

**ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA EN CROMOSOMAS
POLITENICOS DE TRES ESPECIES DE *DROSOPHILA*
DEL GRUPO *OBSCURA*.**

MEMORIA PRESENTADA POR M. DOLORES MOLTO RUIZ
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS POR LA UNIVERSITAT DE VALENCIA.

València, Mayo de 1991.



UMI Number: U607655

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607655

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



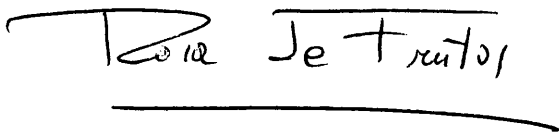
ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D^a Rosa de Frutos Illán, Catedrática del Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València y D^a M^a. José Martínez Sebastián, Profesora Titular del mismo Departamento,

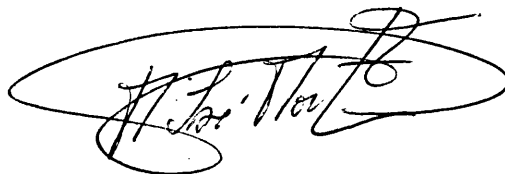
CERTIFICAN: Que la memoria titulada "Estudio de la expresión génica en cromosomas politénicos de tres especies de *Drosophila* del grupo *obscura*", ha sido realizada bajo su codirección, en este Departamento, por M. Dolores Moltó Ruiz, Licenciada en Ciencias Biológicas, y

AUTORIZAN: Su presentación en el Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia a 27 de Mayo de 1991.



Fdo: Rosa de Frutos Illán



Fdo: M^a José Martínez Sebastián



UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIBLIOTECA
N.º Registro 872
Fecha 1-4-92
SIGNATURA T. D. 404
C. D. U. Pi. 18771075

30 cmJ

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, mis directores, mis compañeros, mis amigos y mi familia.

Igualmente, quiero hacer constar mi gratitud a D. José Luis Ménsua, director del Departament de Genètica, por la oportunidad que me ha dado de formarme en el campo de la investigación científica, así como su ayuda en la realización y discusión de la parte estadística de este trabajo.

Por último, agradecer a la Conselleria de Cultura Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana, el apoyo económico que me ha ofrecido en estos años de trabajo.

A qui encara no conec i ja l'estimo,
al meu fill Pau.

INDICE

ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA EN CROMOSOMAS POLITENICOS DE
TRES ESPECIES DE *DROSOPHILA* DEL GRUPO *OBSCURA*.

	<u>Pag</u>
INTRODUCCION.....	1
1. Cromosomas politénicos.....	2
2. "Puffs" cromosómicos.....	7
3. Actividad secuencial de la expresión génica durante el desarrollo: Patrones temporales de "puffs"	9
4. Efecto de la temperatura sobre la expresión génica: "puffs" y genes de choque térmico.....	12
5. Los cromosomas politénicos en los estudios filogenéticos de <i>Drosophila</i>	21
6. <i>D. subobscura</i> , <i>D. guanche</i> y <i>D. madeirensis</i> , en el contexto del grupo <i>obscura</i> del género <i>Drosophila</i>	25
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y METODOS.....	32
1. CEPAS UTILIZADAS.....	33
2. METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENICA DURANTE EL DESARROLLO.....	36
2.1. Desarrollo larvario y prepupal en <i>Drosophila</i>	36
2.2. Obtención de individuos sincronizados.....	36
2.3. Técnicas citológicas.....	37
2.4. Detección de "puffs".....	37
2.5. Coeficientes de distancia genética.....	38
3. METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENICA EN CONDICIONES INDUCIDAS (CHOQUE TERMICO).....	41
3.1. Tratamiento con agentes inductores del estrés: Temperatura supraóptima, Benzamida y Paracetamol.....	41
3.2. Detección de los "puffs" inducidos por el choque térmico.....	41
3.3. Detección de RNAm en los "puffs " inducidos, mediante autorradiografía.....	42
3.4. Detección de las proteínas de choque térmico.....	43
3.5. Sondas utilizadas.....	44
3.6. Aislamiento y cuantificación de DNA.....	45
3.6.1. Aislamiento de DNA plasmídico.....	45
3.6.2. Aislamiento de DNA genómico de <i>Drosophila</i>	45
3.6.3. Cuantificación del DNA.....	46
3.7. Digestión con enzimas de restricción.....	46
3.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	46
3.9. Purificación de fragmentos de DNA.....	47

3.10. Marcaje de DNA.....	47
3.10.1. Marcaje radiactivo.....	47
3.10.2. Marcaje no radiactivo.....	47
3.11. Transferencia de DNA a filtros.....	48
3.12. Hibridación en filtros de nylon.....	48
3.13. Hibridación <i>in situ</i>	49
3.13.1. Obtención de preparaciones citológicas con cromosomas bandeados, extendidos y planos.....	49
3.13.2. Condiciones de hibridación.....	51
 RESULTADOS.....	 53
1. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD GENICA DURANTE EL DESARROLLO.....	54
1.1. <u>Patrones temporales de actividad génica en</u> <u><i>Drosophila madeirensis</i></u>	54
1.1.1. Descripción de los "puffs".....	54
1.1.2. Estudio cualitativo de la actividad génica: Modelos de formación de "puffs".....	56
1.1.3. Definición del patrón característico.....	58
1.1.4. Estudio cuantitativo de la actividad génica: Frecuencias de aparición de "puffs".....	59
1.2. <u>Patrones temporales de actividad génica en</u> <u><i>Drosophila guanche</i></u>	74
1.2.1. Descripción de los "puffs".....	74
1.2.2. Modelos de formación de "puffs".....	75
1.2.3. Patrón característico de <i>D.guanche</i>	75
1.2.4. Frecuencias de aparición de "puffs".....	76
1.3. <u>Análisis comparativo entre los patrones de</u> <u>actividad de <i>Drosophila subobscura</i>, <i>Drosophila</i></u> <u><i>guanche</i> y <i>Drosophila madeirensis</i></u>	90
1.3.1. Comparación entre los patrones característicos de cada especie..	90
1.3.2. "Puffs" no descritos en algún miembro de la triada (<i>D. subobscura</i> , <i>D. guanche</i> y <i>D. madeirensis</i>).....	92
1.3.3. Indices de Actividad Media.....	92
1.3.4. Medida de la distancia biológica.....	94
2. ACTIVIDAD GENICA EN CONDICIONES INDUCIDAS. ANALISIS GENETICO DE LA RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO.....	105
2.1. Patrones de "puffs" inducidos por choque térmico....	105
2.2. Efecto del choque térmico en los patrones de síntesis de RNAm.....	113
2.3. Localización cromosómica de los genes de choque térmico.....	119
2.4. Proteínas de choque térmico.....	126

2.5. Caracterización molecular de los genes de choque término.....	131
2.5.1. Familia HSP82.....	131
2.5.2 Familia HSP70.....	133
2.5.3. Familia de genes HSPs que codifican para las proteínas de bajo peso molecular.....	136
2.6. Identificación del locus hsrw: efecto de la benzamida y del paracetamol en el patrón de "puffs".	142
2.7. Determinación de la ordenación génica del cromosoma O de <i>D.guanche</i>	145

DISCUSION.....	150
-----------------------	------------

1. "Puffs" desarrollo.....	151
2. "Puffs" y genes de choque térmico.....	162

CONCLUSIONES.....	176
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA.....	179
--------------------------	------------

INTRODUCCION



1. CROMOSOMAS POLITENICOS.

Un alto contenido de DNA en el genoma de un organismo puede manifestarse por un número mayor de cromosomas ó por un incremento del tamaño de los mismos, dando lugar a núcleos y células más grandes. Si tal característica está presente en todas las células, dicho organismo requerirá, paralelamente, un aumento de las actividades replicativas ó del período necesario para que éstas se lleven a cabo, ó ambos hechos a la vez. Sin embargo, el desarrollo embrionario de los organismos se caracteriza por presentar ciclos celulares cortos, siendo una gran desventaja disponer de mucho DNA. Una forma de reunir, en un mismo organismo pluricelular, las ventajas que confiere un bajo contenido de DNA en el genoma (replicaciones rápidas y ciclos celulares cortos) y aquellas características de un alto contenido de DNA (tamaños celulares mayores con grandes actividades de síntesis), sería disponer de una línea germinal con bajo contenido de DNA, pero capaz de multiplicar el genoma ó partes del mismo, en líneas celulares específicas. Actualmente, tal situación es una realidad en determinados organismos, ya que presentan cromosomas politénicos en algunos de sus tejidos.

Los cromosomas politénicos han sido descritos en un número limitado de especies de la Naturaleza (ver monografía de Sorsa, 1988). Se han encontrado en protozoos ciliados, algunas plantas y en una amplia variedad de insectos pertenecientes a los órdenes *Collembola* y *Diptera*. En todos ellos se ha observado un gran número de variantes desde la endopoliploidia a la politenia típica. La mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo en unas pocas especies de dípteros, en las cuales los cromosomas politénicos son característicos de la mayoría de las larvas y de unos pocos tejidos adultos. Los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de las larvas de *Drosophila* y *Chironomus*, son los mejor conocidos genéticamente.

El aumento de DNA que da lugar a los cromosomas politénicos, se produce como consecuencia de cierto número de ciclos de replicación, cuando los ciclos celulares normales han terminado y se ha obtenido el número final de células del tejido. En el mecanismo de politenización, la mayoría de los acontecimientos esenciales de un ciclo de división celular han desaparecido, siendo la fase S (fase replicativa del DNA) la más importante, de ahí que se hable de cromosomas interfásicos. Como resultado, se originan grandes células, donde las numerosas copias de cada tipo cromosómico permanecen unidas, de manera que cada cromosoma está amplificado, siendo su longitud de aproximadamente 100-200 veces la del cromosoma mitótico correspondiente. La

ausencia de condensación de las cromátidas es uno de los requisitos necesarios en el origen de los cromosomas politénicos. Además, los cromosomas homólogos tienden a estar apareados (apareamiento somático), observándose el número haploide de cromosomas característico de la especie. Estas replications que conducen a la formación de los cromosomas politénicos parece que ya han comenzado en el momento de la eclosión larvaria (Rudkin, 1964).

El número de ciclos de replicación de los cromosomas politénicos, parece depender de la especie y del tipo de tejido. De esta forma, se distingue, para cada tejido, un óptimo en el grado de politenia, dependiendo del tamaño de sus células y de su actividad. El mayor grado de politenia conocido, es el de los cromosomas de las glándulas salivares de algunas especies de la familia *Chironomidae* (Beermann, 1952), que contienen entre 8000 y 16000 cromátidas por cromosoma homólogo. La politenia más baja observable, corresponde a cromosomas con 32-64 cromátidas. Generalmente los cromosomas con menores ciclos de replicación son los de las células de los túbulos de Malpigio ó del intestino medio.

Otra característica de los cromosomas politénicos, además de su tamaño, es que muestran un patrón de bandas típico, originado por la alternancia de regiones condensadas (bandas) y regiones descondensadas (interbandas). Esta organización en bandas/interbandas, es consecuencia del exacto alineamiento de las cromátidas en los cromosomas, de forma que las regiones de fuerte empaquetamiento de las cromátidas individuales tienen la apariencia de bandas (cromómeros), alternándose con las interbandas ó intercromómeros.

Aunque en un principio, los resultados obtenidos sobre los patrones de bandas de diferentes tejidos de un mismo organismo, se interpretaron como variaciones específicas de dicho patrón, los trabajos de Beermann (1952) determinaron que el modelo de bandas es característico de cada especie. Esto permitió construir mapas citológicos muy precisos, en los cuales cada banda cromosómica quedaba identificada por una letra y un número determinado (ver Ashburner, 1989). Estos mapas se convirtieron en una herramienta indispensable para la localización de reordenaciones cromosómicas (inversiones, translocaciones, duplicaciones y deleciones) que originan alteraciones del modelo de bandas. En *D. melanogaster*, muchas de estas reordenaciones cromosómicas pudieron ser asociadas a mutantes fenotípicos determinados, facilitándose de esta manera la correlación entre tales mapas citológicos y los mapas genéticos preexistentes de esta especie, compilados principalmente por Morgan y colaboradores.

Las aberraciones cromosómicas más utilizadas en *Drosophila*, para mapear genes, han sido las deficiencias, ya que la mayoría de ellas, incluso las que implican una sola banda, son letales en homocigosis, ó manifiestan un efecto fenotípico evidente. Actualmente, la posición exacta de genes particulares en el mapa citológico, puede determinarse por la técnica de hibridación *in situ* (Pardue *et al.*, 1970, 1977).

Desde que Painter (1934a) proporcionó suficientes evidencias de que las estructuras nucleares que observó, por primera vez Balbiani (1881) en algunos dípteros, representaban cromosomas homólogos apareados durante la interfase (cromosomas politénicos), se ha establecido una ferviente discusión, aún presente en nuestros días, sobre donde se localizan los genes en los cromosomas. (Pelling, 1964; Beermann, 1972; Lefevre, 1974; Ashburner, 1980; Zhimulev *et al.*, 1981; Hill y Rudkin, 1987, Sorsa, 1988). En este sentido se han propuesto todas las hipótesis posibles.

La localización, en *Drosophila*, de los genes de las mutaciones de color de ojos "vermilion" y "white", en bandas concretas de los cromosomas politénicos (Painter 1933, 1934b), fue la primera evidencia experimental de que los genes residían en las bandas. Para *D. melanogaster* se contabilizó un total de 5059 bandas, considerando, por tanto, que el número de genes, en esta especie, debía ser, aproximadamente, de 5000 (ver Lefevre, 1976). En los trabajos clásicos de los años cincuenta, es asumida la hipótesis de una banda-un gen (Mechelke, 1953; Breuer y Pavan, 1955; Beermann, 1956). Según estos autores, la actividad génica se manifestaría, citológicamente, como cambios estructurales reversibles de las bandas, originándose las estructuras abultadas denominadas "puffs".

La presencia de los genes en las bandas, estuvo apoyada, además de por los análisis de complementación realizados fundamentalmente por el grupo de Judd, en los años setenta (ver Sorsa, 1988), por el hecho de que más del 95% del DNA se encuentra concentrado en ellas. El resto corresponde a las zonas de interbanda (Beermann, 1972). Sin embargo, los resultados de densitometría de Laird (1980) indicaron que las interbandas representan alrededor del 25% del DNA eucromático.

Para *D. melanogaster*, se ha estimado que el contenido de DNA en una banda oscila entre 5-100kb, dándose un valor promedio de 30kb. (Rudkin, 1965, 1972). Este dato supuso una paradoja dentro del contexto de la hipótesis una banda-un gen, ya que implica que una banda media contiene más DNA del necesario para codificar una proteína de tamaño medio. La objeción más seria en contra de la igualdad entre cromómeros y genes, proviene de los estudios sobre la organización genética de las bacterias. Los genes individuales, al menos en los operones bacterianos, constituyen fragmentos cortos de DNA de aproximadamente 1-1.5kb. Por lo tanto, es evidente

que en los cromosomas eucarióticos debe haber, además de los genes conocidos, mucho DNA extra.

En la bibliografía se encuentra toda una serie de datos y argumentos que invalidan la proporción 1:1, entre el número de genes calculados para una especie y el número de bandas de sus cromosomas politénicos. Zhimulev *et al.* (1981) demostraron claramente, la existencia de tres grupos de complementación, con funciones independientes, y de dos regiones silenciosas dentro de la misma banda. Ultimamente, los biólogos moleculares proporcionan datos referentes a la localización de genes concretos en los cromosomas. Por ejemplo, en *D. melanogaster*, los numerosos genes que codifican para los RNAr 5S ; el "cluster" de las histonas y los HSPs que codifican para las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, se agrupan, respectivamente, en una sola región cromosómica (Wimber y Stefensen, 1970; Pardue *et al.*, 1977; Corces *et al.*, 1980). De todo ello se deduce que una banda puede contener varios genes ó copias de la misma secuencia codificadora.

El "crack" sufrido por la hipótesis una banda-un gen, dio paso a otros modelos alternativos que explicasen la organización funcional de los cromosomas politénicos. En todos ellos se destaca una mayor participación de las interbandas como unidades activas. Estas ideas ya existían en 1934, desde que Koltzoff sugirió que los genes residían en las interbandas, en base a que las regiones inactivas de la cromatina se teñían mucho más que las activas. Crick (1971) propuso que las secuencias reguladoras de los genes podrían localizarse en las bandas, mientras que las regiones codificadoras quedarían representadas por las interbandas. Para Paul (1972), los genes estructurales se localizarían en las bandas y sus promotores en los intercromómeros adyacentes, de acuerdo con los resultados obtenidos en los cromosomas plumulados. Sin embargo, el grupo de Zhimulev (1981, 1983) ha sido el mayor defensor del modelo de organización dinámica de los cromosomas politénicos. Según este modelo, el patrón de bandas característico de tales cromosomas, reflejaría el estado transcripcional local, más bien que la distribución de genes individuales separados por regiones espaciadoras. Habría dos tipos de regiones en estos cromosomas: aquellas que están transcribiendo permanentemente, donde se localizan los genes "housekeeping", que proporcionan los productos génicos necesarios para las funciones celulares y que, por tanto, son siempre activos independientemente del tejido y del estado de desarrollo; y aquellas que transcriben sólo en ciertos estados de desarrollo en ciertos tejidos. Las regiones que están transcribiendo permanentemente deben permanecer descondensadas, característica que cumplen las interbandas, por tanto en ellas se localizan los genes "housekeeping". En cambio una banda, según este modelo, es un fragmento de DNA inactivo temporal o constantemente. Una consecuencia de este modelo, es que el patrón de bandas se



correspondería con el estado funcional de la célula. El patrón de bandas debe variar entre diferentes tejidos, como reflejo de las diferencias específicas de actividad en cada uno de ellos. Estas diferencias se atribuyen a diferencias en la actividad de los "puffs". Por otro lado, la homología general del patrón de bandas de diferentes tejidos, reflejaría similitudes en la actividad de los genes "housekeeping".

