima mínima. El temps de divergència entre els dos subgèneres està entre 40-62 milions d'anys (Beverly i Wilson, 1984; Russo *et al.* 1995). Considerant un temps de divergència de 62 milions d'anys (Beverly i Wilson, 1984) s'obté una taxa de 0,71 inversions fixades per milió d'anys.

A la Taula 3 (Introducció) es mostren els resultats obtinguts en treballs similars a aquest. En un d'ells s'analitza l'organització molecular d'una regió de 1,9 Mb de *D. melanogaster* a les mateixes espècies del grup *repleta* (González *et al.* 2000). Aquesta regió inclou el locus *Adh* i es troba al braç cromosòmic 2L (element B de Muller). Amb un recobriment del 100 % es van detectar cinc punts de trencament. Extrapolant el comportament d'aquesta regió a la resta del cromosoma es va obtenir un valor de 0,29 inversions/milió d'anys.

També s'han fet estudis similars comparant *D. melanogaster* amb el grup *virilis* (subgènere *Drosophila*). En un d'ells (Nurminsky *et al.* 1996) es va comparar l'organització molecular d'una regió de 1,6 Mb que inclou el locus *Adh* a *D. virilis*. Aquesta comparació es realitzà utilitzant només tres gens (*Adh*, *Mhc* i *Arr-1*) d'aquesta regió, que hibriden en regions separades del cromosoma 4 de *D. virilis*. Si s'extrapolen els resultats d'aquesta regió a la resta del cromosoma s'obté una taxa de 0,17 inversions per milió d'anys. En el segon d'aquests treballs (Vieira *et al.* 1997b) es localitzen a *D. virilis* 10 gens procedents de la regió 2F1-4C5-6 de *D. virilis* (~2 Mb) al cromosoma X de *D. melanogaster* (element A de Muller). Els gens hibriden en 7 llocs diferents del cromosoma X de *D. virilis*, i per tant el nombre mínim de punts de trencament és de 6. L'extrapolació d'aquest valor dóna una taxa de 0,41 inversions per milió d'anys en el cromosoma X. Finalment, l'organització de la regió 95A-96A de *D. melanogaster*



també s'ha analitzat a *D. virilis* (Ranz *et al.* 1999), obtenint-se una taxa de 1,11 inversions per milió d'anys (el mateix resultat que pel grup *repleta* si només es considera aquesta regió).

Existeix una relació clara entre el nombre de punts de trencament detectats i de marcadors utilitzats (Nurminsky *et al.* 1996; Vieira *et al.* 1997; Ranz *et al.* 1999; González *et al.* 2000; aquest treball). El número de punts de trencament descrits augmenta amb el grau de recobriment. Considerant una mida mitja de 3,1 kb per als gens de *Drosophila* (Adams *et al.* 2000) el recobriment aconseguït en aquest treball és un ordre de magnitud superior a l'assolït a Nurminsky *et al.* (1996) i Vieira *et al.* (1997). En l'estudi de l'organització molecular a *D. repleta* i *D. buzzatii* de la regió *Adh* de *D. melanogaster* (González *et al.* 1999) el recobriment és del 100%. En aquest cas la regió havia estat seqüenciada prèviament (Ashburner *et al.* 1999), i per tant es van poder escollir clons que recobrien tota la regió. Tot i l'elevat recobriment aconseguït en les quatre regions analitzades en aquest treball (Taula 19) i a la regió *Adh* (González *et al.* 2000), és possible que no es detecti algun punt de trencament. Aquesta probabilitat augmenta quan disminueix el nombre de marcadors. Per tant, per obtenir bones estimes de la taxa d'evolució cromosòmica a partir del comportament de regions particulars és recomanable escollir marcadors que les cobreixin totalment a l'espècie de referència. Si el recobriment de la regió és adequat aquest tipus d'estudis permeten calcular la taxa d'evolució cromosòmica entre dues espècies amb un nombre relativament petit de marcadors.

Els marcadors cartografiats en aquest treball s'han afegit als cartografiats en el mateix cromosoma en altres estudis i s'ha calculat el nombre i la taxa de fixació d'inversions utilitzant un mètode de màxima versemblança (Ranz *et al.* 2001, veure annex 1). D'aquesta manera s'obté un resultat de  $228 \pm 28$  punts de trencament o  $114 \pm 14$  inversions fixades (0,92 inversions per milió d'anys). Aquesta taxa de fixació d'inversions no és significativament diferent de la calculada en aquest treball. Aquestes taxes són similars a l'estimada per Segarra *et al.* (1995), comparant la posició d'un nombre menor de marcadors del cromosoma X entre *D. melanogaster* i *D. pseudoobscura*.

La taxa d'evolució de l'element cromosòmic B obtinguda per González *et al.* (2000) és sensiblement inferior a l'estima que hem obtingut per a l'element cromosòmic E, i per tant indicaria una taxa menor de fixació d'inversions a l'element B. Tot i que l'estima de la taxa de fixació d'inversions en aquest cromosoma està basada en els

resultats obtinguts en només una regió, aquesta sembla que pot ser representativa de la resta del cromosoma. En un estudi molecular de la regió *Adh* a *D. melanogaster* (Ashburner *et al.* 1999) no es van trobar particularitats en la seva organització que indiquin que és una regió diferent de la resta del cromosoma. Aquest resultat és coherent amb les observacions citològiques prèvies, que detectaven un nombre més elevat d'inversions en el cromosoma 2 (veure Introducció). Recentment, gràcies a l'elaboració de mapes físics dels cromosomes X (element A) i 4 (element D) de *D. repleta* i *D. buzzatii* s'han obtingut estimes de la taxa d'evolució d'aquests elements (González *et al.* 2002), demostrant-se que els elements presenten diferents taxes d'evolució. Degut a la mida diferent de cada element cromosòmic és millor comparar la densitat de punts de trencament per Mb i per milió d'anys. Concretament, s'han obtingut densitats de 0,087 (element A), 0,021 (element B), 0,037 (element D), i 0,066 (element E) (Ranz *et al.* 2001; González *et al.* 2002). Per tot el genoma s'ha calculat un valor de 0,053 punts de trencament per Mb i per milió d'anys, o 3,17 inversions per milió d'anys.

Aquests resultats suggereixen que el genoma de *Drosophila* evoluciona més ràpidament que el d'altres organismes estudiats (Ranz *et al.* 2001). Però a molts dels estudis realitzats en altres organismes la densitat de marcadors utilitzats és més petita, i per tant la major taxa d'evolució descrita a *Drosophila* pot deure's a la major resolució dels mapes comparats. La seqüenciació dels genomes d'alguns organismes permet dur a terme comparacions més precises. Per exemple, amb la comparació de les seqüències de *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* s'ha comprovat que les inversions més freqüents afecten a segments de DNA que inclouen menys de 10 gens, i s'han descrit 1.100 inversions que afecten a un sol gen (Seoighe *et al.* 2000). Aquestes inversions no es poden detectar amb la cartografia física. Per tant les taxes obtingudes podrien dependre del nivell de resolució amb què es realitzen les comparacions. Amb l'anàlisi del genoma de *Caenorhabditis* s'ha calculat una taxa de fixació de canvis cromosòmics quatre cops més gran que l'estimada per *Drosophila* (Coghlan i Wolfe 2002). Els resultats obtinguts en la comparació de vuit regions genòmiques (500 kb en total) a cinc espècies diferents de *Drosophila* suggereixen que, tot i que no semblen ser tan habituals com als llevats o *Caenorhabditis*, aquests canvis també poden ser abundants a *Drosophila* (Bergman *et al.* 2002). En canvi, en la comparació de la seqüència del genoma humà i el del ratolí s'ha estimat un nombre mínim de 295 canvis cromosòmics. El temps de divergència entre les dues espècies és de 75 milions d'anys, i per tant la

taxa d'evolució és de 1,97 canvis cromosòmics per milió d'anys. Tot i que aquest valor només és lleugerament inferior a l'obtingut a *Drosophila* (3,17, a González *et al.* 2002), sí que ho és quan es calcula la densitat de punts de trencament. La part analitzada dels genoma humà i el del ratolí és de 2,9 Gb i 2,5 Gb respectivament (Lander *et al.* 2001; Waterston *et al.* 2002), i per tant la densitat de punts de trencament és de  $6,8-7,9 \times 10^{-4}$ , molt inferior als 0,053 de *Drosophila* (González *et al.* 2002).

#### **4.2.3 Segments cromosòmics conservats durant la divergència entre *D. melanogaster* i el grup *repleta***

Tot i l'elevat grau de reorganització cromosòmica que ha existit entre *D. melanogaster* i el grup *repleta* hi ha alguns marcadors que mantenen la seva associació física a les diferents espècies. Quan dos o més marcadors que estan junts a l'espècie de referència es troben també junts a una altra espècie, es considera que aquests marcadors formen un segment cromosòmic conservat durant la divergència entre aquestes espècies. En aquest treball i el de la regió 95A-96A (Ranz *et al.* 1999) s'han detectat 14 segments cromosòmics conservats entre *D. melanogaster* i el grup *repleta*. A la Taula 21 es mostren aquests segments i la seva mida. En els casos en què els segments es trobin a un extrem de la regió analitzada la mida calculada serà inferior a la real. Per altra banda, quan no es detectin algunes seqüències homòlogues la mida serà superior a la real. Tot i això, l'elevat recobriment que s'ha aconseguit a les diferents regions (Taula 19) fa que les desviacions respecte de la mida real dels segments no puguin ser molt importants.

L'existència de segments conservats entre diferents espècies s'ha interpretat en alguns casos com una indicació de restriccions funcionals que mantenen l'associació d'alguns gens (Randazzo *et al.* 1993; Maier *et al.* 1993; Wright 1996). Però és probable que alguns marcadors mantinguin la seva associació per atzar, degut a la fixació d'un nombre limitat de reordenacions des de la divergència de les espècies estudiades (Nadeau i Taylor 1984; Nadeau i Sankoff 1998). Considerant la taxa d'evolució del cromosoma 3R obtinguda per Ranz *et al.* (2001) (annex 1), el nombre de punts de trencament fixats a l'element 3R és de 228. Això significa que hi haurà 229 segments conservats entre *D. melanogaster* i les espècies del grup *repleta*, amb una mida mitja de 122 kb. Si els punts de trencament de les inversions es distribueixen a l'atzar sobre el cromosoma, la probabilitat de què un punt de trencament aparegui en un segment determinat depèn de la seva longitud (quant més gran sigui un segment més fàcilment

contindrà un punt de trencament). Considerant que els punts de trencament segueixen una distribució de Poisson, la probabilitat de què en un segment no hi hagi cap punt de trencament (i per tant estigui conservat) és:  $P(0) = e^{-2n l_i}$ , on  $n$  és el nombre d'inversions (per tant  $2n$  és el nombre de punts de trencament) i  $l_i$  la longitud relativa d'aquest segment (Nadeau i Taylor 1984; Ranz *et al.* 1997). D'aquesta manera es pot calcular quina és la probabilitat de què un segment d'una mida determinada estigui conservat per atzar. A la Taula 21 es mostra quina és aquesta probabilitat pels segments conservats trobats en aquest treball.