La localización de un gen específico de tejido, dentro del intrón de otro gen constitutivamente muy activo, en el locus Gart (Henikoff *et al.*, 1986), nos indica cuán compleja puede ser la organización funcional del material genético en los cromosomas eucarióticos.

Estos nuevos modelos surgen a partir del gran número de pruebas experimentales que sugieren que todas las regiones descondensadas de los cromosomas politénicos ("puffs", bandas difusas, interbandas y posiblemente las vacuolas que se detectan dentro de ciertas bandas) constituyen regiones transcripcionalmente activas. La localización, en las interbandas, de las partículas RNP, características de los anillos de Balbiani de *Chironomus*, se interpretó como prueba de su actividad transcripcional (Mott *et al.*, 1980). Semeshin *et al.* (1979) obtuvieron evidencias autorradiográficas sobre la actividad transcripcional de las interbandas. Se han llevado a cabo experiencias de inmunolocalización de la RNA polimerasa en los cromosomas politénicos, determinándose su presencia en los "puffs", bandas difusas e interbandas (Jamrich *et al.*, 1977). La inmunolocalización de los híbridos DNA-RNA ha sido investigada por Rudkin y Stollar (1977), Alcover *et al.* (1982), Busen *et al.* (1982), Diez y Baretino (1984), encontrándose, de nuevo, actividad transcripcional en las interbandas de los cromosomas politénicos. Se llegó incluso a proponer un papel regulador de las interbandas, a partir de los resultados de la localización del DNA-Z en dichas regiones (Nordheim *et al.*, 1981). Sin embargo, tal hipótesis dejó de ser atractiva, cuando Hill y Stollar (1983) demostraron que la distribución del DNA-Z en los cromosomas dependía de las condiciones de fijación utilizadas.

Como vemos todos los datos confirman, ó al menos, no contradicen la noción de que las interbandas sean "micropuffs", según postulan Zhimulev *et al.* (1981). La objeción común que se hace es que el contenido de DNA en las interbandas es demasiado pequeño para albergar un gen. Sin embargo, los datos respecto a este punto aún no están muy claros, ya que depende de la técnica utilizada. Además, las estimaciones sobre la longitud de las interbandas son aproximadas. Incluso considerando la definición de una interbanda propiamente dicha, es imposible distinguir entre un "puff" muy pequeño y una gran interbanda.

El modelo dinámico propuesto por el grupo de Zhimulev representa, actualmente, un paradigma tan fascinante como lo fue, el de una banda-un gen, en los últimos cincuenta años.

2. "PUFFS" CROMOSOMICOS.

A Beermann se le debe la tesis de que los "puffs" y anillos de Balbiani (BR) representan genes activos. Este autor demostró que la expresión de muchos "puffs" era específica de ciertos tejidos, así como del estado de desarrollo de los individuos (Beermann, 1956). Estos hechos sugerían que la presencia de determinados "puffs" representaba la transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias en un estadio de desarrollo ó tejido particular. En este contexto los "puffs" fueron definidos como estructuras transitorias, originadas por la descondensación local de la cromatina, formándose áreas de mayor diámetro que permitía la visualización, al M.O., de la actividad de los genes. La inducción de los "puffs" reflejaría la activación de los genes que van a ser transcritos, y la regresión de los "puffs" la inactivación de los mismos.

Desde entonces, se han diseñado y aplicado un gran número de métodos para constatar la funcionalidad de los "puffs".

Una de las técnicas más comunes en la demostración de la actividad transcripcional en los cromosomas, es la autorradiografía. El uso de uridina tritiada en los análisis citológicos de los cromosomas politénicos, empezó con Pelling (1959, 1964). Este autor encontró que los "puffs" eran los sitios de mayor incorporación del precursor radiactivo, estableciendo una correlación directa entre el tamaño de los "puffs" y el grado de síntesis de RNA. Similares resultados fueron obtenidos por el grupo de Zhimulev (Zhimulev y Belyaeva, 1975; Belyaeva y Zhimulev, 1976).

La utilización de técnicas de tinción diferencial para visualizar la actividad transcripcional en los cromosomas, se basa en el uso de colorantes que se unen específicamente a los productos de transcripción (al RNA ó a los posibles componentes proteicos asociados a los transcritos). Tales técnicas han sido aplicadas, con éxito, en la determinación de la actividad transcripcional de los "puffs" (ver monografía de Sorsa, 1988).

Las primeras micrografías electrónicas de los cromosomas politénicos, permitieron visualizar los productos resultantes de su expresión. Un gran número de investigadores han detectado, dentro de los grandes "puff" y anillos de Balbiani de *Chironomus*, una serie de gránulos que posteriormente se identificaron como ribonucleoproteínas (RNP) (revisión de Daneholt, 1982).

Beermann (1961) y Grossbach (1973) asignaron a ciertos anillos de Balbiani, un número reducido de proteínas secretoras de las glándulas salivares en *Chironomus*, en base

a estudios electroforéticos, genéticos y citogenéticos. Determinaron que las diferencias en los "puffs" entre las especies *Ch. tentans* y *Ch. pallidivittatus*, correspondían a diferencias en los genes que codifican para las proteínas secretoras.

En *Drosophila*, también, se han llevado a cabo intentos de relacionar "puffs" específicos con proteínas específicas. En las glándulas salivares de *D. melanogaster*, se han descrito 6 "puffs" característicos del tercer estadio larvario, periodo en el cual se da una elevada síntesis de proteínas salivares. La asociación de estas proteínas con sus correspondientes "puffs" del tercer estadio larvario, ha sido demostrada por diferentes autores (Akam *et al.*, 1978; Velissariou y Ashburner, 1981; Crowley *et al.*, 1983). Más recientemente, Manousis y Kastritsis (1987) han identificado a dos proteínas secretoras como el producto de la actividad del BR2 de *D. auraria*.

Otra relación "puff"-producto, en *Drosophila*, es la que se obtuvo gracias al estudio de los "puffs" de choque térmico, como veremos en apartados posteriores.

La forma de abordar la funcionalidad de un gen, ha sido dentro de la Genética clásica, el estudio de mutaciones fenotípicamente detectables, que afectasen a la expresión de dicho gen. En *Drosophila* se citan pocos ejemplos de mutaciones que provocan, en loci concretos, la pérdida de la capacidad de "puffing". Kiknadze (1966) encontró diferencias de actividad en varios loci entre cepas salvajes de *D. melanogaster* y líneas del mutante "yellow" de esta especie. Tales diferencias parecían estar correlacionadas con la mutación "yellow". Korge (1975) descubrió mutantes de *Drosophila* que carecían del "puff" 3C, así como de la proteína salivar para la cual codifica.

Ante la gran diversidad de información que se ha ido recogiendo sobre la morfología de los "puffs" en los distintos tejidos y especies, el grupo de Zhimulev (Zhimulev *et al.*, 1981, 1983 y Semeshin *et al.*, 1985a,b) se planteó por primera vez, la sistematización de estos datos, proponiendo 6 tipos morfológicos de "puffs":

- 1.- El "puff" se origina de una banda, por descondensación uniforme de toda la banda, de parte de ella, de las partes derecha e izquierda ó de diversas partes de la banda.
- 2.- Otros "puffs" comienzan con la descondensación de una sólo banda, siendo afectadas, posteriormente, dos ó tres bandas adyacentes.
- 3.- Los "puffs" multibandas se forman a partir de un lugar de origen y van extendiéndose (movimiento del "puff") por desespiralización de una serie de bandas vecinas, llegando a afectar, en algunos casos, a una región cromosómica completa.

4.- Existen casos en que un "puff" se forma por la fusión de dos zonas activas diferentes, separadas por una región no activa.

5.- Los "micropuffs" ó "puffs" pequeños se forman por la desespiralización de parte del material, lo que origina una fragmentación de la banda ó bandas afectadas.

6.- Finalmente, muchos de los "micropuffs" se originan por elongación de las interbandas.

Sin lugar a dudas, estos modelos deben reflejar la forma en cómo están organizadas las regiones activas. La formación de un "puff" puede ser consecuencia de la activación de una unidad de transcripción de gran tamaño. Tales "puffs" se originarían por la desespiralización uniforme de una banda. Para aquellos que afectan a varias bandas, puede deberse a la presencia de varias secuencias repetidas de tamaño medio ó secuencias distintas pero responsables de un proceso ó producto común, que se transcriben independientemente. Para el caso de los "puffs" multibandas su formación podría ser consecuencia de la activación de varias secuencias simultáneamente, aunque la función y regulación sea independiente en algunas de ellas.

Bonner y Pardue (1977) han discutido, también, sobre el concepto estructural de los "puffs", introduciendo un nuevo elemento, la **retención**, en los "puffs", de los RNAs sintetizados, durante un cierto periodo de tiempo. De esta forma, la amplia variación de tamaño detectada entre los distintos "puffs", desde los "micropuffs" a los anillos de Balbiani, dependería, además del área correspondiente a la secuencia codificadora, del área disponible para el almacenaje de los transcritos. El origen y la naturaleza de estas últimas regiones no se conoce todavía. Algunas ideas han surgido del estudio de los cromosomas politénicos de *Chironomus*. Los anillos de Balbiani de estos dípteros muestran una estructura característica de repeticiones agrupadas, lo cual supone un incremento local de DNA, posibilitando el almacenaje de la gran cantidad de RNPs que se detectan en tales estructuras.

3. ACTIVIDAD SECUENCIAL DE LA EXPRESION GENICA DURANTE EL DESARROLLO: PATRONES TEMPORALES DE "PUFFS".

Puesto que los "puffs" constituyen la manifestación morfológica de la actividad de los genes, es lógico pensar que la activación y represión de genes concretos durante el desarrollo de los individuos, debe reflejarse en los "puffs" de los cromosomas politénicos. Los trabajos de Beermann (1952) fueron los primeros en mostrar la especificidad de

ciertos "puffs" respecto del estado de desarrollo de los individuos, distinguiéndose unos patrones de "puffs" que cambiaban durante el desarrollo.

El estudio de los cambios en los modelos de formación de "puffs" ha sido exhaustivo en *Drosophila*, aunque limitado a un número reducido de especies: *D. melanogaster* y especies relacionadas (Becker, 1959; Ashburner 1967, 1969a,b,c,d, 1972); *D. hydei* (Berendes, 1965a); *D. virilis* (Kress, 1972) y *D. pseudoobscura* (Stocker y Kastritsis, 1972). Más recientemente se han llevado a cabo estudios en *D. subobscura* (de Frutos y Latorre, 1982a,b; Pascual et al., 1985). Todas estas especies forman parte de los dos subgéneros más importantes del género *Drosophila*, *Sophophora* y *Drosophila*.

En líneas generales, se deduce que los patrones de "puffs" de las distintas especies de *Drosophila*, muestran ciertas características comunes, que resumimos a continuación:

1.- Los "puffs" se forman en loci específicos en los cromosomas.

2.- La formación y regresión de la mayoría de los "puffs" ocurre siguiendo una secuencia muy precisa, siendo muchos de ellos activos sólo en estadios específicos del desarrollo.

3.- Existen dos períodos de máxima actividad en la formación de los "puffs", correspondiendo a los momentos que preceden a la formación de la prepupa (pupa blanca) y de la pupa.

En el tercer estadio temprano, las larvas muestran un patrón de "puffs" cualitativamente simple y estable. Esta situación cambia en los inicios de la prepupación, momento en el que los "puffs" activados tempranamente regresan y aparecen otros nuevos, siendo éste el período de máxima actividad, tanto respecto al número como al tamaño de los "puffs". Tras este período de intensa actividad, regresan muchos "puffs" y aparecen unos pocos nuevos durante las primeras horas del desarrollo prepupal.

El segundo período de intensa actividad es en prepupa tardía. Posteriormente el número y tamaño de los "puffs" disminuye, a medida que los procesos histolíticos se apoderan de la glándula. Pronto se vió que ambos picos de la actividad estaban controlados por una hormona, la ecdisona.

Becker (1959) fue el primero en sugerir que los cambios secuenciales observados en los patrones de "puffs", podían estar regulados por la ecdisona, la hormona responsable del crecimiento y la muda en los insectos. Los trabajos de Clever en *Chironomus* (ver Clever, 1964) fueron los más

importantes en este campo de la investigación. Como resumen de su labor destacamos dos de sus conclusiones más importantes: (1) La ecdisona induce rápidamente un número reducido de "puffs" ("puffs" tempranos), siendo tal inducción independiente de la síntesis proteica previa. (2) Existen otros "puffs", más numerosos, de inducción lenta ó retardada ("puffs" tardíos), cuya activación se ve afectada por los inhibidores de la síntesis proteica.

El mismo comportamiento fue demostrado en *Drosophila*. En este sentido, la investigación más completa se debe a Ashburner (ver las revisiones del autor de 1972, 1990 y la de Ashburner y Berendes de 1978), trabajando en *D. melanogaster*. Este autor encontró, además, que la inhibición de la síntesis proteica afectaba también a los "puffs" tempranos, pero impidiendo la regresión de los mismos.

Todas estas ideas fueron formalmente expresadas por Ashburner et al. (1974), proponiendo un modelo de acción para la ecdisona. Este modelo se basa en el efecto antagónico entre la ecdisona y los productos proteicos (P) de los "puffs" tempranos, sobre si mismos y sobre los "puffs" tardíos. La ecdisona tendría un efecto activador sobre los primeros y represor sobre los segundos, mientras que los P actuarían de forma contraria. A medida que éstos aumentasen en la célula, como consecuencia de la actividad de los "puffs" tempranos, competirían con el receptor de la ecdisona por los sitios de unión en los "puffs" tempranos y en los tardíos, desplazando al complejo hormona-receptor y, como resultado, desactivando a los genes tempranos e induciendo la expresión de los genes tardíos.

La primera consecuencia de la presencia de la ecdisona en el torrente circulatorio de los individuos, es la represión de los "puffs" responsables de la síntesis de las proteínas salivares ("puffs intermolt") y la inducción de los denominados "puffs" tempranos. Estos son de actividad transitoria, alcanzando su máximo desarrollo aproximadamente a las 4 horas desde la presencia de la hormona. Son responsables de su propia represión y de la inducción de un gran número de "puffs" que aparecen posteriormente siguiendo una secuencia temporal ordenada en un periodo de 12 horas ("puffs" tardíos). De esta forma, se explicarían los cambios observados en los "patrones de "puffs" durante el desarrollo larvario y prepupal de *Drosophila*.

La veracidad de este modelo está siendo demostrada, actualmente, por la utilización de técnicas moleculares. Recientemente han sido clonados dos de los "puffs" tempranos (74EF y 75B) y se han identificado sus productos como proteínas que se unen específicamente al DNA (Burtis et al., 1990; Thummel et al., 1990 y Segraves y Hogness, 1990). Parece ser que la represión del gen 74EF se debe al producto del gen 75B, lo cual está de acuerdo con el autocontrol de los "puffs" tempranos. El descubrimiento de que las proteínas del gen 75B son similares a los receptores

esteroides de los vertebrados, ha planteado un interrogante respecto a qué molécula se unen. Parece ser que no lo hacen con la ecdisona, postulándose que probablemente intervenga la hormona juvenil (Se Graves y Hogness, 1990) ya que ésta influye sobre la respuesta de la ecdisona durante el desarrollo.

Otra característica de los genes tempranos, es su gran tamaño, debido a que la mayor parte del DNA corresponde a intrones. Para Thummel et al. (1990), esta característica permitiría mecanismos de cronometraje en la expresión de dichos genes, obteniéndose una respuesta en cascada que haría posible la aparición secuencial de los "puffs" tardíos. Este modo de acción génica no parece ser tan novedosa en la regulación de los eucariotas. Actualmente, se sabe que otros sistemas génicos muestran mecanismos similares, como ocurre en el complejo *Antennapedia* de *Drosophila*.

4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXPRESION GENICA: "PUFFS" Y GENES DE CHOQUE TERMICO.

El efecto de la temperatura sobre la expresión génica fue observado, por primera vez, en *Drosophila*, al detectarse fuertes cambios en los patrones de "puffs", como resultado de breves tratamientos térmicos (Ritossa, 1962, 1964). La acción de incrementos rápidos e intensos, en la temperatura de desarrollo de los organismos, fue designada con el nombre de **choque térmico** y la reacción de los organismos frente a dicha acción, por **respuesta al choque térmico**.

En un principio, la respuesta fue estudiada solamente a nivel citológico, pero en tales trabajos se pusieron de manifiesto muchas de las características de este mecanismo biológico (revisión de Ashburner y Berendes, 1978): El choque térmico provoca la **inducción rápida y transitoria de un número reducido de "puffs"**, en los cuales se detecta la incorporación de uridina tritiada a los pocos minutos del "shock". Paralelamente, desaparecen los "puffs" desarrollo activos en el momento de iniciar el tratamiento, cesando la síntesis de RNA en dichos loci. Los "puffs" inducidos no son específicos ni del tejido, ni de la edad de los individuos afectados. Además tales "puffs" pueden aparecer, también, por acción de muchos agentes desacopladores de la fosforilación oxidativa y durante la recuperación de la anoxia.

La importancia de estos trabajos se puso de manifiesto, cuando el grupo de Tissières observó, que la inducción de los "puffs" de choque térmico coincidía con la síntesis de un número reducido de proteínas no presentes en los controles, y la represión de la síntesis de la mayoría de

las proteínas de desarrollo (Tissières *et al.*, 1974). A las proteínas inducidas por la temperatura se les llamó **proteínas de choque térmico** ó **hsps**.

A partir de entonces, se llevaron a cabo numerosas investigaciones encaminadas a identificar a los "puffs" observados por Ritossa, como los responsables de la síntesis de las hsps. Esta relación fue establecida al demostrar que los RNAm obtenidos en las condiciones inducidas, responsables de la síntesis de las proteínas de choque, en sistemas *in vitro* (McKenzie y Meselson 1977), hibridaban en los loci que formaban "puff" por efecto de los tratamientos térmicos (Spradling *et al.*, 1975; Bonner y Pardue, 1976). Con ello se concluía que dichos "puffs" contenían a los genes estructurales de choque térmico, denominados abreviadamente **HSPs**.

La respuesta al choque térmico es una de las reacciones biológicas más conservada en la Naturaleza, desde las arqueobacterias a las eubacterias, desde los eucariotas inferiores a las plantas y al hombre. Ha surgido como estrategia de los seres vivos, frente a los cambios físico-químicos (temperatura) que puede sufrir su medio ambiente. En los diferentes organismos, esta respuesta es inducida por temperaturas distintas, existiendo una estrecha relación entre ésta y la temperatura ambiental de desarrollo de los mismos. Para *Drosophila*, la inducción se da en el intervalo entre los 33°-37°C; en las bacterias termófilas, cuyo crecimiento normal es a 50°C, las temperaturas de choque se sitúan alrededor de los 60°C; para los peces de ambientes muy fríos, la inducción tiene lugar entre los 5-10°C.

En términos generales, esta respuesta se caracteriza por:

- 1.- La síntesis de nuevos RNAm, los RNAs de choque térmico, paralelamente a la reducción en la transcripción de la mayoría de los RNAs preexistentes.
- 2.- Un rápido reajuste de los polirribosomas, con la formación de nuevos polirribosomas que traduzcan los RNAm de choque, disminuyendo la síntesis proteica "normal" y acumulándose, en niveles muy altos, las proteínas de choque térmico.
- 3.- Un declive gradual en la síntesis de los RNAm de choque durante los tratamientos prolongados. Esto se traduce en una disminución, también, gradual de la síntesis de las proteínas de choque y la recuperación de las proteínas "normales" durante tales tratamientos.
- 4.- La adquisición de termotolerancia para combatir el efecto de las temperaturas letales.
- 5.- La localización específica de muchas hsps en el interior de la célula, durante los tratamientos térmicos y su desaparición en la recuperación.

6.- La inducción de la respuesta por otros muchos agentes estresantes, como el arseniato, algunos metales, drogas quelantes, etanol, etc. etc.

7.- Podemos añadir, además, que algunos HSPs son activos, también, en condiciones no inducidas durante el desarrollo, mientras para otros se han detectado genes afines, ("cognates" ó HSCs), que se expresan constitutivamente en condiciones normales.

De acuerdo con la opinión de Schlesinger (1990), el choque térmico se ha convertido en uno de los fenómenos científicos que ha atraído a un gran número de investigadores de todo el mundo, disponiéndose actualmente de una extensa literatura, desde todas las perspectivas posibles de la Biología. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en cuatro puntos importantes: la estructura y organización de los HSPs, su expresión en condiciones no inducidas, los mecanismos implicados en su regulación y las funciones de las hsps. Entre las revisiones más recientes señalar las de Neidhart *et al.*, 1984; Nover, 1984; Craig, 1985; Subjeck y Shyy, 1986; Lindquist, 1986, 1987; Bienz y Pelham, 1987; Pelham, 1986, 1988; Lindquist y Craig, 1988; Schlesinger, 1986, 1990; Nagao *et al.*, 1990; Pauli y Tissières, 1990; Young, 1990.

Clásicamente, se han distinguido tres familias génicas implicadas en el choque térmico, en base a la homología estructural de los miembros que las integran. Sus nombres hacen referencia a los pesos moleculares de las proteínas que codifican: HSP90, HSP70 y HSPs de las proteínas de bajo peso molecular.

Los genes de la familia HSP90 han sido identificados en todos los organismos eucariotas analizados, así como en *Escherichia coli*, y codifican para proteínas de peso molecular entre 83 y 90kd. Los análisis de secuencia, tanto de los genes como de sus proteínas, indican una gran conservación de esta familia en la escala biológica. Se calcula una identidad del 50% entre los eucariotas más alejados filogenéticamente y el 40% entre éstos y *E. coli* (Lindquist y Craig, 1988).

El número de miembros que integra esta familia varía para cada especie. Así en *D. melanogaster* se detecta un sólo gen HSP82 de copia única (Holmgren *et al.*, 1979), mientras en *Leishmania* hay, al menos, cuatro copias del gen HSP83 (Shapira y Pinelli, 1989) y en el ratón se han identificado tres copias HSP84 (Moore *et al.*, 1987). El genoma de *Sacharomyces cerevisiae* contiene los genes HSP83 y HSC83, que codifican proteínas similares, siendo el primer gen típicamente de choque, mientras el segundo muestra un patrón de expresión regulado durante el desarrollo (Lindquist y Craig, 1988). También se ha detectado, en plantas, la

presencia de genes "cognates" de la familia HSP90 (Nagao et al., 1990).

Las proteínas de choque térmico más abundantes tienen pesos moleculares entre los 68 y 74kd, constituyendo, junto con sus genes, la familia HSP70. Entre ellos el gen HSP70 codifica para la proteína más conservada evolutivamente, encontrándose en una gran variedad de organismos, incluyendo los procariotas. El gen *dnaK* de *E. coli* muestra un 48% de identidad en su secuencia respecto a la del gen HSP70 de *Drosophila* (Bardwell y Craig, 1984). La homología dentro de los eucariotas oscila desde el 50% a niveles superiores al 90%.

En todos los organismos eucariotas analizados en detalle, se ha visto que la familia HSP70 está formada por un conjunto de genes muy estrechamente relacionados. La complejidad de esta familia, así como el número de genes que la integran, difiere de unas especies a otras, siendo difícil hacer generalizaciones al respecto, a pesar del número de organismos investigados. Parte de esta dificultad se debe a la existencia de un número relativamente alto de genes afines o "cognates", que codifican constitutivamente, para proteínas estrechamente relacionadas con la hsp70.

Tampoco está muy clara la historia evolutiva de esta familia. En algunos casos, las similitudes son mayores entre determinados genes de distintas especies, que entre aquellos del mismo organismo. Esto sugiere la participación de mecanismos tempranos de duplicación génica, que han dado lugar a sistemas multigénicos, que se han mantenido con el paso del tiempo.

En *D.melanogaster*, la familia HSP70 está formada por tres tipos de genes: HSP70, HSP68 y los HSC1-7. El primero de ellos se encuentra entre 5-9 copias por genoma haploide, localizadas en los loci 87A (dos copias en orientación opuesta) y 87C (de 3 a 7 copias dependiendo de la cepa ó línea celular) (Schedl et al., 1978; Craig et al., 1979; Isch-Horowicz et al., 1979; Mirault et al., 1979). Tanto los análisis de restricción como los de secuencia, indican que las unidades de transcripción son prácticamente idénticas entre las copias del mismo loci y muestran un 4,2% de divergencia entre las copias de los dos loci (Karch et al., 1981). El gen HSP68 se localiza, como copia única, en el locus 95D y muestra un 15% de divergencia, con respecto al anterior (Holmgren et al., 1979; Craig et al., 1982). Además de estos genes, estrictamente inducidos por la temperatura, se distinguen, al menos, 7 "cognates" (HSC1-7) mapeados citológicamente en 70C, 87D, 10E, 88E, 50E y 5C, respectivamente. (en Lindquist y Craig, 1988). Se calcula una identidad del 80% entre cualquier HSC y el gen HSP70, así como entre dos HSCs diferentes.

La mayoría de los organismos sintetizan una ó más proteínas de bajo peso molecular, entre los 15 y 35 kd. Esta familia se caracteriza por ser especialmente heterogénea,

tanto respecto al número como al tamaño de las proteínas que la integran. En levaduras, se ha identificado una proteína de choque de 26kd (Craig *et al.*, 1982); en *Drosophila* se detectan entre 2 a 8 polipéptidos diferentes (Lindquist y Craig, 1988), mientras las plantas son los organismos que sintetizan un mayor número de ellas, entre 15-30 según la especie. (Nagao *et al.*, 1990).

Generalmente, las distintas proteínas que forman esta familia, muestran mayor similitud entre sí, dentro de una misma especie, que entre especies diferentes. En soja se calcula una homología del 90% entre algunas de las hsps de bajo peso molecular, las cuales muestran una identidad de sólo el 20% respecto a las de *D. melanogaster* (Lindquist y Craig, 1988).

Por el momento no se ha descrito, en *E. coli*, ninguna proteína homóloga para esta familia. Sin embargo en *Mycobacterium leprae*, se ha identificado un antígeno de 18kd, con cierta identidad con las hsps de bajo peso molecular de los eucariotas. Este descubrimiento sugiere un origen bastante antiguo, también, para esta familia.

Recientemente ha sido considerada una cuarta familia de proteínas de choque térmico (HSP60), que incluye a la proteína bacteriana GroEL, a una proteína típicamente mitocondrial de los eucariotas y a otra muy abundante de los cloroplastos, que se une específicamente a la subunidad grande de la proteína Rubisco (Garbe *et al.*, 1989). Todas ellas se expresan constitutivamente, pero su nivel aumenta de 2-3 veces tras choque térmico. Se postula, para estas proteínas, un papel esencial en el ensamblaje de complejos multiméricos funcionales.

Por último, señalar la presencia, tanto en eucariotas como en procariotas, de otras muchas proteínas inducidas por el choque térmico. Generalmente, se trata de proteínas que se sintetizan en menor cantidad que las hsps clásicas, ó están restringidas a ciertos organismos, a determinados tipos celulares de un mismo organismo ó incluso a estadios de desarrollo particulares. Es lógico pensar que las células muy especializadas induzcan la síntesis de proteínas específicas, debido al efecto patológico particular que el choque térmico puede provocar en ellas. Estas proteínas han sido muy poco estudiadas y actualmente se empieza a abordar su funcionalidad.

A pesar de la gran conservación de la respuesta, de los diferentes organismos, al estrés térmico, su regulación difiere de unos a otros. En *E. coli* y levaduras, la respuesta es controlada principalmente a nivel de transcripción, mientras en *Drosophila*, células de mamíferos y plantas, la regulación se da tanto transcripcional como traduccionalmente (ver Lindquist, 1896 y Nagao *et al.*,

1986). Estas diferencias se explican porque los RNAm muestran una vida media distinta para cada especie (de varios minutos en *E. coli*, hasta varias horas en *Drosophila* y plantas), de ahí que los mecanismos de regulación deban actuar a diferentes niveles, según el organismo, para asegurarse, en todos los casos, una rápida y elevada síntesis de hsp.

En la regulación transcripcional de los genes de choque de los eucariotas, hay que destacar el papel de dos componentes principales: **elementos actuando en cis y factores positivos actuando en trans** (Corces *et al.*, 1981; Mirault *et al.*, 1982; Pelham y Bienz, 1982; Parker y Topol, 1984; Wu, 1984). Al comparar las regiones promotoras de diferentes genes de choque, se reconoció una secuencia *consensus*, a todas ellas, con simetría palindrómica (C--GAA--TTC--G), situada a la izquierda de la región TATA. Esta secuencia era necesaria para la activación de los HSPs y recibió el nombre de **elemento de choque térmico (HSE)** (Bienz 1985; Pelham 1985).

La estructura, el número de copias y la posición de los HSEs dentro de las regiones promotoras, juegan un papel muy importante en la inducción de los HSPs. En *Drosophila*, se ha demostrado que se necesitan varios HSEs para conseguir una fuerte inducción de los HSPs y esta necesidad aumenta si tales elementos están alejados de la región TATA. Todos ellos actúan de forma sinérgica, entre sí y con la región TATA, independientemente de su situación (en Bienz y Pelham, 1987).

Por otro lado, se sabe que el **factor de choque térmico (HSF)** está presente constitutivamente en las células, pero de forma inactiva, siendo activado rápidamente tras el aumento de la temperatura. Se ha propuesto que dicha activación se da por medio de un mecanismo de fosforilación (en Nagao *et al.*, 1990), permitiendo una interacción más eficiente entre el factor y el elemento, formándose un complejo de transcripción estable que puede ser reconocido por la RNA polimerasa (Bienz y Pelham, 1987).

En *E. coli* el factor de transcripción es un isómero del factor σ de la RNA polimerasa, conocido por σ^{32} (ver Lindquist, 1986).

La transcripción de los genes de choque térmico está regulada, también, de forma negativa, por los propios productos de dichos genes. Se habla, pues, de **una respuesta autorregulada**. En este esquema, la hsp70, no solamente tendría un papel protector frente a las altas temperaturas, sino también en la restauración del patrón de síntesis proteica normal durante la recuperación, al interferir con el factor de transcripción HSF (Lindquist y Craig, 1988)

Es del conocimiento general, que tras choque térmico, se produce la síntesis masiva de nuevos RNAm, los RNAm de choque. Estos son traducidos preferentemente por los

ribosomas, mientras los RNAm preexistentes, coexisten en la célula, sin ser degradados en su mayor parte, pero sin ser traducidos a proteína. Desde estos descubrimientos, los diferentes investigadores se han preocupado por determinar qué mecanismos están implicados, a este nivel, en la discriminación entre los dos tipos de RNAm. Hasta la fecha, las evidencias experimentales apoyan, por una parte, la existencia de secuencias de reconocimiento específicas en el extremo 5' de los mensajeros de choque térmico y de segmentos no traducidos en 3' que le confieren estabilidad. Por otra, la de un factor celular necesario para la traducción de los mensajeros "normales" (consultar la revisión de Lindquist, 1987). Glover (1982) ha sugerido que la proteína ribosómica S6, en *Drosophila*, podría ser dicho factor, puesto que sufre un proceso de defosforilación, inmediatamente después de los aumentos de temperatura.

En párrafos anteriores ya se ha mencionado que la expresión de muchos genes de choque térmico no está restringida solamente a las condiciones de estrés. Los trabajos en *Drosophila* son concluyentes respecto a que los genes HSP83 y aquellos que codifican para las proteínas de bajo peso molecular, son, también, activos en ciertos estadios del desarrollo. Por otra parte, en la familia HSP70, cuyos genes son activos únicamente durante el estrés, se han descrito una serie de genes homólogos (HSC1-7), que se expresan en condiciones normales de temperatura (ver revisión de Pauli y Tissières, 1990). Estos cognates muestran, en su expresión, distintos patrones temporales y espaciales. Lo mismo ocurre para los HSPs de las proteínas de pequeño tamaño, ya que en ausencia de estrés térmico, no parecen tener una regulación coordinada durante el desarrollo de *Drosophila*, a excepción del inicio del periodo pupal, momento en el cual se expresan todos ellos. En algunos tejidos, la hsp83 es probablemente una de las proteínas más abundantes en condiciones normales (en las glándulas salivares de las larvas de tercer estadio y de prepupas), mientras en otros el gen no muestra actividad. Podemos concluir, pues, que a diferencia de lo que ocurre durante el choque térmico, en las condiciones normales, la expresión de los HSPs está restringida a ciertos tejidos en determinados momentos del desarrollo.

Parece ser que la regulación de los HSPs durante el desarrollo, se debe a mecanismos hormonales. Las evidencias experimentales indican que los genes de las proteínas de bajo peso molecular, están controlados por la ecdisona (Ireland y Berger, 1982; Ireland et al., 1982). Los elementos reguladores inducidos por la hormona, son diferentes a los HSE (Pauli et al., 1986; Xiao y Lis, 1989) y muestran diferencias según el gen y el tejido donde se expresen. Ello puede ser consecuencia de la regulación no coordinada de los HSPs en condiciones no inducidas.

Las investigaciones sobre las posibles **funciones de las hsps** han progresado, al menos, en dos aspectos: la asociación de estas proteínas con la adquisición de tolerancia al estrés térmico y el posible papel bioquímico de cada una de ellas.

La **termotolerancia** se define como la capacidad de un organismo para resistir un tratamiento térmico normalmente letal, una vez pretratado con choques térmicos moderados. Generalmente, las condiciones térmicas que conducen al desarrollo de termotolerancia, son también condiciones óptimas para la inducción de la síntesis de hsps. Muchas son las evidencias experimentales que han demostrado la correlación positiva entre la cantidad de hsps sintetizadas y el grado de tolerancia térmica que muestra un organismo (Neidhardt *et al.*, 1984; Lindquist, 1986; Nagao *et al.*, 1986).

En los últimos años, se ha logrado un gran progreso en la determinación de **actividades bioquímicas específicas de las hsps** (revisión de Schlesinger, 1990). Las proteínas de choque térmico de las familias HSP90, HSP70 y HSP60, tienen como misión esencial, la de proteger y recuperar las funciones de varios complejos proteicos celulares, durante el estrés térmico. De acuerdo con su modo de acción, Pelham (1986), propuso que tales proteínas actúan de forma similar al de un "**chaperone**" molecular, es decir, uniéndose a otras proteínas para conseguir su estabilización, disgregando complejos proteicos dañados por el calor, estabilizando membranas, permitiendo el reensamblaje de las estructuras celulares durante la recuperación, etc, etc. Este nuevo concepto surge de los estudios sobre la funcionalidad de las hsps en condiciones normales no inducidas por el estrés.

Las hsps de bajo peso molecular también tienen un papel protector durante el choque térmico (Nover *et al.*, 1989). Forman agregados citoplasmáticos, concentrados en la región perinuclear, que contienen los RNAm "normales" que no son traducidos en tales condiciones.

Hay, además, otro grupo de proteínas de choque térmico cuya misión es eliminar a las proteínas celulares desnaturalizadas o afectadas, de alguna forma, por el calor. De esta manera, se evita la posible toxicidad de la acumulación de proteínas deterioradas. Todas las células eucariotas utilizan para esta función una proteína de pequeño tamaño, muy conservada, llamada **ubiquitina**.