**Taula 21.** Probabilitat de conservació per atzar dels segments conservats descrits a les quatre regions estudiades.

Segment	Posició	Mida (kb)	Probabilitat
DS01673-DS08128	83E1-E4	141	0,316
DS05926-DS07437	83F1-84A1	166	0,258
<i>Pb</i> -DS07700	84A5-B3	355	0,055
DS04025-DS05426	84C8-D14	599	<b>0,007</b>
DS05661-DS01137	86C1-C6	306	0,082
DS04597-DS08785	86C7-D2	320	0,073
<i>Rox8-Acp95EF</i> <sup>a</sup>	95D8-F2	186	0,219
<i>jar</i> -120E2 <sup>a</sup>	95F5-6	39	0,727
<i>crb-Pp1α96A</i> <sup>a</sup>	95F11-96A5	225	0,159
52B12- <i>tld</i> <sup>a</sup>	96A11-23	170	0,249
DS00612-DS01035	97C1-C3	86	0,495
DS05785-DS02698	97D1-6	137	0,326
<i>Rb97D-ro</i>	97D5	23	0,829
147A8-171D2	97D12-E6	154	0,284

<sup>a</sup>Ranz *et al.* 1999.

Els valors de probabilitat significatius s'escriuen en negreta.

Només un dels segments conservats trobats en aquest treball (DS04025-DS05426) té una mida significativament més gran que l'esperada si estigués conservat per atzar. Aquest segment conté un *cluster* format per 10  $\alpha$ -esterasses funcionals i un pseudogen, i la seva organització s'ha conservat majoritàriament a *D. buzzatii* (Robin *et*

al. 2000). Tot i això la mida del *cluster* és només de 60 kb, i per tant sembla que el contingut d'aquests segment no explica la seva conservació. A més, considerant 114 inversions fixades s'esperarien  $228 \times 0,007 = 1,6$  segments conservats de la mateixa mida. Per tant els resultats obtinguts no semblen contradir el repartiment a l'atzar dels punts de trencament.

Aquests resultats mostren la gran flexibilitat que té el genoma de *Drosophila*. Fins i tot els gens que formen el complex Hox, que s'han mantingut associats en la resta del regne animal (Ruddle *et al.* 1994) han sofert diverses reorganitzacions a *Drosophila*. El complex ha sofert un trencament entre els gens *Antp* i *Ubx* a la línia de *D. melanogaster* (Lindsley i Zimm 1992), i un altre trencament entre *Ubx* i *abd-A* a la línia de *D. virilis* i *D. repleta* (von Allmen *et al.* 1996). Darrerament s'ha descrit un tercer trencament del complex, entre els gens *lab* i *pb* a la línia del grup *repleta* (Negre *et al.* 2003). Els gens *Hox* de *Drosophila* tenen elements reguladors independents dels altres gens del complex (Karch *et al.* 1994; Hagstrom *et al.* 1996). En canvi, als vertebrats aquests gens comparteixen seqüències reguladores, i sembla que és necessària la seva disposició lineal per a la seva regulació (Gérard *et al.* 1996; Gould *et al.* 1997).

Mentre que als organismes procariotes els gens que participen a la mateixa via metabòlica sovint es troben agrupats en operons per facilitar la regulació de la seva expressió, en els organismes eucariotes aquest tipus d'agrupació és molt poc habitual (Huynen *et al.* 2001). Aquesta interacció en *cis* de dos o més gens propers faria difícil que es trenqués la seva associació (Lundin 1993). No obstant, tot i que s'han descrit alguns casos de parelles de gens propers que estan corregulats a *Drosophila* (Andrews *et al.* 1996; Brogna i Ashburner 1997), aquest tipus d'organització no és habitual. Els resultats d'aquest i altres treballs (Ranz *et al.* 2001; González *et al.* 2002) també suggereixen que aquest tipus d'associació no és molt freqüent, o bé inclou gens inclosos a segments cromosòmics petits.

Darrerament s'ha comprovat que el genoma de *Drosophila melanogaster* conté grups de gens adjacents que no estan funcionalment relacionats i que s'expressen conjuntament. Aquests grups contenen entre 10 i 30 gens, i la mida mitja és de 100 kb (Spellman i Rubin 2002). Sembla que una tercera part dels gens de *D. melanogaster* podrien estar agrupats segons el seu patró d'expressió (Boutanaev *et al.* 2002). Aquests resultats són coherents amb la proposta de què el genoma de *Drosophila* està organitzat en dominis d'expressió (Gerasimova *et al.* 2000; Mongelard i Corces 2001). En aquest cas es va calcular una mida mitja dels diferents dominis d'aproximadament 250 kb. La

mida d'aquestes agrupacions o dominis (100-250 kb) és similar a la mida mitja prevista pels segments cromosòmics conservats entre *D. melanogaster* i el grup *repleta*. Si la coordinació de l'expressió dels gens adjacents fos important funcionalment, els grups de gens identificats dins d'aquests dominis mantindrien la seva agrupació a altres espècies (Spellman i Rubin 2002).

### 4.3 Origen de les inversions naturals a *Drosophila*

*Drosophila* presenta un gran nombre d'inversions cromosòmiques polimòrfiques i fixades entre espècies. És per tant un bon model per estudiar l'origen d'aquestes reordenacions. La implicació dels elements transposables en la generació de reordenacions cromosòmiques s'ha demostrat varies vegades a poblacions de laboratori (Lim i Simmons 1994). En canvi, hi ha pocs estudis sobre l'origen de les reordenacions cromosòmiques a poblacions naturals. Aquest tipus d'estudi presenta algunes dificultats tècniques i en la interpretació dels resultats.

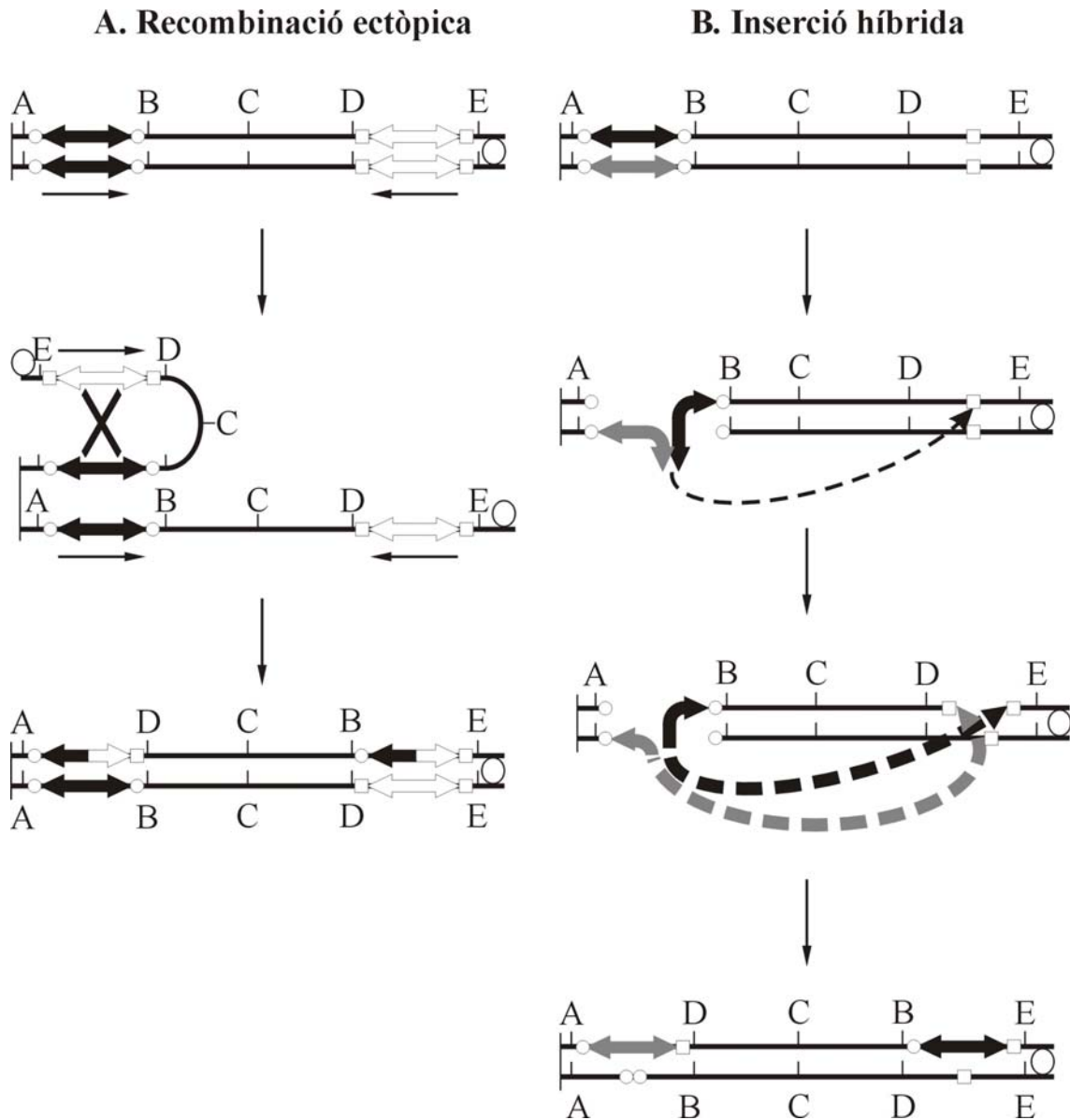
En alguns casos, l'associació entre la localització dels elements transposables i la dels punts de trencament de les inversions cromosòmiques s'ha interpretat com una evidència a favor de la implicació dels elements en la generació de les inversions (Lyttle i Haymer 1992; Regner *et al.* 1996; Zelenstova *et al.* 1999; Evgen'ev *et al.* 2000). Malgrat la seva significació estadística, aquestes associacions no són una demostració directa de la implicació dels elements transposables en l'origen de les inversions. La densitat d'elements transposables augmenta considerablement a les regions cromosòmiques amb recombinació reduïda (apartat 4.4.1). La seva acumulació als punts de trencament de les inversions s'ha predit teòricament (Charlesworth *et al.* 1994b; Sniegowski i Charlesworth 1994), i s'ha demostrat empíricament (Cáceres *et al.* 2001; aquest treball). Per tant, els elements transposables trobats als punts de trencament poden ser colonitzadors secundaris, i no haver participat en la generació de la inversió. En segon lloc, degut a la seva capacitat de mobilització, els elements transposables poden haver desaparegut dels punts de trencament després de generar la inversió, deixant només senyals parcials (Mathiopoulos *et al.* 1998; Andolfatto *et al.* 1999) o sense deixar senyals de la seva presència original (Wesley i Eanes 1994; Cirera *et al.* 1995; Bergman *et al.* 2002). Per tant un resultat negatiu no es pot interpretar com un

senyal inequívoc de què els elements transposables no estan implicats en la generació de la inversió.

Entre les dificultats tècniques en sobresurten dues. En primer lloc, és necessari disposar de marcadors cartografiats relativament a prop dels punts de trencament de la inversió que possibilitin la seva clonació. Tot i que la seqüenciació del genoma de *D. melanogaster* ha proporcionat un alt nombre de marcadors, l'alta taxa de fixació de reordenacions cromosòmiques que existeix al gènere *Drosophila* limita la seva aplicabilitat a espècies llunyanes filogenèticament. Per tant, aquesta informació només es pot aprofitar a aquelles espècies on existeixin mapes amb una alta densitat de marcadors. Finalment, les seqüències repetitives poden presentar algunes dificultats per la seva clonació i seqüenciació. Per exemple, els elements del tipus *Foldback* sovint no es poden amplificar per PCR o seqüenciar, degut a la presència de grans repeticions terminals invertides que s'aparellen formant estructures secundàries (apartat 4.3.4).

#### **4.3.1 Mecanismes de generació d'inversions cromosòmiques per elements transposables**

Els dos models més acceptats que expliquen com els elements transposables poden generar inversions cromosòmiques són el model de recombinació ectòpica (Petes i Hill 1988; Lim i Simmons 1994), i el model d'inserció híbrida (Gray *et al* 1996; Gray 2000) (Figura 13).



**Figura 13.** Models proposats per explicar la generació d'una inversió per elements transposables. Cada línia és una doble hèlix de DNA. Les fletxes de dues puntes són elements transposables. Les fletxes horitzontals sota dels elements indiquen la seva orientació. Els cercles i quadrats col·locats als seus extrems són les duplicacions que produeixen en inserir-se. Basat en Lim i Simmons (1994) i Gray (2000).

Segons el primer model les inversions es generen per recombinació ectòpica entre dues còpies del mateix element transposable, inserides en orientació inversa a diferents llocs del mateix cromosoma. Els mecanismes cel·lulars són probablement els mateixos de la recombinació meiótica (Virgin i Bailey 1998), i hi pot participar qualsevol tipus de seqüència repetitiva. El resultat és una inversió amb una còpia d'un element transposable a cada punt de trencament. Els elements transposables produeixen una duplicació de la seqüència on s'insereixen. La longitud d'aquesta duplicació és



característica de cada element. Després de la recombinació ectòpica els elements han intercanviat les duplicacions incloses en el segment invertit, que hauran canviat la seva orientació. A més, els elements resultants de la recombinació ectòpica seran elements híbrids, ja que contindran seqüències procedents dels dos elements originals (Figura 13A). L'altre mecanisme amb el qual s'ha proposat que els elements mòbils poden generar inversions, la inserció híbrida, és molt diferent. Després de la inserció d'un element mòbil i de la replicació del DNA hi haurà un element idèntic a les dues cromàtides germanes. Aquestes dues còpies poden participar en un procés de transposició aberrant, on un element híbrid format per un extrem de cada element es mobilitza a un nou lloc del cromosoma (Figura 13B). El resultat és una inversió del segment limitat pels dos llocs d'inserció i dues còpies de l'element transposable. Les còpies de l'element estaran flanquejades per duplicacions en la mateixa orientació que en el cas de la recombinació ectòpica. El resultat dels dos models és molt semblant, però en la recombinació ectòpica les dues còpies de l'element no són necessàriament idèntiques. Les diferents còpies d'un mateix element solen presentar petites diferències entre elles, i per tant la recombinació ectòpica produirà elements híbrids o quimèrics. En canvi, en el cas de la inserció híbrida, els dos elements seran idèntics després de la generació de la inversió. Posteriorment les dues còpies poden divergir degut a la fixació de mutacions.

#### **4.3.2 Origen de la inversió $2q^7$ de *D. buzzatii***

La clonació i seqüenciació de les regions dels punts de trencament a cromosomes sense la inversió (AB i CD) i amb la inversió (AC i BD) ha permès determinar amb precisió els límits de la inversió  $2q^7$ . Hi ha dues insercions de 1,8 kb i 2,4 kb situades exactament entre les regions A-C i B-D respectivament. Les altres dues insercions, de 387 pb i 3 kb de llargada, es troben a les regions A i D dels cromosomes amb la inversió respectivament. La inserció de 3 kb està separada només per 11 nucleòtids del punt de trencament. Totes aquestes insercions estan formades per vàries còpies de cinc transposons diferents (Taula 3 i Figura 3 a Casals *et al.* 2003, apartat 3.2 a Resultats). La seva posició fora dels punts de trencament, indica que les insercions de 387 pb i 3 kb no estan directament implicades en la generació de la inversió. Aquesta hipòtesi està recolzada per la disposició de les duplicacions que flanquegen *BuT6* (a la regió A) i *BuT3-6* (a la regió D). Aquestes duplicacions estan en la mateixa orientació

als dos costats dels elements. En canvi, si els elements haguessin participat en la generació de la inversió esperaríem que estiguessin en orientació inversa (apartat 4.3.1). Probablement aquestes insercions són invasions secundàries d'elements transposables que han ocorregut després de la generació de la inversió, ja que només es troben a les soques portadores de la inversió.

La localització de dues insercions d'elements transposables just als punts de trencament de la inversió suggereix que existeix una relació entre aquests elements i la generació de la inversió. Entre els diferents elements que formen aquestes insercions *Galileo* és el que presenta més evidències per haver generat la inversió. S'ha trobat una còpia gran de l'element a la regió A-C (*Galileo-10*) i dos petits fragments a la regió B-D que podrien formar part el mateix element (*Galileo-11*). L'element *Galileo* duplica set parells de bases en el lloc de la seva inserció (Cáceres *et al.* 1999b; Cáceres 2000; Cáceres *et al.* 2001). La seqüència de 7 pb que flanqueja a *Galileo-10* a la regió C (GAACAAG) és exactament la seqüència invertida i complementària de la que flanqueja a *Galileo-11* a la regió D (CTTGTTTC), tal i com esperaríem si aquest element hagués generat la inversió. La seqüència de 7 pb que flanqueja *Galileo-10* per la regió A (GTTATAC) és similar a la seqüència consens (G<sub>10</sub>T<sub>11</sub>a<sub>8g</sub>7T<sub>11</sub>A<sub>13c</sub>6) proposada per *Galileo* i dos elements més del tipus *Foldback* trobats a *D. buzzatii* (Kepler i Newton) (Cáceres 2000). Aquests 7 pb pertanyen a *BuT5-2*, el que suggereix que *Galileo-10* es va inserir originalment dins una còpia preexistent de *BuT5*. No obstant, a l'altre extrem de *Galileo-11* no s'han trobat els 7 pb complementaris ni la resta de l'element *BuT5-2*, tal i com esperaríem segons els models de recombinació ectòpica i d'inserció híbrida. Aquesta regió (BD) és la que presenta un major nombre d'insercions i canvis estructurals entre soques (Casals *et al.* 2003, a Resultats). L'explicació més probable és que alguna delecció hagi eliminat aquestes seqüències. Aquesta delecció també podria haver eliminat els 23 nucleòtids de la seqüència AB adjacents al punt de trencament que no es troben als cromosomes portadors de la inversió.

La principal diferència en la generació d'una inversió segons els models de recombinació ectòpica o d'inserció híbrida és que en el primer cas els elements resultants serien elements híbrids o quimèrics. Les dues repeticions terminals invertides (ITRs) d'un mateix element són molt semblants entre elles, però si l'element és una barreja de dues còpies diferents probablement presentaran algunes diferències. Per comprovar si *Galileo-10* és un element híbrid s'han comparat les seqüències dels ITRs de diferents còpies de l'element. La llargada dels ITRs de *Galileo-10* és de 336 i 331

pb. Per tant, s’han comparat només els darrers 336 pb dels ITRs de les quatre còpies de *Galileo* amb uns ITRs d’una mida igual o superior a aquesta: *Galileo-10*, *Galileo-12* (aquest treball), *Galileo-3* i *Galileo-4* (Cáceres *et al.* 2001) (Taula 22).

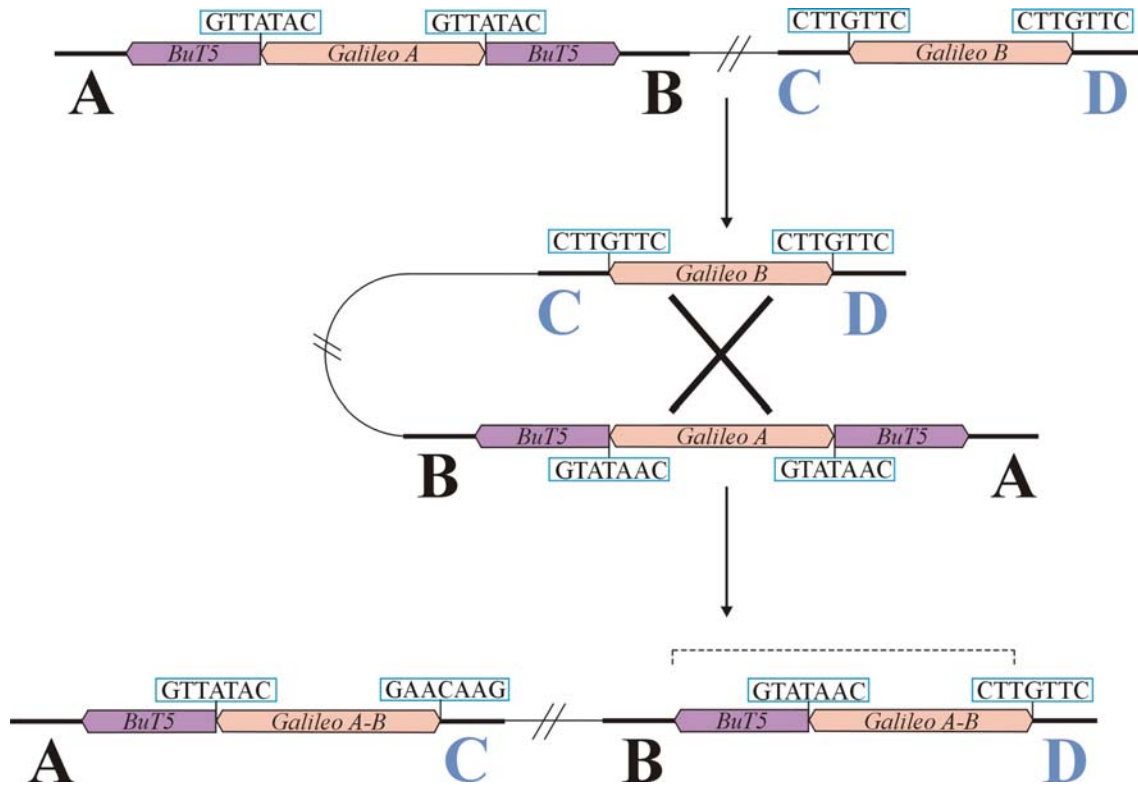
**Taula 22.** Divergència entre els darrers 336 nucleòtids de quatre còpies de *Galileo*.

	3a	3b	4a	4b	10a	10b	12a	12b
3a	0	<b>0</b>	0.0298	0.0298	0.0387	0.0273	0.0208	0.0149
3b		0	0.0298	0.0298	0.0387	0.0273	0.0208	0.0149
4a			0	<b>0</b>	0.0506	0.0303	0.0089	0.0149
4b				0	0.0506	0.0303	0.0089	0.0149
10a					0	<b>0.0364</b>	0.0417	0.0357
10b						0	0.0212	0.0212
12a							0	<b>0.0060</b>
12b								0

Els números indiquen la còpia de *Galileo*. a i b són els dos ITRs de cada element.