La síntesis de proteínas de choque térmico es inducida, además de por los incrementos de temperatura, por una gran variedad de agentes, tales como el etanol, drogas quelantes, metales, recuperación de la anoxia, etc. etc. Sus acciones sobre la expresión génica fueron observadas, igualmente, por la aparición de los "puffs" de choque térmico en los cromosomas politénicos de *Drosophila*. Entre la larga lista de agentes estresantes, merece especial atención un número reducido de ellos que tienen poco en común, la benzamida, vitamina B6, colchicina y el paracetamol. Tales agentes tienen la capacidad de inducir específicamente sólo uno de los "puffs" de choque térmico, en todas las especies de *Drosophila* analizadas (Lakhotia, 1987). Actualmente se le conoce por el locus que codifica para el RNA de choque térmico omega (hsrw), un locus cuyo producto parece actuar fundamentalmente como RNA (Bendena et al., 1989).

Al igual que otros "puffs" temperatura, el locus hsrw es importante, tanto en las células estresadas, como en aquellas no afectadas por el agente inductor. En *D. melanogaster*, constituye, además, un "puff" desarrollo inducible por la ecdisona ("puff" temprano), característico de las larvas del tercer estadio tardío (Ashburner, 1967), aunque también se han detectado sus transcritos en otros estadios larvarios y del adulto (Hovemann et al., 1986; Garbe y Pardue, 1986).

Su organización genómica es muy diferente a la de los otros genes de choque térmico. La unidad de transcripción es algo mayor de 10kb y consta de una región única de 3kb en el extremo 5', seguida de unidades repetidas que se extienden a lo largo de 8-25kb, dependiendo del alelo. Estas repeticiones parecen ser características del locus y la longitud de cada unidad varía entre las distintas especies. Garbe et al., (1989) han identificado señales HSE a la izquierda del inicio de transcripción. Todavía no se han estudiado otros elementos reguladores que respondan a los otros inductores de este gen.

El análisis detallado del locus hsrw, así como su funcionalidad acaba de empezar. Hasta la fecha se sabe que su estructura característica se ha mantenido dentro del género *Drosophila*, aunque la secuencia ha divergido muy rápidamente de unas especies a otras (Garbe et al., 1989). Las mayores homologías se detectan en una corta región de 60 pb en el intrón, implicada en el procesado del RNA. Los autores que están trabajando en este campo piensan que, al igual que los HSPs, este gen debe ser también característico de muchos otros organismos (en Pardue et al., 1990).

5. LOS CROMOSOMAS POLITENICOS EN LOS ESTUDIOS FILOGENETICOS DE *DROSOPHILA*.

Los trabajos de Painter (1933, 1934) abrieron una nueva era en el estudio comparativo de los cromosomas, especialmente entre los cromosomas de las especies emparentadas. Los cromosomas politénicos de las glándulas salivares se convirtieron en el material biológico más idóneo para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre las especies del género *Drosophila*. Las ventajas que ofrecen estos cromosomas, en los estudios sistemáticos, son dos: (1) la amplificación de los detalles de su estructura, es decir, presentar un patrón de bandas característico; (2) el exacto apareamiento de los cromosomas homólogos en muchas especies.

Los primeros estudios se basaron en determinar las diferencias, en los patrones de bandas, entre los cromosomas de las diferentes especies, generalmente debidas a inversiones paracéntricas, pericéntricas y más raramente a translocaciones. Cada uno de estos cambios se origina por roturas en los cromosomas, siendo posible localizar los puntos de rotura si se dispone de un buen material citológico. En la práctica, en los estudios comparativos, se elige a una especie como representante (estándar) de todas las que pertenecen a un mismo grupo, y cada una de ellas es comparada con la estándar para determinar el grado de similitud entre sus cromosomas. Cuando es posible obtener individuos híbridos, los análisis comparativos son más sencillos, valiéndose de los cromosomas híbridos para estudiar las diferencias entre las secuencias de cada especie. El grado de homología entre la secuencia estándar y aquella que se desea analizar, viene determinado por el porcentaje de regiones que muestran apareamiento ó sinapsis. Tales porcentajes se dan en unidades de longitud.

La mayoría de las filogenias se han llevado a cabo entre las especies de un mismo grupo, ya que los cromosomas de las especies más alejadas han sufrido un mayor número de cambios, siendo sólo posible, en algunos casos, la comparación en determinados segmentos cromosómicos. En base a estos estudios se han establecido las filogenias de las especies del grupo *obscura*, *repleta*, *robusta-melanica*, *virilis*, *willistoni*, *melanogaster* y *drosophilas* hawaianas. La investigación sobre evolución cromosómica ha sido revisada, más recientemente, por Clayton y Guest (1986), donde encontramos las referencias correspondientes a los estudios de cada grupo en particular.

A pesar del gran número de estudios que se han llevado a cabo sobre las secuencias que forman "puff" en *Drosophila*, muy pocos de ellos realizan un análisis comparativo de los modelos de formación de "puffs" entre especies emparentadas

ó entre cepas de la misma especie. Los más exhaustivos corresponden a las especies del grupo *melanogaster*.

Ashburner (1969a,b,d,) compara los patrones temporales de "puffs" entre las especies gemelas *D. melanogaster* (cepa Oregón R) y *D. simulans* (cepa Berkeley), encontrando una gran homología entre ambos. De los "puffs" comunes, el 52,5% son similares en tamaño y tiempo de desarrollo; 18,5% tienen tiempos de desarrollo diferente; 17% muestran diferencias en el tamaño medio y el 12% difieren en ambas magnitudes. Solamente un "puff" de *D. melanogaster* (46A), no se ha observado en *D. simulans* y dos "puffs" característicos de ésta especie (4F1-4 y 7B1-3), no se detectaron en *D. melanogaster*. Este mismo autor (1969c,d), compara también los modelos de "puffs" entre las cepas Oregón R y Vg6 de *D. melanogaster*. Encuentra una similitud del orden del 64% y que solamente un "puff", el 64C, es activo en una de las cepas. Estas observaciones indicaron que las diferencias en el patrón de "puffs" de dos cepas de la misma especie, eran de la misma magnitud que las detectadas entre dos especies gemelas.

Para especies más alejadas a *D. melanogaster* (especies del complejo *yakuba* del subgrupo *melanogaster*: *D. yakuba*, *D. teissieri* y *D. erecta*), Ashburner y Lemeunier (1972) encontraron que la secuencia básica de los cambios en la actividad de los "puffs" era similar. Incluso en *D. takahashii*, especie aún más alejada, Ashburner reconoció algunas de las características de los modelos de "puffing" de *D. melanogaster* (en Ashburner y Berendes, 1978).

Scouras y Kastritsis (1984) determinaron el patrón de "puffs" de *D. auraria*, especie del grupo *melanogaster* pero perteneciente al subgrupo *montium*. Los autores tuvieron dificultades en establecer homologías en las secuencias de bandas entre los cromosomas de esta especie y los de *D. melanogaster*, siendo sólo posible correlacionar un número reducido de "puffs" en el brazo 3L.

También se han llevado a cabo estudios comparativos entre cepas de *D. melanogaster*, portadoras de aberraciones cromosómicas, tales como inversiones, translocaciones y deleciones (Ashburner, 1972). La conclusión general que se obtiene es que los patrones de "puffs" son esencialmente similares al modelo estándar. Sin embargo, más recientemente, los trabajos de Latorre et al. (1988a), han revelado la existencia de una expresión diferencial entre distintas cepas de *D. subobscura*, que se explican por la combinación de dos efectos distintos, efecto de inversión y efecto geográfico, cuyo peso depende de cada cromosoma. Debido al efecto de posición, resultado de las inversiones paracéntricas, se han obtenido diferencias en la expresión de los "puffs" de los cromosomas A y E, mientras que las actividades de los cromosomas J y O están relacionadas con el efecto geográfico, no descartándose la acción de ambos efectos para el cromosoma U.

Lychev (1965) analizó los "puffs" de dos cepas salvajes de *D. melanogaster*, Novosibirsk y Batumi, y de una línea

consanguínea derivada de la población de Batumi. Observó muchas diferencias en las actividades de los "puffs", deduciendo, como más sobresaliente, que la **consanguinidad conduce a una depresión general de la actividad**, especialmente en el cromosoma X. Un efecto similar es descrito por de Frutos *et al.* (1984), al comparar los patrones de "puffs" entre una cepa salvaje de *D. subobscura* y una cepa de laboratorio, de esta misma especie, con 228 generaciones de cruzamientos entre hermanos.

La repuesta de los cromosomas politénicos al choque térmico se caracteriza por ser fundamentalmente poco variable. Los tratamientos térmicos inducen idénticos "puffs" en todas las cepas examinadas de *D. melanogaster* y *D. simulans* (Ashburner, 1972) y en las especies estrechamente relacionadas (Ashburner 1970; Ashburner y Lemeunier, 1972; Berendes, 1965b). Incluso el mutante l(2)gl de *D. melanogaster*, que muestra ausencia total de actividad en el último estadio larvario, responde al choque térmico de forma similar a la cepa salvaje de esta especie (Ashburner, 1970). Pascual *et al.* (1987) obtiene los mismos resultados al analizar varias cepas de *D. subobscura*. Estos autores concluyen que ni la distinta procedencia geográfica de las cepas, ni sus distintas ordenaciones cromosómicas, afectan a la respuesta al choque térmico, ni siquiera en aquellos "puffs" localizados en zonas próximas a los puntos de rotura de las inversiones, en los que podría esperarse efecto de posición. Según estos mismos autores, tampoco la consanguinidad afectó a la expresión de los "puffs" temperatura.

Esta gran conservación de la respuesta frente al estrés térmico constituye **una nueva herramienta en los estudios filogenéticos de *Drosophila***. Los "puffs" temperatura se convierten en buenos marcadores citológicos facilitando el estudio de los patrones de bandas entre especies relacionadas, incapaces de cruzarse. Por otro lado, la localización de los HSPs en dichos "puffs", nos permite identificar los elementos cromosómicos entre las especies más alejadas filogenéticamente, cuyos cromosomas están más diferenciados estructuralmente y, además, nos dan información sobre la evolución de esta familia multigénica.

Respecto a este último punto, pocos son los trabajos que se han llevado a cabo, a pesar del gran número de investigadores que se han preocupado por el estudio de la respuesta al choque térmico. La mayor parte de la información procede, como es habitual, del grupo *melanogaster*. La organización genómica de los HSPs en estas especies, se caracteriza por mostrar un sólo gen HSP82, mientras las familias HSP70 y aquella que codifica para las hsp's de pequeño tamaño, forman complejos multigénicos. Brown e Ish-Horowicz (1981) detectaron, en estas especies, duplicación del locus HSP70, al igual que lo hicieron Pierce y Lucchesi (1980) en *D. pseudoobscura*. Con tales resultados

se especuló respecto a que esta organización de los HSPs estaría en las formas ancestrales de la radiación *Sophophora*, a partir de la cual derivaron los linajes *melanogaster* y *obscura*. Sin embargo, los resultados de Peters *et al.*, (1980) no están de acuerdo con dicha hipótesis, al no encontrarse duplicación del locus HSP70 en *D. hydei*, especie de aparición posterior a la radiación *Sophophora*. Esta aparente contradicción podría resolverse analizando otras especies del género, siendo interesante estudiar aquellas pertenecientes al grupo *obscura*.

La localización de genes, mediante hibridación *in situ*, en los cromosomas politénicos, se ha convertido en uno de los métodos más poderosos, aplicables a los estudios filogenéticos de *Drosophila* (Steinemann, 1982; Steinemann *et al.*, 1984; Felger y Pinsker, 1987; Loukas y Kafatos, 1986; Whiting *et al.*, 1989; Terol *et al.*, 1991). La complementariedad requerida para la hibridación cruzada entre ácidos nucleicos, en las condiciones *in situ*, es tan alta que cuando dos loci cromosómicos reacciona con las mismas sondas, se puede asumir con certeza que son homólogos.

Ultimamente, los estudios comparativos respecto a la localización de determinados elementos transponibles, nos dan, también información sobre la similitud ó diferencias, a nivel molecular, entre los genomas de especies diferentes. Los resultados obtenidos de estos trabajos, muestran que hay una mayor variación, en la localización de tales elementos, entre cepas distintas que dentro de la misma cepa. Esto podría interpretarse como un mecanismo más de diferenciación de los genomas a nivel molecular.

A medida que han ido aumentando los estudios comparativos entre las distintas especies, se ha hecho necesario establecer una nomenclatura común a todas ellas, puesto que en cada una de las especies analizadas, los cromosomas politénicos han ido nombrándose de formas diferentes. Ya en 1940 Muller fue consciente de este problema, proponiendo que los cinco brazos cromosómicos fundamentales y el cromosoma puntiforme de los drosophilidos, fueran designados como elementos A, B, C, D, E y F, respectivamente (Muller, 1940, citado en Clayton y Guest, 1986). Por definición, cada uno de estos elementos corresponde a los cromosomas X, 2L, 2R, 3L, 3R y 4, respectivamente, de *D. melanogaster*, siendo ésta la especie utilizada como modelo.

La propuesta de Muller fue posible gracias a los mapas de ligamiento de la época, de los que se deducía que tales elementos parecían mantenerse durante la evolución de la familia *Drosophilidae*. Lógicamente, a lo largo de la escala evolutiva, pudieron darse cambios en el orden de los genes dentro de cada elemento, así como la posibilidad de que dos de ellos se fusionasen para originar un cromosoma único,

explicándose, de esta manera, la diversidad que actualmente encontramos en los cariotipos. Hoy en día, sabemos que los elementos de Muller han mantenido su estructura genética más allá de los drosophilidos, siendo reconocidos en *Lucilia*, *Musca* y *Ceratitis* (Malacrida et al., 1985).

6. *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, EN EL CONTEXTO DEL GRUPO *OBSCURA* DEL GENERO *DROSOPHILA*.

El grupo *obscura*, junto con los grupos *melanogaster* y *saltans-willistoni*, surge a partir de una de las principales radiaciones evolutivas del género *Drosophila*, la radiación *Sophophora*. Las especies que integran el grupo *obscura* se distribuyen principalmente por toda la zona templada del hemisferio norte (con algunas excepciones, entre las que cabe destacar la reciente descripción de algunas especies Afro-Tropicales), asociadas a los bosques templados de estas regiones.

Actualmente hay aceptadas 35 especies en el grupo (Bächli, 1989), cuyas relaciones filogenéticas ha permitido establecer 4 subgrupos: subgrupo *obscura*, subgrupo *affinis*, subgrupo *pseudoobscura* y subgrupo *microlabis*.

Mientras que del subgrupo *affinis* se han encontrado 9 especies americanas (*D. affinis*, *D. algonquin*, *D. athabasca*, *D. azteca*, *D. dobzhanskii*, *D. narragansett*, *D. novitskii*, *D. seminole* y *D. tolteca*), una europea (*D. helvética*) y otra de la región afrotropical (*D. inexpectata*), el subgrupo *obscura* ha experimentado mayor diversificación en el Viejo Mundo, en donde se han descrito 14 especies Palearcticas (*D. alpina*, *D. ambigua*, *D. bifasciata*, *D. eniwaie*, *D. epiobscura*, *D. eskoi*, *D. guanche*, *D. imaii*, *D. madeirensis*, *D. obscura*, *D. subobscura*, *D. subsilvestris*, *D. tristis* y *D. tsukubaensis*). Al subgrupo *pseudoobscura*, tradicionalmente incluido en el subgrupo *obscura*, pertenecen 6 especies americanas, todas ellas de distribución Neártica (*D. cuauhtemoci*, *D. frolovae*, *D. lowei*, *D. miranda*, *D. persimilis* y *D. pseudoobscura*). Las especies Afro-Tropicales *D. microlabis*, *D. kitumensis*, *D. cariouae* y *D. kimbasi* han sido recientemente agrupadas en un nuevo subgrupo, el subgrupo *microlabis* (Cariou et al, 1988).

Las relaciones filogenéticas propuestas en el grupo *obscura* están basadas fundamentalmente, en datos morfológicos (Buzzati-Traverso y Scossiroli, 1955; Lakovaara y Keranen 1980), citológicos (Sturtevant y Novitski, 1941; Dobzhasky y Epling, 1944) y bioquímicos, referentes al polimorfismo alélico que presentan las especies para cierto número de enzimas y proteínas detectadas electroforéticamente (Lakovaara et al, 1972; Marinkovic et al, 1978; Lakovaara y Saura, 1982; Cabrera et al, 1983 y



Loukas *et al.*, 1984; Cariou *et al.*, 1988). Actualmente los estudios sobre la variabilidad mostrada por el DNA mitocondrial han contribuido a esclarecer ciertas ambigüedades presentes en los árboles filogenéticos (Latorre *et al.*, 1988b; González *et al.*, 1990).

Drosophila. subobscura es una de las especies del grupo *obscura* más común y ampliamente difundida. Su área de distribución abarca prácticamente toda Europa, norte de África, Próximo Oriente asiático, Islas Canarias, Madeira y Azores. Es una especie típicamente Paleártica que ahora también se halla en el continente americano, tanto en la región Neotropical (Brncic *et al.*, 1981) como en la Neártica (Beckenbach y Prevosti, 1986).

Su cariotipo formado por cuatro pares de autosomas acrocéntricos, los cromosomas X e Y también acrocéntricos y un par de cromosomas puntiformes, está considerado como el más primitivo del grupo y del género *Drosophila* (Patterson y Stone, 1952). Sus cromosomas politénicos se designan por las letras A, U, E, J, O y D, (Mainx *et al.*, 1953) siendo el A el cromosoma X y el D el puntiforme. Corresponden respectivamente con los elementos de Muller A, B, C, D, E y F (Steinemann *et al.*, 1984; Lakovaara y Saura, 1982). Posee, además, un extraordinario polimorfismo cromosómico de inversiones paracéntricas que afectan a todos los cromosomas, con excepción del puntiforme.