Els valors en negreta són els de les comparacions entre els ITRs d’un mateix element.

La divergència entre els ITRs d’un mateix element és sempre més baixa que en les comparacions entre ITRs de diferents elements. L’única excepció és la comparació dels ITRs de *Galileo-10* (Taula 22). En aquest cas la divergència entre els seus ITRs és sis vegades més gran que la major de les trobades en les comparacions dins d’un mateix element (*Galileo-12*). El valor obtingut és similar al de les altres comparacions entre ITRs de diferents elements. Això indica que probablement *Galileo-10* és un element híbrid, i que per tant la recombinació ectòpica és el mecanisme més probable per la generació de la inversió  $2q^7$ . A la Figura 14 es mostra el possible procediment d’origen de la inversió.



**Figura 14.** Origen de la inversió  $2q^7$  de *D. buzzatii*. La regió inclosa dins de la línia puntejada no s’ha trobat a cap de les sis soques analitzades. Probablement, després de l’aparició de la inversió la regió BD ha experimentat diferents canvis estructurals que han esborrat parcialment la informació necessària per interpretar la formació de la inversió (veure el text). L’element *Galileo A-B* d’AC es correspondria amb *Galileo-10*, i l’element de BD amb *Galileo-11*.

Tot i que no es pot descartar que la inversió es generés seguint el model de la inserció híbrida, i que les diferències posteriors entre els extrems de l’element haguessin sorgit per mutació, la taxa de mutació necessària per arribar a aquest nivell de divergència hauria de ser molt elevada. Aquest tipus de comparacions entre els extrems dels elements transposables s’ha utilitzat en altres estudis. Per exemple, la divergència entre les repeticions llargues terminals (LTRs) de retrovirus endògens (HERVs) i els canvis en les seqüències que els flanquegen s’ha considerat com un indicador de l’existència de reordenacions cromosòmiques ocorregudes per recombinació ectòpica en humans (Hughes i Coffin 2001).

### 4.3.3 Inestabilitat genètica als punts de trencament de les inversions

Les estimes de l'edat dels al·lels (20.000-25.000 anys) i de la inversió  $2q^7$  (0,49-0,67 milions d'anys) són coherents amb les calculades per a la inversió  $2j$  (83.000 anys i ~1 milió d'anys) (Cáceres *et al.* 2001), ja que la inversió  $2q^7$  es va originar sobre un cromosoma portador de la inversió  $2j$ . Aquesta edat jove dels al·lels i la falta de polimorfisme nucleotídic també són coherents amb les baixes freqüències amb què es troba aquesta inversió a les poblacions naturals (Hasson *et al.* 1995). En canvi, l'anàlisi de l'estructura dels punts de trencament a diferents soques portadores de la inversió ha mostrat una alta freqüència d'insercions i canvis estructurals. Tots aquests canvis han d'haver aparegut en un període de temps molt curt.

Als punts de trencament de la inversió  $2q^7$  s'ha observat una freqüència d'insercions i una variabilitat estructural similars a les de la inversió  $2j$ . Per tant, els quatre punts de trencament seqüenciats a cromosomes portadors d'inversions a *D. buzzatii* semblen ser punts calents per a insercions d'elements mòbils i canvis estructurals. S'ha proposat que els elements transposables s'acumulen a regions de baixa recombinació (Charlesworth *et al.* 1994b; Sniegowski i Charlesworth 1994). L'anàlisi de la seqüència de *D. melanogaster* (Adams *et al.* 2000) ha coincidit amb aquesta predicció (Rizzon *et al.* 2002; Bartolomé *et al.* 2002; Kaminker *et al.* 2002). Per tant s'espera que els elements transposables s'acumulin prop dels punts de trencament de les inversions, ja que són regions on es redueix la recombinació en els heterocariotips (Eanes *et al.* 1992; Sniegowski i Charlesworth 1994) (veure apartat 4.4.1).

Però hi ha alguns motius que fan pensar que hi ha altres factors que afavoreixen l'acumulació d'elements transposables als punts de trencament. En el cas de la inversió  $2q^7$ , la seva baixa freqüència a les poblacions naturals fa que la majoria de cromosomes amb la inversió es trobin en heterozigosi, i per tant els elements inserits als punts de trencament evitaran la recombinació. En canvi, el cas de la inversió  $2j$  és diferent. Aquesta inversió es troba a la major part de l'àrea de distribució de l'espècie, amb unes freqüències similars a les de l'ordenació estàndard. Per tant la reducció de la recombinació ha d'afectar de la mateixa manera als cromosomes amb i sense la inversió, però només s'han trobat elements transposables als punts de trencament dels cromosomes portadors de la inversió. A més, excepte les insercions de *BuT6* a la regió A, i la de *BuT3-6* i *Galileo-12* a la regió D (tot i que només a 11 nucleòtids del punt de trencament) de la inversió  $2q^7$ , totes les insercions trobades a les regions dels punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  s'han produït exactament al punt de trencament.

Finalment, si la única causa de l'acumulació d'elements transposables als punts de trencament de les inversions fos la reducció de la recombinació, esperaríem trobar elements de les dues classes. A *D. melanogaster* s'ha demostrat que hi ha més quantitat de retrotransposons que de transposons (Adams *et al.* 2000; Bartolomé *et al.* 2002; Rizzon *et al.* 2002), i a *D. buzzatii*, tot i que no existeix aquest tipus d'informació, s'hi han descrit elements transposables dels dos tipus (apartat 1.5.3, a Introducció). En canvi, als punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  només s'hi han trobat transposons.

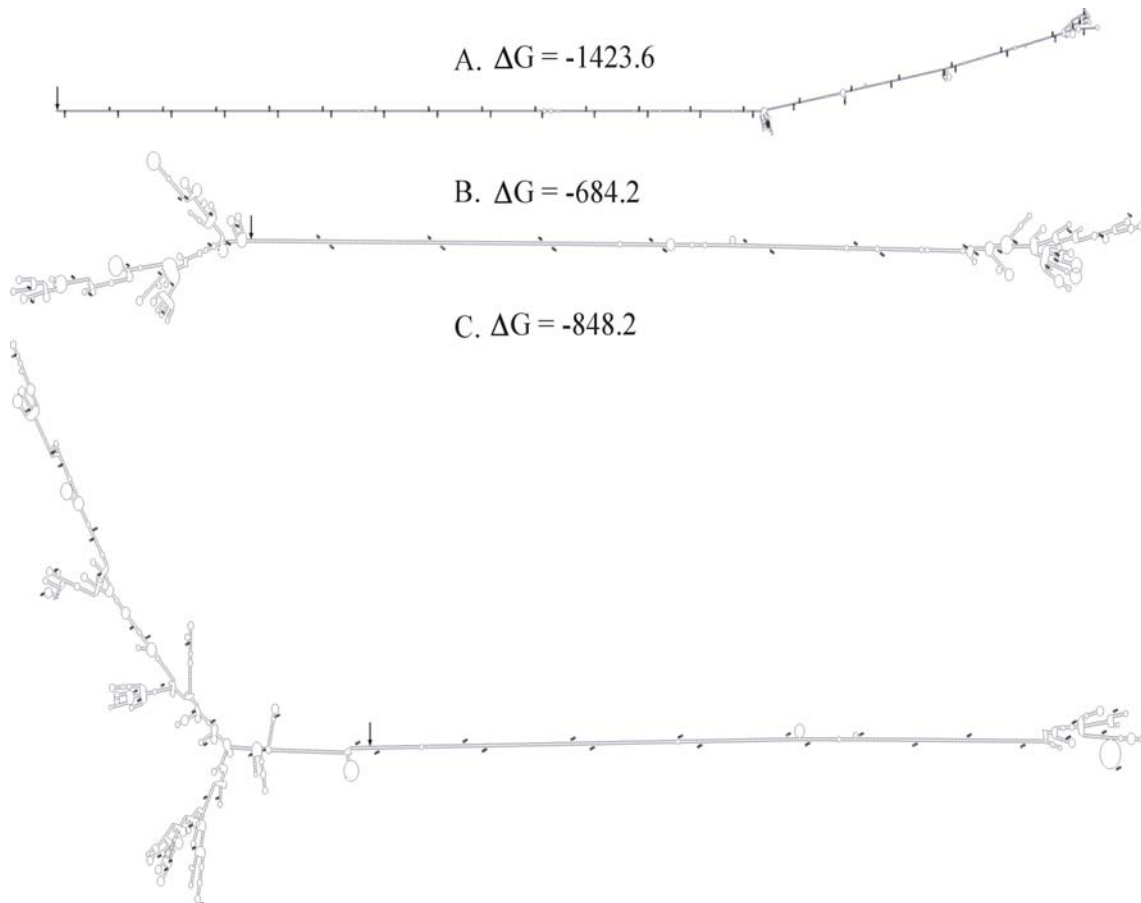
#### 4.3.4 Inestabilitat genètica i elements *Foldback*

S'ha demostrat que els elements *Foldback* de *D. melanogaster* generen inestabilitat genètica i participen en diferents processos de recombinació (Levis *et al.* 1982; Bingham i Zachar 1989; Smith i Corces 1991). Aquests elements generen deleccions, inversions i translocacions recíproques amb una alta freqüència aparentment mitjançant recombinació ectòpica (Collins i Rubin 1984), tenen una alta freqüència de transposició (Collins i Rubin 1983), i sovint porten inserits altres elements transposables (Brierly i Potter 1985; Harden i Ashburner 1990). La capacitat dels elements *Foldback* de generar reordenacions mitjançant processos de recombinació ectòpica es veu incrementada probablement per la presència dels seus ITRs llargs.

Les seqüències palindròmiques, com els ITRs, són una font d'inestabilitat genètica, i s'ha demostrat que causen diferents tipus de reordenacions en una àmplia varietat d'organismes (Gordenin *et al.* 1993; Nag i Kurst 1997; Zhou *et al.* 2001). La capacitat de causar reordenacions cromosòmiques probablement està relacionada amb la seva habilitat per formar estructures secundàries, que originen trencaments de doble cadena (Lobachev *et al.* 1998). Els ITRs llargs són un substrat potencial per nucleases i enzims de reparació d'aparellaments incorrectes, que poden originar els trencaments de doble cadena al DNA. Aquests trencaments, que també poden produir-se per una transposasa, poden originar un procés de recombinació. Sembla que els ITRs curts es protegeixen per proteïnes d'unió, que eviten l'acció dels enzims de reparació. D'aquesta manera, moltes seqüències funcionalment importants que estan formades per ITRs curts, no provocarien aquests trencaments. En canvi, els ITRs més grans de 50 pb no es poden protegir completament. És per això que els ITRs s'han considerat motius de risc que causen reordenacions cromosòmiques (Gordenin i Resnick 1998). El nombre de

reordenacions que causen augmenta amb la llargada dels ITRs i disminueix amb la distància entre ells (Lobachev *et al.* 1998). Les mides dels ITRs i les distàncies entre ells de les còpies més completes de *Galileo* descrites, estan entre les que produeixen un major nombre de reordenacions. (Lobachev *et al.* 1998).