Monclús (1976, 1984) describe dos nuevas especies de *Drosophila*, morfológicamente muy parecidas, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Ambas son endémicas, respectivamente, de las islas de Tenerife y Gran Canaria del archipiélago Canario y de la isla de Madeira, asociadas a un tipo particular de flora, la laurisilva. Esta constituye uno de los últimos reductos de una asociación de Lauráceas que durante el Terciario había poblado los bosques de parte de Europa. Ambas especies han sido incluidas en el grupo *obscura* de *Drosophila* (Monclús, 1976, 1984; Prevosti, 1976).

El cariotipo de *D. madeirensis* es similar al descrito en *D. subobscura*, con 5 pares de cromosomas acrocéntricos y un par de cromosomas puntiformes. La diferencia más notable entre ambos, es el mayor tamaño de los cromosomas de *D. madeirensis* debido a una mayor cantidad de heterocromatina centromérica (Batchmann *et al.*, 1989; Papaceit y Prevosti, 1989). El complemento cromosómico de *D. guanche* difiere poco del de estas especies, distinguiéndose entre los autosomas, dos pares de cromosomas subacrocéntricos y el cromosoma Y de los individuos machos es puntiforme en vez de ser acrocéntrico (Prevosti, 1976). Al igual que en *D. madeirensis*, los cromosomas de *D. guanche* contienen mayores cantidades de heterocromatina que los de *D. subobscura* (Batchmann *et al.*, 1989).

Los cromosomas politénicos de las tres especies constan de 5 brazos y un pequeño cromosoma, mostrando una gran

similitud estructural en sus patrones de bandas, de ahí que se aplique la nomenclatura de *D. subobscura* para designar a los cromosomas politénicos de *D. guanche* y *D. madeirensis* (Krimbas y Loukas, 1984; Moltó et al, 1987; Papaceit, 1988). Mientras *D. subobscura* presenta un rico polimorfismo cromosómico para inversiones en poblaciones naturales, *D. guanche* y *D. madeirensis* parecen ser especies monomórficas (Moltó et al, 1987, Papaceit, 1988).

Las filogenias más recientes incluyen ya a las especies *D. guanche* y *D. madeirensis*, poniéndose de manifiesto su proximidad a *D. subobscura*, formando las tres un grupo bien diferenciado del resto de especies Paleárticas del subgrupo *obscura*. El éxito en los experimentos de hibridación corroboran la proximidad filogenética entre estas especies. Krimbas y Loukas (1984) obtienen híbridos adultos en cruces entre *D. madeirensis* y las especies *D. subobscura* y *D. guanche*, únicamente cuando *D. madeirensis* es la especie materna. Papaceit (1988) obtiene progenie adulta entre *D. subobscura* y *D. madeirensis* en ambas direcciones, si bien cuando la especie materna es *D. madeirensis* hay una mayor descendencia, con hembras fértiles y machos estériles.

Los dendrogramas obtenidos, a partir de los datos aloenzimáticos están de acuerdo con la estrecha relación existente entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, sin embargo, difieren en cuál es el par de especies de la triada más próxima filogenéticamente. Así Cabrera et al (1983) y Cariou et al (1988) obtienen que *D. madeirensis* y *D. guanche* poseen la menor distancia genética, mientras que Loukas et al (1984) y Larruga y Pinsker (1984) obtienen una distancia menor para la pareja *D. subobscura* y *D. madeirensis*. Otros estudios con estas tres especies, basados en la obtención de híbridos interespecíficos y el análisis cromosómico (Krimbas y Loukas, 1984; Felger y Pinsker, 1987), ó en la variabilidad del DNA mitocondrial (González et al., 1990) parecen favorecer la hipótesis de que *D. subobscura* y *D. madeirensis* están más próximas filogenéticamente.

OBJETIVOS

Los cromosomas politénicos de *Drosophila* se han convertido en uno de los materiales más idóneos para el estudio de la expresión génica en eucariotas, al permitir la localización de los genes y la visualización de su actividad.

Es evidente que los "puffs" de los cromosomas politénicos representan genes activos, por tanto la activación y regresión de genes concretos durante el desarrollo, debe reflejarse en los patrones de "puffs" de dichos cromosomas. Asimismo, la acción particular de agentes estresantes sobre la expresión génica, puede ser observada por los cambios producidos en los "puffs".

Bajo esta perspectiva, nuestro grupo de investigación inició el estudio de la expresión génica en *Drosophila subobscura*, determinando los modelos temporales de "puffs" como estima de la expresión secuencial de los genes durante el desarrollo y cómo estos modelos pueden verse afectados por los incrementos de la temperatura ambiental.

El presente trabajo se enmarca dentro de esta línea de investigación, extendiendo tales estudios a otras dos especies del grupo *obscura*, de reciente descripción, *Drosophila guanche* y *Drosophila madeirensis*.

La determinación de los patrones de puffs desarrollo en especies muy relacionadas filogenéticamente, permite:

- 1.- Comprender mejor el significado de dichos patrones, constatando la funcionalidad de los "puffs" como representantes de la actividad de los genes.
- 2.- Identificar aquellos loci sometidos a un mismo control génico frente aquellos otros que muestran expresión diferencial entre las especies.
- 3.- Cuantificar la distancia filogenética entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, empleando una metodología nueva en el campo de la Sistemática: la expresión génica. Se aportará nueva información, respecto a la discusión actual, sobre qué par de especies de la triada está más próxima filogenéticamente.

Un segundo objetivo general, ha sido la caracterización, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, de la respuesta frente al choque térmico.

El trabajar con tres especies filogenéticamente próximas, nos permite, de nuevo, profundizar más en esta investigación:

1.- Confirmando el carácter homeostático de este mecanismo.

2.- Determinando la propia evolución de los genes de choque térmico en el contexto del género *Drosophila*.

Este estudio se ha abordado a tres niveles:

- CITOGENETICO, mediante el análisis de los cambios sufridos por los patrones de "puffs" tras los tratamientos térmicos, identificando aquellos loci inducidos, preferentemente, por la temperatura ("puffs"-temperatura).

Mediante la aplicación de técnicas autorradiográficas hemos monitorizado la actividad transcripcional en dichas regiones, precisando mejor el conjunto de los "puffs"-temperatura.

- BIOQUIMICO, analizando los patrones de síntesis proteica en las condiciones inducidas, determinando el conjunto de proteínas de choque térmico (hsps), en estas especies.

Los patrones de "puffs" y los de hsps, en *D. subobscura*, han sido previamente analizados por Pascual y de Frutos (1986, 1988) y Pascual *et al.* (1987). El resto de los estudios llevados a cabo en esta especie son originales del presente trabajo.

- MOLECULAR, al identificar y localizar en ciertos "puffs"-temperatura, a los genes (HSPs) responsables de la síntesis de las proteínas de choque. Para ello nos hemos servido de la técnica de hibridación *in situ*. Además, hemos realizado una primera caracterización molecular de tales genes, obteniendo información respecto al número de copias y/o genes de cada familia HSP, a sus estructuras y a su posible organización dentro del genoma de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, en base al conocimiento existente sobre esta familia multigénica en otras especies de *Drosophila*.

Por último, hemos abordado el estudio del efecto de otros agentes estresantes sobre la acción de los genes. Concretamente se trata de la benzamida y el paracetamol. Con ello se pretende identificar entre los "puffs" de choque térmico de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, aquel que constituye, en estas especies, el locus *hsrw* característico de *Drosophila*.

MATERIAL Y
METODOS

1.- CEPAS UTILIZADAS.

Se utilizaron las cepas H271, TF2 y Md1 de las especies *Drosophila subobscura*, *Drosophila guanche* y *Drosophila madeirensis*, respectivamente. Los cromosomas politénicos de las tres especies muestran grandes similitudes en sus patrones de bandas lo que permite establecer fácilmente homologías entre ellos. La principal diferencia observada al estudiar tales cromosomas, es la presencia de inversiones paracéntricas en las tres especies.

H271

Cepa fundada a partir de una hembra procedente de una población natural de Helsinki (Finlandia). Posee todos los cromosomas con ordenación estándar en homocigosis.

Hemos trabajado con esta cepa de *D. subobscura* en la caracterización de la respuesta frente al choque térmico.

En el análisis comparativo entre los patrones de actividad génica de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, hemos trabajado con los modelos de formación de "puffs" de la cepa Ra121 de *D. subobscura*, determinados por Pascual *et al.* (1985).

TF2

Isolénea fundada a partir de una población natural del Barranco del Infierno (Tenerife). Esta población fue capturada en 1978 y mantenida en el laboratorio en cajas de poblaciones. Fue cedida a nuestro grupo por el Dr. Cabrera de la Universidad de La Laguna (Tenerife). Respecto de la ordenación estándar de los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, esta cepa de *D. guanche* es monomórfica para varias inversiones, que afectan a todos los cromosomas (Moltó *et al.*, 1987):

Cromosoma A. Es el que presenta un mayor número de inversiones. En la mitad distal del cromosoma se distinguen dos de ellas, una afecta a la región comprendida entre las divisiones 10C y 13A/B; la otra, de menor dimensión afecta a la región terminal 16BCD. La mitad proximal del cromosoma A está muy diferenciada respecto de su organización en *D. subobscura*. Se postula que al menos un "cluster" de cuatro inversiones complejas é imbricadas, entre ellas la A_1 de *D. subobscura*, puede estar implicado en esta gran diferenciación.

Cromosoma J. Presenta una única inversión, en posición distal, que se extiende desde la sección 30A a la 34E.

Cromosoma U. Portador de dos inversiones cuya morfología y puntos de rotura coinciden con las inversiones U_1 (39D/40A-45E/46A) y U_2 (45E/46A-51C/51D) de *D. subobscura*. Posee, pues, la ordenación U_{1+2} de *D. subobscura*.

Cromosoma E. Presenta dos inversiones adyacentes que afectan a las regiones comprendidas entre las divisiones 59D-66C/D y 67C-72B/C.

Cromosoma O. Posee dos inversiones imbricadas: la O₃ (91B/91C-94E/95A) de *D. subobscura* y otra que se extiende desde la sección 84/85 a la 93/94.

Cromosoma "dot" (puntiforme). Muestra la ordenación estándar de *D. subobscura*.

La mayoría de las inversiones descritas son específicas de *D. guanche*, a excepción de la A₁, U₁, U₂ y O₃ también presentes en *D. subobscura*.

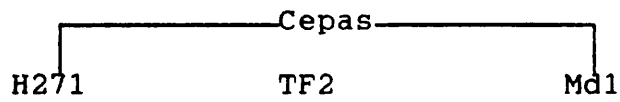
Md1.

Cepa cedida por el Dr. Prevosti del Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona. Fundada a partir de una hembra procedente de una captura de poblaciones naturales de la Isla de Madeira. Respecto de la ordenación estándar de *D. subobscura*, *D. madeirensis* presenta un menor número de inversiones en sus cromosomas politénicos que *D. guanche*. De acuerdo con Papaceit y Prevosti (1989), también en este caso, es el cromosoma A el que acumula un mayor número de cambios. Presenta una inversión proximal que parece corresponder a la A₁ de *D. subobscura* y otra en su extremo distal que afecta a la sección 16, idéntica a la descrita en *D. guanche*. Los cromosomas J, E y puntiforme muestran las ordenaciones estándar de *D. subobscura*. El cromosoma U posee la ordenación U₁₊₂, descrita tanto en *D. subobscura* como en *D. guanche*. El cromosoma O muestra la inversión O₃ igualmente presente en las otras dos especies.

El estudio de las ordenaciones cromosómicas muestra una gran proximidad filogenética entre las tres especies, siendo *D. guanche* la más alejada dentro de la triada. *D. madeirensis* solamente difiere de *D. subobscura* en la inversión que comparte con *D. guanche* (16B-16D). Las mayores diferencias observadas entre las tres especies se localizan en su cromosoma sexual (cromosoma A).

A continuación se presenta un cuadro resumen de las cepas estudiadas con sus ordenaciones cromosómicas.

Cromosoma



A	st	2A/B-7C/D complejo 10C-13AB 16B-16D	2A/B-7C/D 16B-16D
J	st	30A-34E	st
U	st	39D/40A-45E/46A 45E/46A-51C/51D	39D/40A-45E/46A 45E/46A-51C/51D
E	st	59D-66C/D 67C-72B/C	st
O	st	91B/91C-94E/95A 84/85-93/94	91B/91C-94E/94A
dot	st	st	st

2 - METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENICA DURANTE EL DESARROLLO.

2.1. Desarrollo larvario y prepupal en *Drosophila*.

Drosophila presenta un desarrollo postembrionario con metamorfosis compleja, dividido en tres estadios: larva, pupa y adulto. La fase de larva comienza con la eclosión del huevo y comprende tres estadios larvarios separados por dos mudas. A partir de la primera muda, la larva va aumentando de tamaño progresivamente y hacia el final del tercer estadio abandona el medio de cultivo hacia zonas más secas, donde se prepara para pupar.

Algunos autores (Ashburner, 1967) consideran el inicio de la pupación como un estadio independiente: **prepupa**. Este estadio abarca desde la salida de los espiráculos anteriores (extremos de las tráqueas), hasta la metamorfosis larvaria. El estadio de prepupa blanca o puparium se caracteriza por el endurecimiento de la cutícula del individuo y la transformación de los espiráculos anteriores en los cuernos pupales. Paulatinamente va oscureciéndose la cutícula, entrando en el período de prepupa pigmentada.

La verdadera pupación o metamorfosis comienza unas horas después de la formación del puparium. Se caracteriza por la histólisis de los tejidos larvarios, seguida de la organización de las estructuras del adulto a partir de los discos imaginales.

El comienzo de la fase adulta tiene lugar cuando el organismo, ya formado, abandona la cutícula pupal.

El estudio de la actividad génica en cromosomas politénicos de *Drosophila*, se restringe a un corto periodo que representa la cuarta parte del desarrollo preimaginal. Por razones de tamaño, los cromosomas politénicos resultan fácilmente manipulables en tercer estadio larvario y durante el periodo que corresponde al estadio de prepupa.

2.2. Obtención de individuos sincronizados.

Para obtener prepupas de edad conocida se ha seguido el método descrito por Latorre (1980), basado en el de Ashburner (1967), que toma como tiempo cero la salida de los espiráculos anteriores.

Las larvas de tercer estadio usadas para el análisis son aquellas que han abandonado la comida en busca de zonas más secas para iniciar la prepupación, una vez que las primeras pupas han comenzado a aparecer. A las larvas de este momento se las considera de tercer estadio tardío.

Se eligieron un total de 12 momentos de desarrollo para el análisis de "puffs": tercer estadio larvario tardío y prepupas de 0h, ½h, 1h, 2h, 4h, 10h, 14h, 16h, 18h, 22h y 24h.

2.3.- Técnicas citológicas.

Una vez elegidas las prepupas que se desean estudiar, se procede a su disección en suero Ringer para *Drosophila* (pH 7.0) con el fin de extraer las glándulas salivares. Una vez extraídas éstas se fijan inmediatamente en etanol-acético (3:1), recién preparado, durante varios minutos. Para su tinción, se colocan sobre un portaobjetos con orceína láctica (80% de orceína acética y 20% de ácido láctico) durante 45 minutos, tras lo cual se realiza el "squash" (aplastamiento). Las preparaciones se guardan a 4°C. durante unos días para completar su tinción. Por último se observan al microscopio óptico (x500, x1000).

Las operaciones de cultivo, sincronización y preparación citológica se han realizado en habitación termorregulada a 19±1°C.

2.4.- Detección de "puffs".

De acuerdo con Beermann (1952), se ha considerado "puff" a aquellas regiones de los cromosomas politénicos que presentan un aspecto abultado respecto de su estructura "normal", consecuencia de un fenómeno de descondensación. Muchas y muy diversas han sido las investigaciones que han demostrado que los "puffs" representan zonas de actividad génica.

La localización de las zonas de "puff" en los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* se ha llevado a cabo usando el mapa de los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *D. subobscura* con ordenación estándar (Kunze-Mühl y Müller, 1958), ya que la gran similitud entre los cromosomas de las tres especies permite fácilmente establecer homologías entre ellos.

Según Zhimulev *et.al.*, (1981) los "puffs" observados en las diferentes especies del género *Drosophila* se forman por descondensación uniforme de una banda, ó de una parte de la misma. Otras veces la descondensación afecta a dos ó tres bandas vecinas. Existen casos en que los "puffs" se forman a partir de una interbanda. Para una descripción de las zonas que forman "puff" en *D. subobscura* ver Latorre (1980) y Pascual (1983) y en *D. guanche* ver Moltó (1986).

Para la caracterización de un "puff" en cada locus se han considerado cualitativamente tres niveles de desarrollo:

- Nivel (0): Desarrollo nulo, la zona estudiada no presenta abultamiento, es decir muestra el modelo de bandas "normal".
- Nivel (-): Grado de desarrollo ó abultamiento bajo
- Nivel (+): Grado de desarrollo medio ó máximo.

Puesto que existe variabilidad inter e intra individual en la expresión de un "puff", se han analizado un total de 20 preparaciones por estadio de desarrollo y se observaron 5 núcleos en cada una de ellas, de manera que en cada momento del desarrollo se analizaron 100 cromosomas de un mismo tipo, a excepción del cromosoma sexual que sólo pudo estudiarse en aquellas preparaciones correspondientes a hembras. Para cada "puff", podemos distinguir tres tipos de preparaciones según qué grado de desarrollo presente en los 5 núcleos analizados:

- **Preparación (0).** Los 5 núcleos presentan un nivel de desarrollo (0) ó 4 núcleos con nivel (-) como máximo.
- **Preparación (+/-).** De los 5 núcleos observados, al menos uno presenta nivel (+) ó los 5 con nivel (-).
- **Preparación (+):** El "puff" presenta el grado de desarrollo del nivel (+) en los 5 núcleos observados.

Para nuestros análisis consideraremos que en las preparaciones(0) la zona estudiada no forma "puff", y por lo tanto no es activa. En las preparaciones (+/-) la misma zona se ha encontrado tanto activa, formando "puff", como no activa y las preparaciones (-) muestran zonas que son activas en los 5 núcleos, como se verá en el apartado de resultados.

Para el estudio cualitativo de la actividad génica, se ha calculado para cada "puff" el total de preparaciones (+) y (+/-), y se han representado dichos valores en forma de histogramas. Para el cálculo de los índices de actividad media, se ha tomado la frecuencia de aparición de un "puff", en un estadio determinado, como el número de veces que se encuentra como (+) sobre el total de las observaciones realizadas.

2.5. Coeficientes de distancia genética.

A partir de las frecuencias de aparición de los "puffs" en cada una de las tres especies del grupo *obscura*, se han aplicado cuatro coeficientes de distancia genética, para estimar el grado de alejamiento entre dichas especies.

Las expresiones matemáticas de tales coeficientes se presentan a continuación:

2.5.1. Distancia de Prevosti (P) (Prevosti *et al.*, 1975). La expresión de esta distancia para un "puff" individual es:

$$(1) \quad P_i = 1/2 [|q_{ix} - q_{iy}| - |(1 - q_{ix}) - (1 - q_{iy})|]$$

donde q_{ix} y q_{iy} son las frecuencias de aparición del "puff" i en las especies x e y respectivamente. A

efectos de cálculo, tal expresión es equivalente a una más sencilla:

$$(2) \quad P_i = |q_{ix} - q_{iy}|$$

Para r "puffs", el coeficiente es la media aritmética del valor absoluto de las diferencias:

$$(3) \quad P = \frac{\sum P_i}{r} = \frac{1}{r} \sum P_i$$

2.5.2. Distancia de Nei (N) (Nei, 1972). La expresión de esta distancia para un "puff" determinado requiere primero el cálculo de la identidad I entre dos especies:

$$(4) \quad I_i = \frac{(q_{ix} \cdot q_{iy}) + (1 - q_{ix})(1 - q_{iy})}{\sqrt{[(q_{ix}^2 + (1 - q_{ix})^2)(q_{iy}^2 + (1 - q_{iy})^2)]}}$$

donde q_{ix} y q_{iy} tienen el mismo significado que antes. Para r "puffs" se considera el siguiente valor de identidad:

$$(5) \quad I = \frac{1/r \sum [(q_{ix} \cdot q_{iy}) + (1 - q_{ix})(1 - q_{iy})]}{\sqrt{[(1/r) \sum (q_{ix}^2 + (1 - q_{ix})^2) (1/r) \sum (q_{iy}^2 + (1 - q_{iy})^2)]}}$$

o lo que es igual a:

$$(6) \quad I = \frac{\sum [(q_{ix} \cdot q_{iy}) + (1 - q_{ix})(1 - q_{iy})]}{\sqrt{[\sum (q_{ix}^2 + (1 - q_{ix})^2) \sum (q_{iy}^2 + (1 - q_{iy})^2)]}}$$

La distancia de Nei se define como:

$$(7) \quad N = -\ln I$$

2.5.3. Distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (C) (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967). Para un "puff" individual i , se define como:

$$(8) \quad C_i = \sqrt{1 - \cos \theta_i}$$

siendo:

$$(9) \quad \cos \theta_i = \sqrt{(q_{ix} \cdot q_{iy}) + \sqrt{[(1 - q_{ix})(1 - q_{iy})]}}$$

Para r "puffs" se considera la media aritmética de (8), es decir,

$$(10) \quad C = 1/r \sum \sqrt{(1-\cos\theta_i)}$$

Como puede observarse, la única variable en estos tres coeficientes es la frecuencia de aparición de "puffs" en las especies consideradas, haciendo fácil la computación de los índices.

2.5.4. Distancia D^2_k (Kurczinsky, 1970).

Para un "puff" determinado, el coeficiente vale:

$$(11) \quad D^2_{ki} = \frac{(q_{ix}-q_{iy})^2}{(n_{ix} \cdot q_{ix} + n_{iy} \cdot q_{iy}) / (n_{ix} + n_{iy})} + \frac{[(1-q_{ix}) - (1-q_{iy})]^2}{n_{ix}(1-q_{ix}) + n_{iy}(1-q_{iy}) / (n_{ix} + n_{iy})}$$

simplificando, se obtiene:

$$(12) \quad D^2_{ki} = \frac{(n_{ix} + n_{iy})^2 (q_{ix} - q_{iy})^2}{(n_{ix} \cdot q_{ix} + n_{iy} \cdot q_{iy}) (n_{ix}(1-q_{ix}) + n_{iy}(1-q_{iy}))}$$

donde n_{ix} y n_{iy} son los tamaños muestrales (número de cromosomas observados) usados para el cálculo de la frecuencia del "puff" i en las especies x e y respectivamente.

El valor de la distancia para cuando hay r "puffs" es:

$$(13) \quad D^2_k = \sum D^2_{ki}$$

Para probar la significación de esta distancia se usa una T^2 multivariante de Hotelling para variables cualitativas, cuya fórmula es:

$$(14) \quad T^2 = 1/r \sum (n_{ix} \cdot n_{iy}) / (n_{ix} + n_{iy}) D^2_k$$

Para muestras grandes, como es nuestro caso, T^2 se distribuye aproximadamente de la misma manera que X^2 con r grados de libertad.

3.- METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENICA EN CONDICIONES INDUCIDAS (CHOQUE TERMICO).

3.1. Tratamiento con agentes inductores del estrés: Temperatura supraóptima, Benzamida y Paracetamol.

Según la experiencia realizada, se eligieron para ser sometidos a los tratamientos, larvas de tercer estadio tardío ó individuos sincronizados en el inicio de la prepupación (prepupa 0h), cultivados en condiciones de no competencia a temperatura de 19°C.

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo a 31°C, 34°C o 37°C, durante un periodo de 30m. aproximadamente. Según Pascual y de Frutos (1988), estas condiciones son las óptimas para el estudio del choque térmico en *D. subobscura*.

Para los tratamientos con benzamida o paracetamol, se incubaron las glándulas salivares en suero Ringer conteniendo 1,3mg/ml de benzamida (Fluka AG, CH-9470) ó 2mg/ml de paracetamol (Winthrop 980706) respectivamente, durante un período de 25-30m, a temperatura ambiente. Los medios de incubación fueron preparados previa a su utilización.

En todos los casos, los controles se llevaron a cabo con individuos ó glándulas salivares, mantenidos en condiciones normales durante el tiempo que duraran los tratamientos.

3.2. Detección de los "puffs" inducidos por el choque térmico.

Para determinar los patrones de "puffs" inducidos por la temperatura supraóptima, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se analizaron 20 individuos prepupa 0h. por cada temperatura de tratamiento y control, de las cepas H271, TF2 y Md1, respectivamente. Para evitar una posible recuperación de los individuos, desde el fin de los tratamientos hasta la fijación de sus glándulas salivares, nunca se sometió a choque a más de tres individuos simultáneamente.

En el análisis de "puffs" se observaron 5 núcleos por cada individuo, de manera que para cada especie, se estudió detalladamente un total de 2000 cromosomas politénicos. Las técnicas citológicas empleadas con tal fin, son las mismas que se han explicado en el apartado 2.3.

Para cada locus, solamente se tuvo en cuenta dos niveles de actividad:

- (+) "puff" de tamaño medio o máximo y
- (-) "puff" de desarrollo bajo o nulo.

De esta forma, en cada tratamiento térmico, el número de observaciones (+) respecto del total de las observaciones realizadas, mide la frecuencia de aparición de cada "puff".

Así, una alta frecuencia de "puffing" indicaría una alta actividad génica.

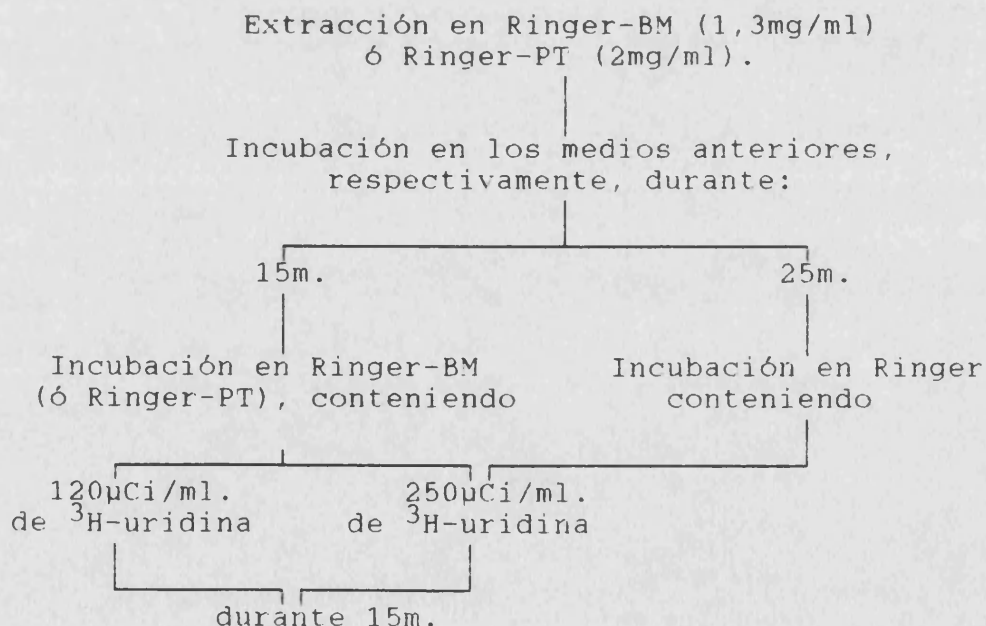
Se utilizó el mapa de los cromosomas politénicos de *D. subobscura* (Kunze-Mühl y Müller, 1958) para localizar los "puffs" inducidos en las tres especies.

3.3. Detección de RNAm en los "puffs" inducidos, mediante autorradiografía.

La técnica autorradiográfica aplicada es la descrita por Silva (1984) para detectar la actividad transcripcional durante el desarrollo, en los cromosomas de *D. subobscura*, aunque con algunas modificaciones.

Los individuos sometidos a choque térmico (34°C durante 20-25m) fueron larvas de tercer estadio tardío y prepupas de 0h., cultivadas a 19°C. Una vez extraídas las glándulas salivares, son incubadas en suero Ringer conteniendo 250µCi/ml de ³H-UTP ([5,6-³H] uridina, Amersham, actividad específica 40-43Ci/mmol) durante 10-15 minutos.

Para los tratamientos con benzamida (BM) ó paracetamol (PT), se seleccionaron larvas de tercer estadio tardío. Las glándulas salivares fueron sometidas a los procesos que se indican a continuación:



En este caso, la acción de los agentes estresantes se aplica a las glándulas (*in vitro*) y no a los individuos adultos (*in vivo*) como en el anterior.

El fijador empleado fue, en todos los casos, etanol-acético (3:1) frío y recién preparado. La emulsión

autorradiográfica utilizada fue Kodak AR10, diluida 1:1 con agua destilada. El tiempo de exposición elegido osciló entre 7-10 días.

El revelado de los autorradiogramas se llevó a cabo de la forma convencional, evitando dañar la emulsión con cambios bruscos de la temperatura de los líquidos. Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa diluido en tampón fosfato 10mM, pH 6.8 (1:20) durante pocos minutos. Una vez secas, son montadas bajo un cubreobjetos con un medio de inclusión de polimerización rápida (Entellán, Merck 7961). Pasado el tiempo necesario, las preparaciones quedan listas para su análisis microscópico.

El número de autorradiogramas analizados por cada especie y tratamiento, se indica en el siguiente esquema:

	Control	Ch.térmico	Benzamida	Paracetamol
<i>D. subobscura</i>	20	135	20	10
<i>D. guanche</i>	20	90	20	10
<i>D. madeirensis</i>	20	75	16	10

3.4. Detección de las proteínas de choque térmico.

Para determinar los patrones de síntesis proteica, se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

En estas experiencias se utilizaron larvas de tercer estadio tardío de las tres especies a estudio, *D. subobscura* (cepa H271), *D. guanche* (cepa TF2) y *D. madeirensis* (cepa Md1), así como de *D. melanogaster* (cepa OrR) como ejemplo de patrón proteico conocido.

El protocolo que hemos utilizado es el descrito por Pascual y de Frutos (1988), basado fundamentalmente en los de Laemmli (1970) y Bonner y Laskey (1974).

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo, bien sobre las larvas (in vivo), bien sobre sus glándulas salivares después de su extracción (in vitro). La temperatura de choque fue de 31°C, 34°C o 37°C según la experiencia realizada. Los tiempos de los tratamientos fueron de 20-25m. Posteriormente se incubaron las glándulas en suero Ringer conteniendo 0,5 mCi/ml de leucina tritiada (L-[4,5 ³H]leucine, Amersham, actividad específica 45Ci/mmol) durante 30 m. y mantenidas a temperatura control o de tratamiento.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida, conteniendo 0.1% de SDS, con el "resolving" gel al 9-15%, y el "stacking" gel al 6%. Por cada muestra se aislaron de seis a ocho glándulas salivares. El tampón de muestra utilizado presenta la siguiente composición: 0,0625M Tris HCl pH 6,8; 1% dodecilsulfato sódico (SDS); 1% 2-mercaptopetanol; 10% glicerina y 0.001% azul de bromofenol.

Esta técnica se caracteriza por utilizar el SDS como agente desnaturante de las proteínas, dando lugar a cadenas polipeptídicas con una densidad de carga constante y con idénticas conformaciones. De esta manera, se consigue que las diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas, se deba a diferencias en su peso molecular. Para su cálculo, se utilizó un patrón estándar de proteínas de BioRad, con pesos que cubren el rango entre 92500 daltons y 14500 daltons.

Con objeto de aumentar la sensibilidad del método de detección en los fluorogramas, el gel fue sumergido en AmplifyTM (Amersham, NAMP.100) entre 15 y 30m. La película utilizada fue Kodak X-OMAT-S y el tiempo de exposición osciló entre 48 y 96h. a -70°C. El revelado de la película se llevó a cabo de la forma convencional. Finalmente los fluorogramas fueron densitometrados para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas sintetizadas *de novo*, analizándose un total de 15 por cada especie.

3.5. Sondas utilizadas.

Las sondas empleadas fueron aquellas portadoras de los genes de choque térmico (HSPs) de *D. melanogaster*. Fueron suministradas por los laboratorios de los doctores Craig (Universidad de Wisconsin, USA), Hovemann (Universidad de Heidelberg, RFA), Meselson (Universidad de Harvard, USA) y Mirkovitch (Universidad de Génova, Suiza).

- 301.1 (Holmgren *et al.*, 1981). El subclón 301.1 es un fragmento *EcoRI* de 8,2 Kb. del clón lambda 301, insertado en el sitio *EcoRI* del pBR322. Contiene el gen HSP82 procedente de la región 63BC de la cepa Oregón R (OrR). La unidad de transcripción del gen es de 3,7 kb. de longitud, con dos exones (proximal de 0,15kb. y el distal de 2,6kb.) y un intrón central de 0,95kb.

- 122 (Goldschmidt-Clermont, 1980). Es un fragmento *EcoRI* de 11,5 kb. aislado de una librería Lambda Charon 9. Posteriormente clonado en el pBR322 en el sitio *EcoRI*. El inserto deriva de la región 87A de la cepa OrR, siendo portador de dos copias del gen HSP70 con orientación opuesta.

- 56H8 (Shedl *et al.*, 1978). Plásmido híbrido resultante de la clonación de un fragmento *EcoRI* de DNA embrionario, en el plásmido pSF2124 en el sitio *EcoRI*. Es portador de una copia del gen HSP70 de la región 87A. Este inserto, junto con el anterior, constituyen variantes en la organización del locus 87A, resultado del polimorfismo poblacional detectado, para esta región (Goldschmidt-Clermont, 1980). El inserto del clon 122 es la forma de organización más frecuente observada.

- G5 (Craig *et al.*, 1979). Clon de 11,3kb. con una copia del gen HSP70 en el pBR322. El inserto es un fragmento *EcoRI* de 7kb. procedente de la región 87C y, por tanto, portador, además de la secuencia codificadora para la proteína de choque de 70kd, de las secuencias $\alpha\beta$ características de este locus.

-pPW227 (Holmgren *et al.*, 1979). Es un plásmido pMB9 que lleva clonado un inserto de 10kb, que contiene el gen HSP68 de la cepa OrR. El inserto procede de la región 95D y ha sido clonado en el sitio *EcoRI* del plásmido.

- 88.5 y 88.6 (Corces *et al.*, 1980). Son subclones del clon lambda 88 en el pBR322. El clon 88 presenta un fragmento de 16,8 kb. procedente de la región 67B de la cepa Canton S y, por tanto, portador de los genes que codifican para las proteínas de bajo peso molecular: HSP28-HSP23 (88.5) y HSP26-HSP22 (88.6). En ambos casos, el inserto está clonado en el sitio *EcoRI* del pBR322.

- p5A (Ryseck *et al.*, 1985). Presenta un fragmento de 5Kb. clonado en el pUC18, previamente aislado de una librería lambda, vector NM 1149, de DNA de la cepa OrR. Este clón incluye dos exones (500pb y 830pb), un intrón central (700pb) y parte de la región *TagI* del locus 93D. La región *TagI* se caracteriza por estar formada por unidades repetitivas de 280pb cada una de ellas.