La capacitat dels elements *Foldback* de generar estructures secundàries quan el DNA es desnaturalitza es va demostrar aviat, i és degut a aquesta propietat que se'ls va anomenar així (Truett *et al.* 1981). Dos dels elements trobats als punts de trencament de la inversió  $2q^7$ , *Galileo* i *Newton*, són elements del tipus *Foldback*. S'ha testat la capacitat de les seqüències trobades als punts de trencament i de *Galileo-12* (com exemple dels elements *Galileo*) de formar estructures secundàries utilitzant el programa m-Fold (<http://BibiServ.TechFak.Uni-Bierfeld.DE/fold>). Les seqüències dels dos ITRs de *Galileo-12* s'aparellen donant lloc una estructura de tija i llaç molt estable ( $\Delta G = -1423,6$  kcal/mol)(Figura 15). En el cas de les seqüències de les insercions de AC i BD es van obtenir resultats similars, degut a la presència de *Galileo-10* (AC) i *Kepler-5* (BD)(Figura 15). Aquesta propietat dels elements *Foldback* també fa que apareguin dificultats quan es volen amplificar per PCR o seqüenciar (Cáceres *et al.* 2001; aquest treball). Per exemple, *Galileo-12* dificulta l'amplificació dels fragments T8-D1 i T3-D1 a les soques  $jq^7-4$  i  $jq^7-5$  (Figura 3 a Casals *et al.* 2003, Resultats). Quan el DNA es digereix amb l'enzim *DraI* per separar els ITRs de *Galileo-12* s'obté el producte esperat (Taula 4 a Casals *et al.* 2003, a Resultats). Per altra banda, l'amplificació del fragment A1-C1 va funcionar correctament tot i incloure *Galileo-10*, probablement degut a la menor mida dels seus ITRs. Aquestes particularitats poden fer que els elements *Foldback* siguin més susceptibles de participar en diferents processos de recombinació (com el que va originar la inversió), o indueixin part de la inestabilitat genètica descrita als punts de trencament de les inversions. Per exemple, l'element *P* de *D. melanogaster* mostra una certa tendència a inserir-se a seqüències palindròmiques de ~14 pb (Liao *et al.* 2000), i la recurrència de la translocació t(11;22) descrita als humans també sembla associada amb la capacitat de formar estructures secundàries de les seqüències palindròmiques descrites prop dels punts de trencament (Kurahashi *et al.* 2000).



**Figura 15.**

Estructures secundàries predites a temperatura fisiològica (25°C) per: A. L'element *Galileo-12* (2.307 bp); B. La inserció d'elements transposables del punt de trencament AC (1.808 bp); i C. La inserció d'elements transposables del punt de trencament BD (2.432 bp). Les fletxes indiquen el primer i el darrer nucleòtid de *Galileo* (A i B) o *Kepler* (C).  $\Delta G$  indica el valor d'energia lliure d'aquestes estructures.



#### 4.4 Abundància i distribució dels elements transposables

L'anàlisi de l'abundància i distribució cromosòmica dels elements transposables pot aportar informació sobre quins factors determinen la seva acumulació a determinades regions i la seva relació amb les inversions cromosòmiques. El número de bandes obtingudes en el *Southern* permet obtenir una primera aproximació a la presència relativa d'aquests elements al genoma de *D. buzzatii* (Taula 14). Per cada *Southern* el DNA genòmic s'ha digerit amb dos enzims de restricció que no estan presents a cap de les còpies de l'element. D'aquesta manera el número de bandes es pot interpretar com el número de còpies de l'element en el genoma. Tot i això, si l'element conté alguna diàna que no està present a les còpies descrites el número de bandes serà una sobreestima del número de còpies. El número de bandes també serà més gran en el cas dels elements que continguin altres elements inserits amb alguna de les dianes. Per altra banda quan la mida de dues bandes és similar només se'n detecta una, i per tant se subestima el número de còpies. A més, la tècnica del *Southern* no permet detectar els elements incomplets més petits. El número mig de còpies dels diferents elements presents a cada soca (6,93–18,4, excloent *Galileo*) és similar al descrit per les diferents famílies d'elements transposables de classe II de *D. melanogaster*. En aquest cas el número de còpies dels diferents transposons varia entre 2 i 105, amb un número mig de 20,66 (Kaminker *et al.* 2002). En el cas dels elements *Foldback*, a *D. melanogaster* s'han descrit 32 còpies (Kaminker *et al.* 2002), un valor similar a les 26,73 de *Galileo* a *D. buzzatii*. La fracció del genoma que representen els diferents elements és difícil de calcular, degut a l'alt nombre de còpies defectives que existeixen. A *D. melanogaster* només el 15,59 % de còpies dels elements de classe II i el 40,62 % dels de tipus *Foldback* són còpies senceres. Considerant que la mida del genoma de *D. buzzatii* és similar a la de *D. arizonensis* (220 Mb) (Schulze i Lee 1986) i la mida mitja dels diferents elements transposables (Taula 12, a Resultats), aquests elements representarien (si totes les còpies fossin completes) entre el 0,003 % (*BuT4*) i el 0,02 % (*Galileo*) del genoma de *D. buzzatii*. Considerats conjuntament, aquests elements transposables representarien un 0,05 % del genoma.

El número de senyals obtinguts en la hibridació *in situ* (Taula 15) és sensiblement diferent a l'obtingut en el *Southern*. En el cas de *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT4* i *BuT6* el nombre de senyals produïts en la hibridació *in situ* és menor al nombre de

bandes obtingudes en el *Southern*. La hibridació *in situ* només detecta senyals eucromàtics o de la zona de transició eucromatina-heterocromatina, mentre que el *Southern* detecta còpies de tot el genoma. A més el *Southern* és més sensible, ja que en la hibridació *in situ* es necessita més homologia per produir un senyal. La sonda utilitzada per *BuT6* és la més petita (387 pb), i probablement això és la causa de què *BuT6* (el segon element amb més bandes al *Southern*) estigui entre els elements que produeixen un menor nombre de senyals. També s'ha de considerar que només s'ha descrit una còpia de *BuT6*, i per tant pot ser poc representativa. Això augmenta el risc de què altres còpies de l'element continguin alguna de les dianes de restricció utilitzades en la digestió del DNA genòmic. En el cas de *BuT5* i *Galileo* el número de senyals obtinguts en la hibridació *in situ* és més gran que el número de senyals del *Southern*. A més, *Galileo* tenyeix trams sencers del cromosoma propers al centròmer (Figures 11 i 12). En aquests trams s'han comptabilitzat tants senyals com bandes hi ha incloses, però el nombre real de còpies de l'element molt probablement és més gran. El menor número de bandes obtingudes en el *Southern* en aquests dos elements es deu probablement a què el gel està saturat de bandes (Figura 10), i moltes bandes estan produïdes per més d'una còpia de l'element (Maside *et al.* 2001). En el cas de la hibridació *in situ* s'han trobat diferències significatives en el número de senyals de *BuT1*, *BuT2*, *BuT3*, *BuT5* i *BuT6* i el total d'elements entre les soques estudiades. Aquestes diferències es poden deure a factors geogràfics i històrics de les diferents soques. Per exemple, el major nombre d'insercions i la seva redistribució a les poblacions d'Espanya respecte les d'Argentina que mostren els elements *Oswaldo* i *blanco* de *D. buzzatii*, s'ha atribuït al procés de colonització (Labrador *et al.* 1998; García Guerreiro i Fontdevila 2001).

La hibridació *in situ* permet estudiar la distribució cromosòmica dels elements. Els elements no es distribueixen a l'atzar per tot els cromosomes, i el cromosoma 6 mostra un número d'elements molt més alt que l'esperat (Taula 17, a Resultats). En aquest cromosoma no hi ha recombinació (Ashburner 1989), i això fa que s'hi acumulin molts més elements dels que s'esperen (apartat 4.4.1). En alguns casos s'ha predit un menor nombre d'insercions al cromosoma X que als autosomes, degut a què aquestes insercions es troben en hemizigosi en els mascles i per tant tindrien un major efecte deleteri (Montgomery *et al.* 1987). Tot i que alguns estudis havien confirmat aquesta predicció (Bartolomé *et al.* 2002), en el darrer anàlisi de la distribució dels elements transposables de *D. melanogaster* (Kaminker *et al.* 2002) no s'ha descrit una reducció

significativa de la densitat d'elements al cromosoma X. En aquest treball tampoc s'ha detectat aquesta diferència.

La majoria d'inversions polimòrfiques i fixades del complex *buzzatii* es troben al cromosoma 2. Una major presència d'elements transposables en aquest cromosoma podria explicar perquè presenta una major taxa d'evolució (González *et al.* 2002). Però aquest cromosoma no mostra un excés d'elements transposables, ja que el nombre d'insercions que conté (171) és similar a l'esperat (181,01) eliminant les insercions del cromosoma 6. Les diferències que se segueixen observant entre els diferents cromosomes (eliminant el cromosoma 6) es deuen a un excés en el cromosoma 3 (196 observats vs. 151,87 esperats) i a un dèficit en el cromosoma 5 (110 vs. 145,73). Aquestes diferències semblen degudes principalment a un major nombre d'elements a les regions proximals d'alguns cromosomes respecte als altres (Taula 18, a Resultats) (apartat 4.4.1).

#### **4.4.1 Taxes de recombinació i elements transposables**

La densitat d'elements transposables canvia a les diferents regions dels cromosomes (Adams *et al.* 2000; Bartolomé *et al.* 2002; Rizzon *et al.* 2002; Kaminker *et al.* 2002). S'ha demostrat que la densitat d'elements transposables és més alta a l'heterocromatina que a altres regions del genoma (Carmena i González 1995; Charlesworth *et al.* 1994a; Pimpinelli *et al.* 1995; Dimitri 1997; Junakovic *et al.* 1998). Quan s'ha analitzat la distribució dels elements a la seqüència de *D. melanogaster* s'ha comprovat que la densitat d'elements transposables augmenta a l'eucromatina proximal. Aquesta regió representa el 10% de la seqüència d'eucromatina analitzada, i s'hi ha localitzat el 37,6 % dels elements (Kaminker *et al.* 2002). Hi ha dos models teòrics que prediuen l'acumulació dels elements transposables en aquestes regions: el d'intercanvi ectòpic i el de mutació insercional. Segons el model d'intercanvi ectòpic els elements s'acumulen en aquestes regions degut a què són zones amb un nivell de recombinació baix o nul. D'aquesta manera els elements eviten la recombinació ectòpica, que pot produir reordenacions cromosòmiques deletèries i per tant l'eliminació de l'element (Langley *et al.* 1988; Montgomery *et al.* 1991; Goldman i Lichten 1996). El model de mutació insercional prediu l'acumulació a zones de baixa recombinació i baixa densitat gènica. En aquestes regions la probabilitat d'inserir-se dins de gens o seqüències reguladores és més baixa que a la resta del cromosoma. La selecció és menys eficaç a

les regions de baixa recombinació, i per tant en aquestes regions també es redueix la possibilitat de que les insercions d'elements transposables lleugerament deletèries siguin eliminades per selecció natural (Hill i Robertson 1966; Gordo i Charlesworth 2001).