3.6. Aislamiento y cuantificación de DNA.

3.6.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

El método seguido está basado en el protocolo de lisis alcalina recomendado por Maniatis *et al.* (1982), tanto para el aislamiento de DNA a grande como pequeña escala. En el primer caso se obtuvo un rendimiento de más de 2mg de plásmido/l. de cultivo. Para las minipreparaciones fue del orden de 3-5 $\mu\text{g/ml}$.

Para el aislamiento a gran escala, se añadieron los tratamientos con RNasa y proteinasa K, así como dos procesos de fenolización.

3.6.2. Aislamiento de DNA genómico de *Drosophila*.

Para la extracción de DNA genómico de *D. melanogaster*, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, el protocolo seguido fue el de Junakovick *et al.* (1984). A partir de 150 moscas se obtuvo, por término medio, un rendimiento del orden de 0,3-0,7 μg de DNA/ μl de tampón.

El procedimiento incluye el homogeneizado de las moscas en los tampones I (TrisCl 0,1M pH9, EDTA 0,1M pH9) y II (SDS 2% precalentado a 65°C) respectivamente; incubación a

temperaturas relativamente altas (60-65°C) con el fin de liberar el DNA; precipitación del DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y tratamiento con RNasa para eliminar el RNA contaminante.

3.6.3. Cuantificación del DNA.

La concentración de DNA fue determinada en minigeles, comparando la intensidad de fluorescencia de la muestra problema con las diferentes intensidades de los fragmentos de un marcador de peso molecular. El marcador utilizado es el lambda HindIII de Boehringer Mannheim (B.M.) (Cat. No. 236 250). Los tamaños de los fragmentos que presenta este marcador, se indicarán en el apartado 3.8.

Para el DNA plasmídico, la concentración y riqueza del DNA fue determinada, además, por espectrofotometría, midiendo la cantidad de radiación u.v. absorbida a longitud de onda de 260nm (A_{260}) y el cociente A_{260}/A_{280} , respectivamente.

3.7. Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción han sido realizadas utilizando enzimas de B.M., a la concentración, temperatura y con los tampones adecuados.

Para las digestiones dobles, se ha utilizado el tampón que permitiera la máxima actividad de los enzimas implicados. En caso de incompatibilidad, hemos procedido a precipitar el DNA digerido con uno de los enzimas y, una vez resuspendido, hemos digerido con el segundo enzima.

Para las digestiones de DNA genómico de *Drosophila*, se ha partido de lug de DNA, siendo el tiempo de incubación de 12-16h. Antes de interrumpir la reacción, se realizaron controles, en minigel, para determinar si la digestión era completa.

3.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La mayoría de las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa, dentro de un rango de concentración del 0,8 al 1.2%. Todos los geles, así como el tampón de electroforesis (Tris-borato), se han preparado incluyendo bromuro de etidio a la concentración de 0,5µg/ml.

El marcador de pesos moleculares (y de concentración) que se ha empleado, es el lambda *HindIII*. Los fragmentos de DNA que presenta tienen los siguientes tamaños (en pares de bases): 23.130, 9.416, 6.682, 4.361, 2.322, 2.027, y 564.

El tampón utilizado para cargar las muestras presenta la siguiente composición: 50% de glicerol; 0,5% de azul de bromofenol y 100mM de EDTA (sal disódica del tetraacetato de diamina etilénico).

3.9. Purificación de fragmentos de DNA.

En la caracterización de los genes de choque térmico en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se utilizaron como sondas, fragmentos internos de los clones portadores de los genes de choque térmico de *D. melanogaster*. La purificación de tales fragmentos se ha realizado por doble electroelución en bolsas de diálisis, tal como se especifica en Maniatis *et al.* (1982). La única modificación introducida es la electroelución en el mismo tampón de electroforesis.

3.10. Marcaje de DNA.

3.10.1. Marcaje radiactivo.

Las sondas fueron marcadas radiactivamente, en un sistema *in vitro*, mediante la reacción de "oligolabeling" descrita por Feinberg y Vogelstein (1983). Esta técnica ofrece la ventaja de conseguir un producto estable de alta actividad específica. Aproximadamente se incorpora el 70-90% del nucleótido marcado a la cadena de DNA, obteniéndose una actividad específica del orden de 10^9 dpm/ μ g de DNA, partiendo de pequeñas cantidades de DNA molde y de precursor radiactivo.

La reacción de marcaje se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l, utilizando el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I y hexámeros como "primers", a pH 6,6 y temperatura ambiente, durante un tiempo mínimo de 4 horas. Concretamente se marcaron 100ng de DNA bicatenario por reacción, utilizando como precursor radiactivo 3 H-dCTP ([1',2',5- 3 H]dCTP, Amersham, actividad específica 68Ci/mmol) a una concentración final de 300 μ Ci/ml.

La purificación del DNA se realizó mediante columnas de Sephadex (G-50) y la actividad específica se midió en contador de centelleo.

El DNA marcado se recuperó por precipitación en dos volúmenes de etanol puro a -20° C y 0,1 volúmenes de AcNa 3M o ClNa 5M frío.

3.10.2. Marcaje no radiactivo.

Se basa en la incorporación de un esteroide (la digoxigenina) como molécula marcadora del DNA. Concretamente el desoxirribonucleótido de uridina (dUTP) es el que está unido a la digoxigenina en el kit de marcaje y detección de DNA que hemos utilizado (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1093 657).

El método de marcaje es el de "oligolabeling", descrito anteriormente, y el protocolo seguido es el recomendado en el kit.

En condiciones estándar, la reacción tiene lugar en un volumen final de 20 μ l, con una concentración de 1-2 μ g de DNA

molde linearizado y desnaturalizado, a 37°C durante al menos una hora. Con ello se consigue alrededor de 250ng de DNA marcado recién sintetizado.

La purificación y recuperación del DNA marcado, se realizó por precipitación en tres volúmenes de etanol puro a -20°C y 0,2 volúmenes de ClLi 4M.

3.11. Transferencia de DNA a filtros.

Con el fin de detectar secuencias específicas en el DNA genómico de *Drosophila*, se ha seguido el protocolo de transferencia desde geles de agarosa a filtros, diseñado por Southern (1975) y descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron filtros de nylon (Amersham, Refs. RPN 303N) y 20xSSC como tampón de transferencia. El tiempo de transferencia fue de 12-14h.

La fijación del DNA en los filtros, se llevó a cabo por irradiación en transiluminador ultravioleta (longitud de onda de 302nm), durante 3-5m., ó bien, se mantuvieron a 80°C durante 2h.

3.12. Hibridación en filtros de nylon.

Las sondas utilizadas fueron marcadas con digoxigenina, por tanto el protocolo de hibridación seguido, es el recomendado en la hoja de instrucciones del kit de marcaje y detección de DNA descrito en el apartado 3.9.2, con ligeras modificaciones.

I. Pretratamiento de los filtros.

Los filtros, con el DNA ya fijado, son incubados en solución de hibridación (5xSSC; 1% de agente de bloqueo; 0,1% N-laurilsarcosina; 0.02% SDS) sin sonda, a 65°C durante al menos 1h. Se incrementó el agente de bloqueo hasta el 1% para su uso en filtros de nylon.

II. Hibridación.

Una vez eliminada la solución de hibridación del tratamiento anterior, se añadieron 5 ml de la mezcla de hibridación conteniendo aproximadamente 1µg de DNA sonda marcado y desnaturalizado. Se incubó durante 12-15h. a 65°C.

La mezcla de hibridación puede recuperarse y guardarse, para volver a ser utilizada. En estos casos, siempre se ha procedido a desnaturalizar la sonda 10m. a 95-100°C y enfriarla posteriormente en hielo.

Las hibridaciones, así como el pretratamiento de los filtros, se llevaron a cabo en el interior de tubos de vidrio.

III. Lavados.

Se lavaron los filtros dos veces a temperatura ambiente en un volumen grande de 2xSSC (5-10m cada lavado, en agitación).

Posteriormente se efectuaron dos lavados de estringencia (15m cada lavado en agitación) a la temperatura y concentración salina apropiada. Los lavados de estringencia moderada fueron a la temperatura de 45°C y con tampón 0,1%xSSC; los de mayor estringencia a temperatura de 55°C y 65°C, a la misma concentración del tampón SSC.

IV. Detección de los híbridos.

La detección de la señal se efectúa por un inmunoensayo acoplado a una reacción enzimática, utilizando un anticuerpo conjugado al enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima cataliza una reacción de color, obteniéndose un tono púrpura-azul en las bandas donde se detectan los híbridos.

Para ello, se siguió exactamente las condiciones recomendadas por el fabricante del kit. Normalmente, la aparición de las señales, en el DNA genómico de *Drosophila*, se completa entre 12-24h. de reacción enzimática.

3.13. Hibridación *in situ*.

3.13.1. Obtención de preparaciones citológicas con cromosomas bandeados, extendidos y planos.

Los estudios que necesitan de la técnica de hibridación *in situ*, requieren preparaciones citológicas resistentes a los distintos tratamientos que sufre el material biológico durante el desarrollo de la misma, sin deteriorarse su morfología, ni perder calidad en el detalle.

El método descrito por Atherton y Gall (1972) permite obtener tales preparaciones para los cromosomas politénicos de *Drosophila*. Los mejores cromosomas son aquellos que muestran su patrón de bandas característico, sin refringencias, planos y bien extendidos sobre la superficie de la preparación.

Para esta experiencia, seleccionamos larvas de tercer estadio tardío, cultivadas a 19°C, sin competencia y bien alimentadas, puesto que gran parte de la calidad de los cromosomas depende de las condiciones de cultivo de las larvas. Previa a la disección de las glándulas salivares, las larvas fueron sometidas a choque térmico de 34°C durante 25-30 m., con el propósito de que se indujeran los "puffs" del estrés térmico. De acuerdo con Pardue (1986), las secuencias en estado de "puff" hibridan más eficientemente, que aquellas que mantienen el estado de no "puff".

Aunque el protocolo que se ha seguido se basa, en su fundamento, en los métodos clásicos, vamos a describirlo, con cierto detalle, por las numerosas modificaciones introducidas. La obtención de preparaciones citológicas para

hibridación *in situ*, es uno de los métodos en el que más cambios se han descrito por la falta de repetibilidad en algunos de sus pasos, de forma que cada laboratorio (ó investigador) se construye el suyo propio que le funcione bien. El que se ha utilizado en este trabajo es el siguiente:

Las glándulas salivares se extraen en suero Ringer, eliminando el cuerpo graso de cada una de ellas. Son fijadas en etanol-acético (3:1), recién preparado, durante varios minutos, siendo troceadas, posteriormente, en 20µl de ácido acético al 45% sobre un cubreobjetos (18x18mm.). Con este tratamiento ácido, parte de las proteínas básicas de los cromosomas (histonas) son eliminadas, siendo suficiente para permitir la hibridación posterior.

El cubre es recogido por un portaobjetos (76x26mm) y se repiquetea repetidamente con el extremo de un lápiz o de una aguja enmangada, desplazándolo lateralmente sobre la preparación. La intensidad en este proceso depende de la especie, muy fuerte para *D. melanogaster*, menos dura para aquellas otras con cromosomas más gruesos como, y en orden decreciente de intensidad, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Con ello se permite la rotura de las membranas celulares y nucleares, así como la extensión de los cromosomas.

Para eliminar el ruido de fondo resultante del contenido citoplasmático de las células, se lavan las preparaciones por capilaridad al añadir ácido acético al 45% en un extremo del cubre y papel secante en el opuesto. Se repite la operación tantas veces como sea necesario. Posteriormente, se vuelve a repiquetear hasta que los cromosomas estén longitudinalmente extendidos sobre la preparación.

El aplastado de las preparaciones, permite que los cromosomas sean planos. Se lleva a cabo con un tapón de goma sobre papeles de filtro y el cubre, aplicándosele cierta fuerza, de intensidad variable según la especie, con un martillo también de goma. La intensidad del "squahs" para *D. melanogaster* y las especies del grupo *obscura*, es de la misma proporción que la del repiqueteado que hemos descrito antes. Para facilitar el aplanado de los cromosomas, se colocan las preparaciones sobre una plancha a 45°C durante 5m.

Las preparaciones deben ser examinadas al microscopio de contraste de fases, de forma periódica, a lo largo de todo el proceso descrito, con el fin de determinar, el bandedo, la extensión y el aplanado de los cromosomas.

Para facilitar la separación de los cubreobjetos, las preparaciones son congeladas sobre una superficie plana de nieve carbónica. Seguidamente son sometidas a deshidratación en etanol al 70% y al 99% durante 10m respectivamente. Se las deja secar en posición vertical al aire. Una vez secas pueden guardarse durante varios meses.

Es imprescindible para que el método funcione, extremar la limpieza de todo el material citológico empleado. La obtención de buenas preparaciones citológicas es uno de los factores más limitantes en el éxito de las hibridaciones.

3.13.2. Condiciones de hibridación

Pardue (1986) realiza un estudio muy detallado de la técnica de hibridación *in situ*, en el cual nos hemos basado para confeccionar el siguiente protocolo:

I. Pretratamiento de las preparaciones antes de la hibridación.

Las preparaciones son incubadas a temperatura ambiente, en solución salina (2xSSPE ó 2xSSC) conteniendo RNAsa a altas concentraciones (100µg/ml), durante 2 horas. Este tratamiento resulta beneficioso para eliminar el RNA endógeno que podría actuar como posible competidor por la sonda marcada.

Posteriormente, se lavan bien las preparaciones con la misma solución salina (3 lavados de 10m. con 2xSSPE ó 2xSSC) y se deshidrata el material en alcoholes con distinta gradación.

II. Hibridación con isótopos radiactivos (³H), en solución salina a altas temperaturas.

El DNA de los cromosomas es desnaturalizado por tratamiento alcalino, siendo éste, según Pardue (1986), el agente que da mejores resultados. Concretamente se utilizó NaOH 0,07M durante 3m. exactos.

La sonda es desnaturalizada en baño a 95-100°C durante 10m. Se necesita una cantidad de DNA-sonda del orden de 1×10^6 cpm/preparación.

La hibridación se llevó a cabo en condiciones de estringencia relativamente altas (tampón 2xSSPE ó 2xSSC, pH 6,8 a 65°C), durante 12-15h.

A la mezcla de hibridación puede añadirse un exceso de DNA (4µg/preparación) no radioactivo y no competitivo (DNA de *E. coli* o de esperma de salmón) para reducir las uniones inespecíficas de la sonda a las proteínas celulares.

III. Lavados.

Las preparaciones se lavaron con 2xSSPE (2xSSC) a temperatura ambiente (dos lavados durante 20m). Para eliminar el DNA unido inespecíficamente a los cromosomas, se llevaron a cabo dos lavados con 2xSSPE (2xSSC) a 63°C durante 15m. cada uno. Seguidamente, las preparaciones son deshidratadas de la forma ya descrita y se las dejó secar al aire.

IV. Autorradiografía.

El isótopo más utilizado por la técnica autorradiográfica en citología, es el tritio, debido a la débil radiación de las partículas β que emite (0.018 MeV).

Estas partículas son detectadas por delgadas películas autorradiográficas, que se adhieren a la superficie de las preparaciones citológicas.

La emulsión autorradiográfica empleada fue Kodak AR10, diluida 1:1 con agua destilada. El tiempo de exposición osciló entre 25-30 días.

V. Revelado y Tinción de los autorradiogramas.

Se llevó a cabo tal como se ha descrito, para esta técnica, en el apartado 3.3.

RESULTADOS

1. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD GENICA DURANTE EL DESARROLLO.

El estudio de los patrones de "puffs" de los cromosomas politénicos es un método que permite estimar la expresión génica. La comparación de estos patrones entre especies filogenéticamente próximas, es un modo de conocer su significado en el proceso evolutivo, identificar aquellos loci sometidos a un mismo control génico y, consecuentemente, estimar la expresión génica diferencial.

Los resultados de esta primera parte se presentan en tres capítulos, destinando los dos primeros a la descripción de los patrones de "puffs" de *D. madeirensis* y *D. guanche*, respectivamente. En el tercer y último capítulo se comparan tales patrones entre sí y con los descritos por de Frutos y Latorre (1982a) y Pascual *et.al.*, (1985) para *D. subobscura*.

1.1. Patrones temporales de actividad génica en *Drosophila madeirensis*.

1.1.1. Descripción de los "puffs".

Se ha encontrado en *D. madeirensis* (cepa Md1) un total de 145 "puffs" presentes en alguno de los 12 estadios de desarrollo analizados. Su distribución y localización por cromosoma es la siguiente:

Cromosoma A. Presenta un total de 18 "puffs": 1C, 6E-7A, 6CD, 4A, 2C, 8D/E, 8E/9A, 9B, 10AB, 11D, 12AC, 12D, 13A, 13BC, 13E, 14CD, 15DE y 16B.

Cromosoma J. Con 29 "puffs". 17AB, 17BC, 17C/D, 18C, 19AB, 20BC, 21D-22A, 22B, 22CD, 22E-23A, 25AC, 26, 27A, 28A, 28BC, 28D, 29A, 29B, 30A, 30BC, 31A, 31BC, 32A, 33A, 33B-34A, 34B, 35AB, 35D y 35E.

Cromosoma U. También con 29 regiones activas: 36AB, 36C, 37AC, 37D-38A, 38BC, 39A, 39D, 44C-45A, 43CD, 42C/43A, 42B/C, 42A/B, 41BD, 40D-41A, 40A/B, 50D, 50B, 49B, 49A, 48D, 48B, 48A, 47BD, 46D, 46B, 51D, 52AC, 53B y 53D.

Cromosoma E. Posee un total de 32 "puffs": 54E-55A, 55BD, 56C/D, 57BC, 58A/B, 59E, 60AB, 60C/D, 61AC, 61D-62A, 62A/B, 62BC, 62C, 63A, 63A/B, 63B/C, 64C/D, 65B, 66AB, 66CD, 67AB, 67C/D, 68DE, 69B, 70A, 70BC, 71B, 72BC, 72D-73A, 73C, 74A y 74BC.