Per comprovar si aquesta tendència també existeix a *D. buzzatii* s'han dividit els cromosomes en diferents regions i s'ha comparat el número d'elements transposables observat amb l'esperat segons una distribució a l'atzar (Taula 18). A *D. melanogaster* s'ha analitzat com varia el nivell de recombinació segons la localització física al llarg dels cromosomes (Charlesworth 1996). La recombinació es redueix a mesura que ens apropem als extrems dels cromosomes. A tots els cromosomes la recombinació desapareix a l'extrem proximal, en una regió que varia segons el cromosoma entre un 0,3-1,1 % de la longitud total. En aquest extrem hi ha també una zona de recombinació reduïda que ocupa el 5-14 % del cromosoma. A l'extrem distal, tots els cromosomes tenen una regió de recombinació reduïda (5,2-10,6 %) i en el cromosoma X la recombinació desapareix completament a la part més distal (1,7 % del cromosoma) (Charlesworth 1996). Finalment, al cromosoma 4 (l'equivalent al 6 de *D. buzzatii*) no hi ha recombinació (Ashburner 1989). Les espècies de *Drosophila* mostren diferències en la longitud total dels mapes genètics i en la variació de la taxa de recombinació a les diferents regions dels cromosomes (True *et al.* 1996; Cáceres *et al.* 1999a), i per tant el comportament dels cromosomes de *D. melanogaster* no és completament extrapolable. Per això, les regions distals i proximals en què s'han dividit els cromosomes de *D. buzzatii* (Taula 18) contenen un 10 % de la longitud total.

A partir del nombre d'insercions trobades a cada cromosoma s'ha calculat el número d'elements esperats en cadascuna de les regions, suposant un repartiment a l'atzar dels elements. La comparació d'aquest número amb l'observat mostra que els elements no es reparteixen uniformement per tot el cromosoma (Taula 18). Aquest resultat es deu a un excés d'elements a les zones proximals dels cromosomes, mentre que a les zones central i distal el número d'elements és inferior a l'esperat. Aquest resultat coincideix amb el de l'anàlisi de la seqüència de *D. melanogaster* (Bartolomé *et al.* 2002; Kaminker *et al.* 2002) o altres estudis anteriors (Charlesworth *et al.* 1992), on es descriu una acumulació a les regions proximals dels cromosomes però no a les distals. A Bartolomé *et al.* (2002) s'ha proposat que això pot ser degut a que la taxa de recombinació ectòpica no es redueixi en aquestes regions, tal i com s'ha demostrat a les regions subtelmèriques del llevat (Haber *et al.* 1991). A més la presència d'elements

transposables dins de les regions amb baixa recombinació està correlacionada amb la distància que hi ha des de la inserció a la regió d'alta recombinació, de manera que el número d'insercions augmenta a mesura que ho fa aquesta distància (Maside *et al.* 2001). Excepte en el cromosoma X les regions telomèriques de baixa recombinació generalment són menors que les centromèriques (Charlesworth 1996), i per tant la distància fins a les zones d'alta recombinació disminueix.

La taxa de recombinació també està relacionada amb la presència de gens. A les zones amb més recombinació hi ha un major nombre de gens. Això podria dificultar la inserció dels elements transposables, ja que augmentaria la probabilitat de què tingués efectes deleteris. Per tant la baixa densitat gènica podria ser el factor que determinés l'acumulació dels elements transposables a regions de baixa recombinació. Però les dades obtingudes en el cromosoma 4 de *D. melanogaster* s'oposen a aquesta hipòtesi. Aquest cromosoma (homòleg al 6 de *D. buzzatii*) conté més elements que els esperats, mentre que la seva densitat gènica és similar a la trobada a les regions d'alta recombinació dels altres autosomes (Charlesworth *et al.* 2002).

La relació entre els elements transposables i la taxa de recombinació descrita a *Drosophila* sembla que no existeix a *C. elegans*. L'anàlisi de la seqüència de *C. elegans* va mostrar que els elements de classe II es localitzen preferentment a zones d'alta recombinació, mentre que la distribució dels elements de classe I no depèn de la taxa de recombinació (Duret *et al.* 2000). Probablement la diferència en la relació entre els elements transposables i la recombinació entre aquests organismes es deu a què *C. elegans* és una espècie hermafrodita. Això augmenta l'homozigosi de les poblacions, reduint-se l'eficàcia de la recombinació per eliminar les mutacions lleugerament deletèries produïdes per les insercions d'elements transposables. També desapareixen parcialment els efectes de la recombinació ectòpica, ja que aquesta succeeix preferentment entre elements que es troben en heterozigosi (Bartolomé *et al.* 2002). Finalment, l'associació entre la distribució dels elements i la taxa de recombinació pot ser secundària, ja que a *C. elegans* la densitat gènica és menor en aquestes regions (Duret *et al.* 2000).

#### 4.4.2 Inversions cromosòmiques i elements transposables

Les inversions cromosòmiques produeixen una reducció de la taxa de recombinació dins de la zona invertida i en els punts de trencament dels heterocariotips. Degut a això, s'ha predit que els elements transposables també s'acumularan en aquestes regions (Montgomery *et al.* 1987; Langley *et al.* 1988; Eanes *et al.* 1992; Lyttle i Haymer 1992; Sniegowsky i Charlesworth 1994). Per comprovar si aquestes prediccions es complien amb les inversions presents a les soques utilitzades en aquest treball, s'ha comparat el número d'elements trobats dins de la zona invertida amb el número esperat segons un repartiment aleatori dels elements en el cromosoma. Només s'han considerat els elements localitzats en les regions central i distal dels cromosomes (Taula 18), és a dir, els localitzats fora de les regions proximals on s'ha demostrat que tendeixen a acumular-se.

La reducció de la recombinació provocada per les inversions cromosòmiques afecta especialment a les zones properes al punt de trencament. Els efectes de la inversió en els nivells de diversitat, degut a la reducció de la recombinació en els punts de trencament, s'extenen fins a 1.000 kb des del punt de trencament (Andolfatto *et al.* 2001). Considerant que el genoma de *D. buzzatii* té una mida similar a les 220 Mb de *D. arizonensis* (Schulze i Lee 1986), suposant una relació similar entre la quantitat d'heterocromatina i eucromatina a la trobada a *D. melanogaster* (0,34, segons Hoskins *et al.* 2002), i dividint els cromosomes de *D. buzzatii* en 1.232 bandes (aquest treball), s'obté un valor aproximat de 0,12 Mb per banda cromosòmica. Per tant, suposant que cada banda conté aproximadament 100 kb de DNA la reducció de la recombinació s'extendria fins a 10 bandes més enllà del punt de trencament de la inversió. Aquestes bandes s'han inclòs en la mida relativa de la inversió respecte de la resta del cromosoma (excloent les regions centromèriques), excepte en el cas del punt de trencament proximal de la inversió  $2q^7$ , ja que aquestes bandes estan incloses en la regió de recombinació reduïda (Taula 18). Per estudiar l'efecte de les inversions s'ha utilitzat el nombre d'insercions localitzades als cromosomes portadors de cada inversió (Taula 1, a Material i Mètodes; Taula 23). Per al càlcul de l'efecte global de totes les inversions no s'ha considerat la inversió  $5I$ , ja que no és una inversió natural.

**Taula 23.** Distribució dels elements transposables respecte les inversions cromosòmiques.

		Inversió Resta		$\chi^2$ (P)			Inversió Resta		$\chi^2$ (P)
$2j$	Obs.	14	12		$2y^3$	Obs.	16	6	
	Esp.	9,62	16,38	3,17 (0,075)		Esp.	9,68	12,32	7,37 ( <b>0,007</b> )
$2q^7$	Obs.	15	2		$4s$	Obs.	3	2	
	Esp.	4,42	12,58	34,22 (< <b>0,001</b> )		Esp.	2,15	2,85	0,59 (0,443)
$2z^3$	Obs.	11	8		$5I$	Obs.	3	2	
	Esp.	8,17	10,83	1,72 (0,190)		Esp.	2,1	2,9	0,67 (0,415)
Total	Obs.	59	30						
	Esp.	33,82	55,18	30,24 (< <b>0,001</b> )					

Soques utilitzades:  $2j$  (j-2, j-23, j-24);  $2q^7$  (jq<sup>7</sup>-4);  $2z^3$  (jz<sup>3</sup>-6, jz<sup>3</sup>-7);  $2y^3$  (y<sup>3</sup>-1, s-1);  $4s$  (s-1);  $5I$  (j-23). Els valors de probabilitat significatius s'escriuen en negreta.

Tot i que globalment l'acumulació d'elements transposables dins de les regions incloses a les inversions és significativa, aquest efecte es deu principalment a les inversions  $2q^7$  i  $2y^3$  (les úniques que individualment mostren resultats significatius). L'efecte de les inversions sobre la distribució cromosòmica dels elements transposables s'espera que sigui més alt a les inversions menys freqüents a les poblacions naturals (Eanes *et al.* 1992). Això es deu a que la majoria dels cromosomes portadors de la inversió es trobaran en heterozigosi. Precisament, les inversions  $2q^7$  i  $2y^3$  són les que presenten freqüències més baixes a les poblacions naturals entre les estudiades en aquest treball (Ruiz *et al.* 1984; Hasson *et al.* 1995).

Un altre objectiu de l'estudi de la distribució dels elements transposables a diferents soques és comprovar amb quina freqüència es localitzen els elements a les mateixes bandes on s'han cartografiat els punts de trencament d'inversions cromosòmiques. A les dues inversions de *D. buzzatii* on s'ha demostrat el paper dels elements transposables i la seva acumulació als punts de trencament, només s'han trobat elements als punts de trencament de les soques portadores de la inversió (Cáceres *et al.* 1999b, 2001; Casals *et al.* 2003 a Resultats). Per això en aquest treball s'analitzen soques portadores de diferents inversions. A més dels punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$ , també s'han trobat elements transposables als punts de trencament distals de les inversions  $2jz^3$  (*BuT5*) i  $4s$  (*Galileo*).

També s'han considerat els punts de trencament d'altres inversions polimòrfiques descrites a *D. buzzatii* (Taula 5, a Introducció), tot i no disposar de soques portadores. En total són 16 inversions amb 27 punts de trencament diferents (alguns punts de trencament s'han cartografiat a la mateixa banda). A més del cas de les inversions  $2j$ ,  $2q^7$ ,  $2z^3$  i  $4s$ , hi ha altres punts de trencament on també s'hi ha posicionat algun element transposable. Concretament, l'element *BuT5* s'ha trobat a les bandes 2D2a (inversió  $2r^9$ ), 2E2e (inversió  $2h^9$ ), 2E4c (inversió  $2z^3$ ), i 2F3c (inversió  $2y^9$ ), i l'element *Galileo* s'ha trobat a la banda 4F1c (inversió  $4s$ ). Aquests dos elements s'han localitzat també a la banda 2G2f, on s'han cartografiat els punts de trencament de les inversions  $2q^7$ ,  $2f^9$  i  $2y^9$ . Els elements s'han trobat només a la soca  $jq^7-4$ , i per tant s'ha interpretat com una associació només amb la inversió  $2q^7$ . L'associació entre els elements transposables i els punts de trencament pot ser producte de l'atzar, degut al número finit de bandes on poden inserir-se els elements. S'ha calculat el número esperat de bandes compartides pels elements transposables i els punts de trencament de les inversions, així com la probabilitat de què el número de bandes compartides observades sigui igual o més gran a l'esperat (apartat 2.3.4, a Material i Mètodes).

La Taula 24 mostra els resultats. Les bandes properes al centròmer dels cromosomes contenen molts elements transposables, degut a la baixa recombinació que hi existeix. Per tant la coincidència amb els punts de trencament possiblement es deuran a aquest factor. Per això s'ha exclòs d'aquesta anàlisi les bandes d'aquestes regions i tot el cromosoma 6 (Taula 18). D'aquesta manera el número total de bandes és de 1.094, el número de bandes amb algun element transposable és de 185, i el de punts de trencament d'inversions és 26 (s'exclou un punt de trencament de la inversió  $2d^9$  localitzat a la banda 2G3d).



**Taula 24.** Associació entre els elements transposables i els punts de trencament de les inversions polimòrfiques de *D. buzzatii*.

Comparació	OBS.	ESP.	P	Comparació	OBS.	ESP.	P
<i>BuT1</i> vs. PT	1	0,05	<b>0,047</b>	<i>BuT5</i> vs. PT	7	1,93	<b>0,002</b>
<i>BuT2</i> vs. PT	1	0,10	0,092	<i>BuT6</i> vs. PT	1	0,05	<b>0,047</b>
<i>BuT3</i> vs. PT	2	0,76	0,175	<i>Gal</i> vs. PT	4	1,81	0,100
<i>BuT4</i> vs. PT	0	0,45	>0,369	ET <sup>a</sup> vs. PT	8	4,40	0,057

Elements transposables (ET), Punts de trencament (PT), *Galileo* (*Gal*). Els valors de probabilitat significatius s'escriuen en negreta.

<sup>a</sup> Quan es produeix la coincidència de varis elements en una banda es comptabilitza com una sola inserció.

Segons els resultats de la Taula 24 existeix una associació significativa entre alguns elements transposables (*BuT1*, *BuT5* i *BuT6*) i els punts de trencament de les inversions. A més, els resultats també s'acosten a la significació quan es consideren tots els elements conjuntament ( $P = 0,057$ ). L'associació entre la localització dels elements transposables i els punts de trencament de les inversions al grup *virilis* de *Drosophila*, s'ha interpretat com una evidència a favor de la participació dels elements en la generació de les inversions (Zelenstova *et al.* 1999; Evgen'ev *et al.* 2000). No obstant, igual que en aquest treball, sovint els elements transposables s'han localitzat als punts de trencament de les inversions a soques o espècies no portadores de la inversió, mentre que els resultats dels estudis de caracterització molecular de les regions dels punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  mostren que els elements només es troben als cromosomes portadors de la inversió.

La significació dels resultats obtinguts també es pot analitzar utilitzant per cada inversió només les soques portadores. D'aquesta manera sembla que l'associació entre *BuT5* i el punt de trencament distal de la inversió  $2z^3$ , i entre *Galileo* i el punt de trencament distal de la inversió  $4s$  no s'ha produït per atzar ( $P = 0,027$ ). Cal recordar que la presència d'un element al punt de trencament d'una inversió no implica que aquest hagi participat en la seva generació. Per exemple, l'element *BuT6* produeix un senyal d'hibridació al punt de trencament distal de la inversió  $2q^7$ , però l'anàlisi de la seqüència de la regió mostra que l'element no es troba exactament al punt de trencament. Els elements poden estar localitzats en aquella regió degut a la reducció de la recombinació o a altres factors. En els punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  de *D. buzzatii* s'hi ha trobat una acumulació d'elements transposables, però no tots han

participat en la generació de la inversió. A l'apartat 4.4.3 es discuteix perquè es produeixen aquestes acumulacions d'elements.

Per altra banda, també s'ha comparat la localització dels elements transposables a *D. buzzatii* amb la dels punts de trencament de totes les inversions descrites al complex *buzzatii* (Taula 25). A l'annex 2 es mostra la localització d'aquests punts de trencament (118 bandes diferents). Després de dividir el cromosoma 2 en 74 segments diferents es va observar que els punts de trencament no es distribueixen a l'atzar, amb alguns segments que acumulen fins a vuit punts de trencament i altres que no en tenen cap (Cáceres *et al.* 1997). Algunes bandes cromosòmiques també acumulen varis punts de trencament. Hi ha una banda amb vuit punts de trencament (2F2a), una banda amb cinc (2F6a), i cinc bandes amb quatre (2C6a, 2D1g, 2D3d, 2D5a i 2E2e). Suposant una distribució a l'atzar dels punts de trencament la probabilitat de què una banda acumuli tants punts de trencament és molt baixa, i podria estar causada per diferències en el contingut d'aquestes bandes (Cáceres *et al.* 1997). Aquestes bandes podrien ser punts calents per a la inserció d'elements transposables, que s'ha demostrat que poden generar inversions cromosòmiques. Només *Galileo* i *BuT3* semblen estar associats significativament amb els punts de trencament, tot i que *BuT5* i els elements considerats conjuntament també mostren uns nombres observats major als esperats i s'acosten molt a la significació estadística (Taula 25). En el cas de les bandes que acumulen més punts de trencament, s'han trobat elements transposables a les bandes 2D3d (*BuT4* a la soca jz<sup>3</sup>-6), 2F2a (*BuT5* a la soca j-24) i 2E2e (*BuT5* a la soca y<sup>3</sup>-1). Per tant, sembla que segueix existint una relació entre els elements transposables i els punts de trencament, però és més dèbil que l'existent dins de *D. buzzatii*. Aquesta diferència es pot deure a què els elements que estan presents a *D. buzzatii* possiblement no es trobin a les altres espècies, o bé mostrin una activitat menor. A més, igual que en el cas de les inversions de *D. buzzatii*, sembla molt probable que un element que hagi generat una inversió només es trobi als punts de trencament de les inversions de cromosomes amb la inversió.

**Taula 25.** Associació entre els elements transposables i els punts de trencament de les inversions del complex *buzzatii*.

Comparació	OBS.	ESP.	P	Comparació	OBS.	ESP.	P
<i>BuT1</i> vs. PT	1	0,21	0,199	<i>BuT5</i> vs. PT	13	8,51	0,072
<i>BuT2</i> vs. PT	1	0,42	0,359	<i>BuT6</i> vs. PT	1	0,21	0,199
<i>BuT3</i> vs. PT	7	3,36	<b>0,043</b>	<i>Gal</i> vs. PT	14	7,99	<b>0,022</b>
<i>BuT4</i> vs. PT	1	2,00	0,881	ET <sup>a</sup> vs. PT	26	19,45	0,059

Elements transposables (ET), Punts de trencament (PT), *Galileo* (*Gal*). Els valors de probabilitat significatius s'escriuen en negreta.

<sup>a</sup> Quan es produeix la coincidència de varis elements en una banda es comptabilitza com una sola inserció.

Finalment s'ha analitzat si existeix alguna associació entre la localització dels elements transposables i un conjunt d'inversions induïdes per introgressió híbrida a *D. buzzatii* (Naveira i Fontdevila 1985). A l'annex 3 es mostra la localització d'aquests punts de trencament (31 bandes diferents excloent un punt de trencament localitzat a 4G3a). En cap de les comparacions s'ha trobat associacions significatives entre aquests punts de trencament i els elements transposables, tot i que en alguns casos els valors de la probabilitat s'acosten a la significació estadística (Taula 26). També s'ha utilitzat la soca j-23, portadora d'una d'aquestes inversions (*5I*), i no s'ha trobat cap element transposable als seus punts de trencament. La soca j-24 també presenta una reordenació induïda per introgressió híbrida. En aquest cas es tracta d'una translocació de l'extrem terminal del cromosoma 5 al cromosoma Y. A la Figura 12h es pot veure els senyals d'hibridació produïts per *Galileo* sobre els cromosomes d'aquesta soca. Un dels senyals de *Galileo* es localitza precisament a la base del fragment del cromosoma 5 translocat. Aquest senyal es deu probablement a la politenització d'una regió del cromosoma Y, que no està politenitzada en condicions normals. Per tant aquest resultat pot reflexar la presència de *Galileo* a regions heterocromàtiques, concretament del cromosoma Y.

**Taula 26.** Associació entre els elements transposables i els punts de trencament de les inversions de *D. buzzatii* induïdes per introgressió híbrida.

Comparació	OBS.	ESP.	P	Comparació	OBS.	ESP.	P
<i>BuT1</i> vs. PT	0	0,06	>0,056	<i>BuT5</i> vs. PT	5	2,30	0,073
<i>BuT2</i> vs. PT	0	0,11	>0,109	<i>BuT6</i> vs. PT	0	0,06	>0,056
<i>BuT3</i> vs. PT	1	0,91	0,607	<i>Gal</i> vs. PT	2	2,15	0,896
<i>BuT4</i> vs. PT	1	0,54	0,423	ET <sup>a</sup> vs. PT	9	5,24	0,063

Elements transposables (ET), Punts de trencament (PT), *Galileo* (*Gal*).

<sup>a</sup> Quan es produeix la coincidència de varis elements en una banda es comptabilitza com una sola inserció.

Al contrari que en el cas de les inversions naturals, els punts de trencament d'aquestes inversions es distribueixen a l'atzar, i no s'acumulen a bandes o segments cromosòmics concrets (Cáceres *et al.* 1997). Aquests resultats són similars als obtinguts en l'anàlisi de la distribució dels punts de trencament de les inversions induïdes per raigs X (Federer *et al.* 1967) i per radiacions  $\gamma$  (Tonzetich *et al.* 1988). Per tant, és possible que aquestes inversions es produeixin per un mecanisme diferent i independent del contingut dels punts de trencament.

Els elements estudiats en aquest treball són només una petita part dels elements transposables de *D. buzzatii*. Tot i això s'ha trobat una associació significativa entre la seva localització cromosòmica i la dels punts de trencament de les inversions cromosòmiques descrites a *D. buzzatii* i el complex *buzzatii*. A més de les inversions  $2j$  i  $2q^7$ , s'han analitzat cromosomes portadors de tres inversions naturals més ( $2z^3$ ,  $2y^3$ , i  $4s$ ), i s'han localitzat elements transposables a un punt de trencament de dues d'elles ( $2z^3$  i  $4s$ ) (Figura 12e i g). Considerant el baix nombre de soques analitzades (dues portadores de les inversions  $2z^3$  i  $2y^3$ , i una portadora de la  $4s$ ), i la inestabilitat que s'ha descrit en els punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  (Cáceres *et al.* 2001; aquest treball), els resultats són sorprenents. La presència d'elements transposables en aquests punts de trencament no sembla deure's a l'absència de recombinació, doncs en aquestes inversions aquest efecte sembla menys important que en altres (Taula 23). El cas de *Galileo* és especialment significatiu, ja que és l'element que ha generat les inversions  $2j$  i  $2q^7$  i s'ha localitzat al punt de trencament distal de la inversió  $4s$ . El fet de què la hibridació s'hagi fet sobre un heterocariotip permet veure que l'element se situa

exactament al punt de trencament (Figura 12g). Aquests resultats, la inestabilitat genètica que mostren els elements de tipus *Foldback*, i l'alt nombre de còpies de *Galileo* que sembla contenir el genoma de *D. buzzatii*, suggereixen que aquest element pot jugar un paper important en l'evolució de l'espècie.

#### **4.4.3 Associació entre els elements transposables**

El 21 % dels elements transposables de *D. melanogaster* es troben inserits dins d'altres elements o en una posició adjacent (Kaminker *et al.* 2002). La tendència dels elements transposables a agrupar-se podria explicar la formació de punts calents d'insercions als punts de trencament de les inversions. Per estudiar perquè els elements estudiats en aquest treball s'han acumulat als punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  s'ha analitzat si mostren alguna tendència a localitzar-se a les mateixes bandes dels cromosomes. A la Taula 27 es mostren totes les bandes on s'ha localitzat més d'un element transposable. En aquesta anàlisi tampoc s'han considerat les regions proximals dels cromosomes. Excloent les bandes incloses a les regions proximals s'obtenen 25 bandes amb dos o més elements. A la Taula 28 es mostren totes les associacions entre elements on s'ha trobat alguna coincidència, comparant les posicions compartides pels elements transposables observades amb les esperades segons un repartiment a l'atzar dels elements per la regió analitzada. La significació d'aquests resultats s'ha calculat de la mateixa manera que l'associació entre els punts de trencament i les inversions (Zelenstova *et al.* 1999). L'anàlisi s'ha realitzat incloent i excloent les bandes dels punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$ , ja que l'acumulació d'elements en aquestes bandes també pot deure's a l'absència de recombinació.

**Taula 27.** Bandes amb dos o més elements transposables.

Banda	Elements	Banda	Elements
<b>XB1f</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	3G3h	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>XC1d</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	3G4a	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>XD3b</b>	<i>BuT3, Galileo</i>	3G4c	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>XD3g-h</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	3G4d	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>XF5g</b>	<i>BuT4, Galileo</i>	3G4e	<i>BuT6, Galileo</i>
XF1c	<i>BuT3, BuT5, Galileo</i>	3G4f	<i>BuT1, BuT5, Galileo</i>
XG2b	<i>BuT1, Galileo</i>	3G5a	<i>BuT3, Galileo</i>
XG2k	<i>BuT1, BuT5, Galileo</i>	3G5b	<i>BuT5, Galileo</i>
XH1a	<i>BuT3, BuT5</i>	3G5d	<i>BuT2, BuT5, Galileo</i>
XH1b	<i>BuT5, Galileo</i>	3H1a	<i>BuT2, BuT6, Galileo</i>
XH1c	<i>BuT1, BuT5, Galileo</i>	<b>4E5e</b>	<i>BuT3, BuT5</i>
XH1d	<i>BuT1, BuT3, Galileo</i>	<b>4F3d</b>	<i>BuT3, BuT4</i>
XH1e	<i>BuT1, BuT3, BuT5, Galileo</i>	<b>4G1c</b>	<i>BuT1, Galileo</i>
XH1f	<i>BuT1, BuT3, BuT4, BuT5, Galileo</i>	4G4d	<i>BuT3, BuT6, Galileo</i>
XH1g	<i>BuT1, BuT3, BuT5, Galileo</i>	4G4e	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>2B2d</b>	<i>BuT4, BuT5</i>	4G5a	<i>BuT2, BuT3, BuT6, Galileo</i>
<b>2C7f</b>	<i>BuT3, BuT5</i>	4G5b	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>2D3c</b>	<i>BuT5, BuT6, Galileo</i>	4G5e	<i>BuT3, BuT5, BuT6, Galileo</i>
<b>2D4a</b>	<i>BuT3, Galileo</i>	<b>5D5b</b>	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>2E2g</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	<b>5E1a</b>	<i>BuT3, BuT5</i>
<b>2E4g</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	<b>5E5d</b>	<i>BuT3, BuT5</i>
<b>2E5a</b>	<i>BuT1, BuT2, BuT3, BuT5, Galileo</i>	5G2f	<i>BuT2, Galileo</i>
<b>2F2b</b>	<i>BuT3, BuT5</i>	5G4a	<i>BuT2, Galileo</i>
<b>2G1g</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	5G4c	<i>BuT5, Galileo</i>
<b>2G2e</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	6A1a	<i>BuT3, BuT6, Galileo</i>
<b>2G2f</b>	<i>BuT3, BuT5, Galileo</i>	6A1c-d	<i>BuT4, Galileo</i>
2G4c	<i>BuT5, Galileo</i>	6A1e	<i>BuT2, BuT3, Galileo</i>
2G5e-f	<i>BuT3, BuT5, Galileo</i>	6A1g	<i>BuT5, Galileo</i>
2G5h	<i>BuT6, Galileo</i>	6A1h	<i>BuT5, Galileo</i>
2H1a	<i>BuT6, Galileo</i>	6A1i	<i>BuT3, Galileo</i>
<b>3B4h</b>	<i>BuT4, Galileo</i>	6A2a	<i>BuT1, BuT3, BuT5, BuT6, Galileo</i>
<b>3C4b</b>	<i>BuT3, BuT4, BuT5</i>	6A2c	<i>BuT3, BuT5, BuT6, Galileo</i>
<b>3E2e</b>	<i>BuT5, Galileo</i>	6A2e-f	<i>BuT1, Galileo</i>
3G3a	<i>BuT3, BuT5</i>	6A2h	<i>BuT4, Galileo</i>
3G3c	<i>BuT4, BuT5, Galileo</i>	6A2i	<i>BuT6, Galileo</i>
3G3d	<i>BuT2, BuT5</i>		

Les bandes en negreta són les incloses a les regions d'alta recombinació.

**Taula 28.** Associació entre els elements transposables.

Comparació	Excloent PT de $2j$ i $2q'$			Incloent PT de $2j$ i $2q'$		
	OBS.	ESP.	P	OBS.	ESP.	P
<b>BuT1 vs. ET<sup>a</sup></b>	1	0,17	0,167	2	0,34	<b>0,028</b>
<i>BuT1 vs. BuT2</i>	0	0,00	>0,003	1	0,01	<b>0,007</b>
<i>BuT1 vs. BuT3</i>	0	0,03	>0,027	1	0,06	0,058
<i>BuT1 vs. BuT5</i>	0	0,07	>0,071	1	0,15	0,143
<i>BuT1 vs. Gal</i>	1	0,07	0,067	2	0,14	<b>0,005</b>
<b>BuT2 vs. ET<sup>a</sup></b>	0	0,49	>0,416	1	0,67	0,518
<i>BuT2 vs. BuT3</i>	0	0,08	>0,080	1	0,12	0,112
<i>BuT2 vs. BuT5</i>	0	0,21	>0,200	1	0,30	0,265
<i>BuT2 vs. Gal</i>	0	0,20	>0,188	1	0,28	0,251
<b>BuT3 vs ET<sup>a</sup></b>	9	4,43	<b>0,024</b>	11	4,80	<b>0,005</b>
<i>BuT3 vs. BuT4</i>	2	0,52	0,094	2	0,56	0,104
<i>BuT3 vs. BuT5</i>	7	2,14	<b>0,004</b>	9	2,37	<b>&lt;0,001</b>
<i>BuT3 vs. Gal</i>	3	2,01	0,325	5	2,22	0,065
<b>BuT4 vs ET<sup>a</sup></b>	5	2,93	0,155	5	2,97	0,162
<i>BuT4 vs. BuT5</i>	2	1,36	0,399	2	1,41	0,417
<i>BuT4 vs. Gal</i>	2	1,27	0,367	2	1,32	0,385
<b>BuT5 vs ET<sup>a</sup></b>	16	8,58	<b>0,008</b>	19	9,11	<b>0,001</b>
<i>BuT5 vs. BuT6</i>	0	0,07	>0,071	1	0,15	0,142
<i>BuT5 vs. Gal</i>	10	5,22	<b>0,030</b>	13	5,63	<b>0,003</b>
<b>BuT6 vs. ET<sup>a</sup></b>	0	0,17	>0,166	1	0,34	0,308
<i>BuT6 vs. Gal</i>	0	0,07	>0,067	1	0,14	0,134
<b>Gal vs ET<sup>a</sup></b>	14	8,23	<b>0,027</b>	17	8,75	<b>0,004</b>

Elements transposables (ET), Punts de trencament (PT), *Galileo* (*Gal*). Els valors de probabilitat significatius s'escriuen en negreta.

<sup>a</sup> Número d'insercions d'elements transposables menys les de l'element amb el qual es comparen. Quan es produeix la coincidència de varis elements en una banda es comptabilitza com una sola inserció.

Quatre elements (*BuT1*, *BuT3*, *BuT5* i *Galileo*) mostren una associació significativa amb els altres elements. Quan la comparació es realitza entre parelles d'elements es detecten coincidències significatives a dues o quatre de les 21 parelles

possibles, segons l'anàlisi realitzada. Aquest resultat suggereixen que existeix una certa tendència dels elements a inserir-se a les mateixes bandes. Aquesta tendència és independent de la taxa de recombinació, i per tant pot explicar parcialment la formació de punts calents per a la inserció d'elements transposables. A *D. virilis* també s'ha demostrat l'associació entre els elements *Penelope* i *Ulysses* (Zelenstova *et al.* 1999; Evgen'ev *et al.* 2000), i al genoma d'*Arabidopsis* i *Solanum tuberosum* un grup de retrotransposons amb LTRs proporcionen llocs d'inserció preferencial per altres insercions (Witte *et al.* 2001). Aquest agrupament dels elements transposables també s'ha descrit a altres organismes com el blat de moro (SanMiguel *et al.* 1996, 1998).

Moltes d'aquestes insercions es produeixen a la mateixa banda de soques diferents. Per tant, aquestes dades es poden interpretar com la tendència a inserir-se a determinades seqüències, més que una evidència a favor de la inserció dels elements dins d'altres elements. Per exemple, a *Saccharomyces cerevisiae* s'ha descrit la formació d'agrupacions d'elements transposables a les regions 5' no codificants de gens transcrits per la RNA polimerasa III (Voytas 1996; Boeke i Devine 1998). La preferència insercional podria ser un factor primari, que determinés el lloc de la inserció. Això explicaria perquè s'han trobat elements de característiques similars als punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$ , ja que aquestes preferències poden ser diferents per als diferents tipus d'elements. Posteriorment les insercions se sotmetrien a la selecció natural, i per això els elements inserits a regions de baixa recombinació (com les regions proximals o els punts de trencament de les inversions) tindrien una major probabilitat de no ser eliminats. Els elements localitzats en aquestes regions difícilment poden produir reordenacions per recombinació, i en cas de tenir un efecte lleugerament deleteri serà més difícil eliminar-los. Finalment, també s'ha proposat que la tendència a agrupar-se dels elements transposables es deu a la reducció dels efectes negatius que pot tenir la seva mobilització (Kidwell i Lisch 1997; Witte *et al.* 2001). Aquest factor hauria d'afectar a la distribució dels diferents tipus d'elements, i per tant no explica perquè als punts de trencament de les inversions  $2j$  i  $2q^7$  no s'hi han trobat elements de classe II.