Cromosoma O. Con 37 "puffs": 75C-76A, 76B, 76D, 78BC, 78D, 79B, 79D-80A, 80D/81A, 81BC, 82A/B, 82B-83C, 84C/D, 85AB, 85CD, 86A, 87AB, 87C, 88A, 88D-89A, 90A, 90B, 90D, 91B, 94C, 94A, 92D-93A, 92C, 92A/B, 91C-92A, 95A, 95C, 95D, 96AC, 97AB, 97DE, 98C y 99BC.

Además de estos "puffs", *D. madeirensis* tiene un único anillo de Balbiani, presente a lo largo de todo el desarrollo, localizado en la sección 24 del cromosoma J. La enumeración de los "puffs" se ha realizado siguiendo la secuencia de bandas específica para cada cromosoma de *D. madeirensis*. Sus nombres los deben a la sección ó secciones cromosómicas afectadas, que adquieren el aspecto abultado de "puff". En nuestros análisis no ha sido considerado el pequeño cromosoma "dot".

Como ya se ha comentado en la introducción y en el punto 2.4 de material y métodos, los "puffs" se forman por descondensación uniforme de una banda, ó parte de ella. Otras veces intervienen varias bandas vecinas, así como se describen ejemplos de participación de interbandas en la formación de "puffs". La descripción detallada de la formación de los "puffs" de *D. madeirensis* a partir de determinadas bandas e interbandas de sus cromosomas politénicos, es tarea penosa y aburrida de escribir y presumiblemente de leer. Además, no daría información novedosa respecto de la que ya se tiene para las especies próximas a *D. madeirensis*, *D. subobscura* (Latorre, 1980 y Pascual, 1983) y *D. guanche* (Moltó, 1986). Ambas razones sumadas al hecho de que estos análisis se han realizado a microscopia óptica, no pudiendo establecer entre las especies, diferencias ultraestructurales en la formación de un "puff", nos avalan para describir solamente aquellos "puffs" de *D. madeirensis* no encontrados en *D. subobscura* y *D. guanche*. Tales "puffs" son:

- 36AB (cromosoma U): Ensanchamiento de la zona de interbanda que se extiende desde el doblete de bandas finas de la subsección 36A y la serie de bandas finas de la subsección 36B. La mayoría de las veces se observa bastante deteriorada, como consecuencia del estiramiento que sufren los cromosomas durante el "squash", mucho más drástico sobre las regiones cercanas al centrómero, como es el caso.
- 62A/B (cromosoma E): Suave descondensación de la banda fuerte situada en el límite de las subsecciones 62A y 62B.
- 62C (cromosoma E): En la formación del "puff" intervienen el doblete de bandas finas y la banda fuerte de esta zona.
- 76B (cromosoma O): Ensanchamiento de la región de interbanda comprendida entre los dobletes de bandas finas característicos de esta región.
- 92C (cromosoma O): La zona de interbanda que se extiende entre las dos bandas fuertes de esta sección, está implicada en la morfología y desarrollo del "puff".

1.1.2. Estudio cualitativo de la actividad génica: Modelos de formación de "puffs".

Como se indicó en material y métodos, un locus activo en una preparación puede serlo ó en los cinco núcleos observados (preparaciones +), ó al menos en uno de ellos (preparaciones +/-). Se ha calculado para cada "puff", en cada estadio, el total de preparaciones (+) y (+/-). Los resultados se expresan en porcentajes, y se presentan, para su mejor visualización, en forma de histogramas de frecuencias, uno por cada cromosoma (figuras 1-5). En el eje de ordenadas se indican las frecuencias. En el eje de abscisas, los "puffs" encontrados en el cromosoma correspondiente y ordenados según la secuencia de bandas específica. Cada estadio está definido por una barra, a excepción de aquellos en los que la actividad del "puff" es nula. De esta forma, para cada "puff" se indica la evolución de su expresión en los 12 estadios analizados, mediante la altura que alcanzan las barras del histograma. En cada barra se han representado dos valores: el valor máximo corresponde al porcentaje de preparaciones (+) y (+/-), y el valor inferior, en negro, corresponde al porcentaje de preparaciones (+). El número de preparaciones (+/-) es, lógicamente, el espacio blanco. En la mayoría de los casos, todas las preparaciones analizadas son del tipo (+/-) (barras blancas), contándose pocos ejemplos del tipo (+) (barras negras).

A la vista de los histogramas presentados, se observa un comportamiento diferente entre los distintos "puffs". Unos son activos en casi todos los estadios analizados, otros lo son preferentemente en determinados momentos del desarrollo (tercer estadio larvario tardío, inicios de la prepupación, prepupa media, etc, etc).

Para la mayoría de las especies del género *Drosophila*, el patrón de actividad génica presenta dos picos principales, que corresponden con dos momentos del desarrollo muy importantes: el inicio de la prepupación e inicio de la pupación, respectivamente. En algunas especies (*D. pseudoobscura*, Stocker y Kastritsis, 1972; *D. subobscura*, Pascual et.al., 1985) se describe, también, un pico en la actividad, de menor magnitud, durante la prepupa media. Teniendo en cuenta tales acontecimientos, se han agrupado los doce estadios analizados en cinco intervalos de desarrollo: tercer estadio larvario tardío, inicios de la prepupación, prepupa temprana, prepupa media y prepupa tardía. La figura 6 presenta un claro esquema de tales estadios. De acuerdo con la actividad que presenta cada "puff" en los cinco estadios, definimos ocho modelos de expresión temporal:

Modelo I. "Puffs" activos en el tercer estadio larvario tardío.

Se agrupan bajo este modelo aquellos loci que presentan su mayor actividad en larvas de tercer estadio. Mientras los "puffs" 12D (cromosoma A) y 42A/B (cromosoma U) sólo son activos en dicho estadio, los "puffs" 13A, 13E (cromosoma A), 43CD (cromosoma U) y 63A (cromosoma E) ven disminuida su actividad de forma progresiva en los estadios siguientes.

Modelo II. "Puffs" activos en el inicio de la prepupación.

Muestran su máxima frecuencia de aparición en los estadios de prepupa 0h y prepupa ½h. Entre ellos destacar el 35AB, activo en los cinco núcleos analizados por preparación, de ahí que presente una alta frecuencia de preparaciones de tipo (+) (barras negras en el histograma).

Modelo III. "Puffs" activos durante la prepupa temprana.

Muestran elevada actividad en alguno de los estadios siguientes: prepupa 1h, prepupa 2h ó prepupa 4h. El locus 35AB es también un "puff" característico de esta etapa del desarrollo, pues mantiene su expresión a niveles superiores al 80%.

Modelo IV. "Puffs" activos durante la prepupa media.

Se consideran como tales, aquellos que presentan la máxima ó una elevada frecuencia de aparición (superior al 70%) en los estadios de prepupa 10h, prepupa 14h ó prepupa 16h. Destacamos como más importantes los "puffs" 48A, 75C-76A (con máxima actividad en prepupa 10h), 48B, 66CD y 70A (máxima actividad en prepupa 14h).

Modelo V. "Puffs" activos en prepupas tardías.

Muestran la máxima ó una elevada expresión en los estadios de prepupa 18h, prepupa 22h ó prepupa 24h. Citaremos como más sobresalientes los "puffs" 18C (con un % de preparaciones + del 85% a 18h); 48B (con un 67% de preparaciones +/- y - a las 22h), 70A, 72BC (con frecuencias del 100% en los estadios de prepupa 18h y 24h) y 75C-76A (también con frecuencias del 100% a 18h).

Modelo VI. "Puffs" activos durante el inicio y fin de la prepupación. (Modelo "croissant").

Muestran un comportamiento a lo largo del desarrollo caracterizado por una gran diferencia entre la frecuencia de actividad en los estadios iniciales y finales (muy alta ó máxima) y en los estadios intermedios (baja ó nula). Los "puffs" 26 y 28BC del cromosoma J son un notable ejemplo de este modelo.

Modelo VII. "Puffs" activos durante los estadios de prepupa.

Los "puffs" que pertenecen a este modelo son activos a lo largo del desarrollo, excepto en tercer estadio larvario tardío. Los loci 25AC (cromosoma J); 46B, 53E (cromosoma U); 70BC (cromosoma E) y 97DE (cromosoma O), pertenecen, entre otros, a este modelo de comportamiento.

Modelo VIII. "Puffs" activos durante todo el desarrollo.

Se incluye en este grupo a aquellos "puffs" que muestran actividad moderada-alta en todos los intervalos del desarrollo analizados: tercer estadio larvario tardío y en alguno de los estadios del inicio de la prepupación, de prepupa temprana, de prepupa media y de prepupa tardía. Entre ellos podemos destacar los siguientes: 10AB, 13BC (cromosoma A); 33B-34A (cromosoma J); 41BD, 47BD (cromosoma U); 57BC, 61AC, 68DE (cromosoma E); 78BC, 82B-83C y 85AB (cromosoma O).

En la figura 7 se dan unos ejemplos representativos de algunos de los modelos que acabamos de describir. En esta figura se incluyen los autorradiogramas correspondientes al inicio de la prepupación, mostrándonos la actividad transcripcional de los "puffs" presentes en dicho intervalo de desarrollo, como son el 35AB y el 46B.

1.1.3. Definición del patrón característico.

A la vista de los histogramas presentados en las figuras 1-5, se ha observado que no todos los "puffs" presentan un mismo patrón de expresión a lo largo del desarrollo, definiéndose unos modelos concretos de actividad. Pero también podemos deducir de la observación de tales histogramas, que la frecuencia con que aparecen dichos "puffs" tampoco es la misma, incluso para aquellos que siguen un mismo modelo de comportamiento.

Atendiendo a los porcentajes de (+) y (-/-), que es, en definitiva, una medida de la actividad, se han clasificado los "puffs" en tres grupos, de acuerdo con su máxima frecuencia de aparición en alguno de los 12 estadios analizados:

- (a) "Puffs" que constituyen el patrón característico: Pertenecen a este grupo aquellos "puffs" con frecuencias entre 75-100%. Son por tanto, "puffs" de elevada frecuencia de aparición. Como norma general, son los que presentan un mayor número de preparaciones (-).
- (b) "Puffs" de actividad media: Pertenecen a este grupo los "puffs" con frecuencias entre 25-75%. Representan un grupo importante del total de "puffs" descritos en *D. madeirensis*.
- (c) "Puffs" ocasionales: Son aquellos con frecuencia inferior al 25%. Son de pequeño tamaño y no suelen aparecer nunca en los cinco campos de la misma preparación. Es la fracción más numerosa con el 40% de los "puffs" descritos en esta especie.

En la tabla 1 se presentan los "puffs" pertenecientes a cada uno de los tres grupos para cada cromosoma. La

enumeración de los mismos se da siguiendo el orden específico del patrón de bandas de cada cromosoma de *D. madeirensis*.

1.1.4. Estudio cuantitativo de la actividad génica: Frecuencias de aparición de "puffs".

Con objeto de cuantificar la actividad génica de los cromosomas politénicos de *D. madeirensis*, se calculó a partir de los datos originales, un solo valor de frecuencia para cada "puff". Esta frecuencia (q) se define como el cociente entre el número de veces que se observa el "puff" (con grado de desarrollo +) y el total de las observaciones. Esto se realiza para cada estadio. Para todos los cromosomas, excepto para el A, el número de observaciones es de 100 por estadio, que corresponde a los cinco núcleos observados en el total de las 20 preparaciones analizadas. En el caso del cromosoma A, éste número varía dependiendo del número de hembras observadas en el total de las 20 preparaciones. El valor de q viene dado por la ecuación:

$$q = \frac{\sum C}{5k}$$

donde C es el número de veces que se ha observado el "puff" y k es el número de preparaciones analizadas.

En las tablas 2 a 6 se presentan estas frecuencias, para cada "puff" en cada estadio y en cada cromosoma. En el caso del cromosoma A se indica el número de cromosomas observados (n) por estadio. El orden de los "puffs" en las tablas es siempre el seguido por la ordenación cromosómica correspondiente.

El índice de actividad (B) definido por Pascual *et.al.*, (1985), nos permite medir, a partir de las frecuencias q , la actividad media en cada uno de los 12 estadios analizados, así como la participación de cada cromosoma en cada uno de los estadios. B se define como:

$$B = \frac{\sum q_i}{s}$$

donde q_i es la frecuencia del "puff" i , s el número total de secciones cromosómicas analizadas y n el total de "puffs" considerados.

De acuerdo con Kunze-Mühl y Müller (1958), los cromosomas A, J, U, E y O están definidos por 16, 19, 18, 21 y 25 secciones de mapa respectivamente, lo que da un total de 99 regiones para el genoma de *Drosophila*. La sección 100

corresponde al cromosoma puntiforme, que no ha sido considerado en nuestros análisis.

En la figura 8 se presentan gráficamente los valores del índice de actividad media por estadio (a) y del índice de actividad media por estadio y cromosoma (b). En el primer caso, s es igual al total de secciones cromosómicas (99); en el segundo, s es el número de secciones de cada cromosoma.

En *D. madeirensis*, el patrón de actividad génica muestra tres máximos, de magnitud similar, a lo largo del desarrollo, que corresponden con los estadios de **prepupa temprana** (4h), **prepupa media** (14h) y **prepupa tardía** (22h) (figura 8a). Además, en ningún momento se aprecia un fuerte descenso de la actividad, sino más bien se mantiene dentro de un mismo rango (0.068-0.125). La actividad más baja detectada corresponde a larvas de tercer estadio tardío.

Cuando se analiza la actividad génica por cromosoma (figura 8b), se observa claramente que **unos son mucho más activos que otros**. Mientras el cromosoma U es, con diferencia, el más activo durante toda la prepupa, el cromosoma A lo es en tercer estadio larvario tardío, aunque, en este caso, a corta distancia de los demás. En el cromosoma U se distinguen los tres picos de actividad característicos del patrón general: en prepupa temprana, en prepupa media y a finales de la prepupación. Le sigue en actividad el cromosoma E, con un máximo claro en prepupa media, aunque la actividad en los otros dos estadios es también relativamente alta. Los perfiles de los cromosomas A, J, y O aparecen en niveles de actividad más bajos dentro de un rango muy parecido entre ellos. Todos muestran su mayor expresión en el inicio de la prepupación (a excepción del cromosoma A, en tercer estadio larvario tardío) y en el inicio de la pupación, es decir, en el fin de la prepupa.

CROMOSOMA A

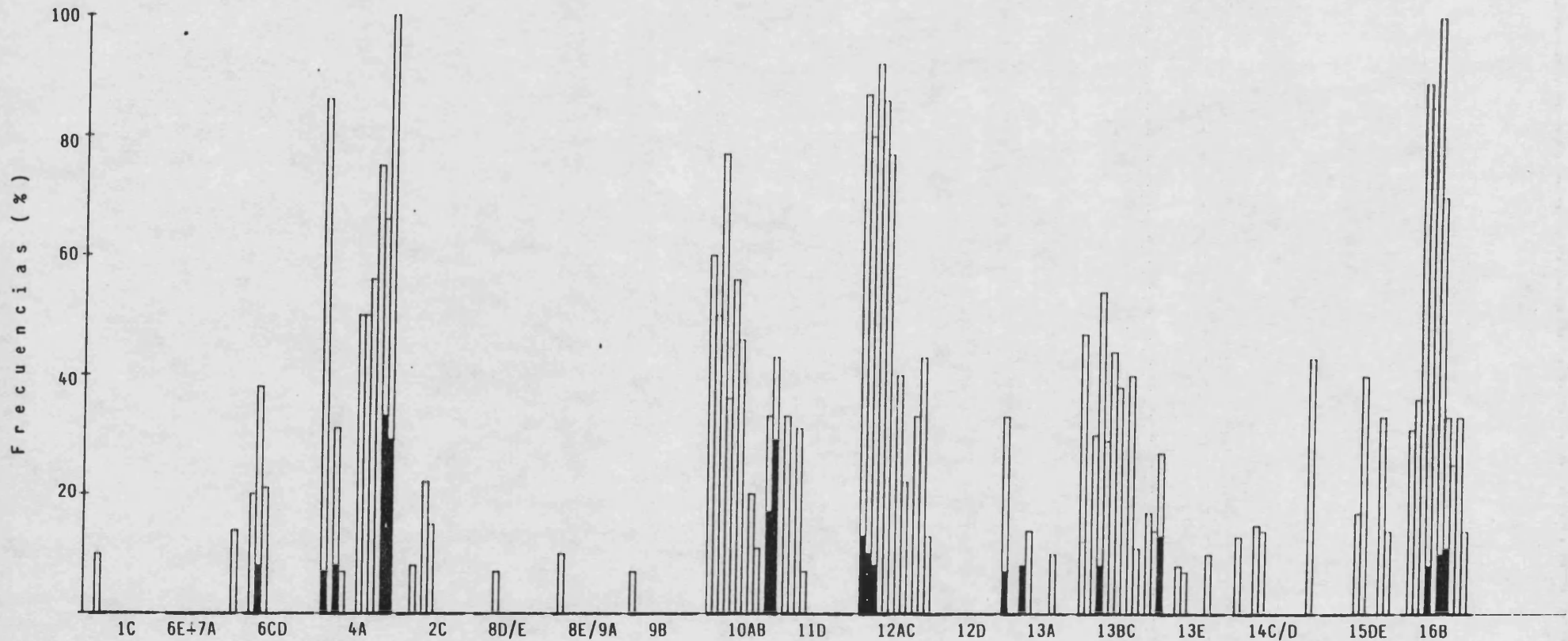


Figura 1.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma A en *D. madeirensis*. La altura de las barras representan el porcentaje de preparaciones (+) y (+/-) y las zonas sombreadas en negro, el de preparaciones (+), de cada "puff" en cada uno de los 12 estadios analizados.

CROMOSOMA J

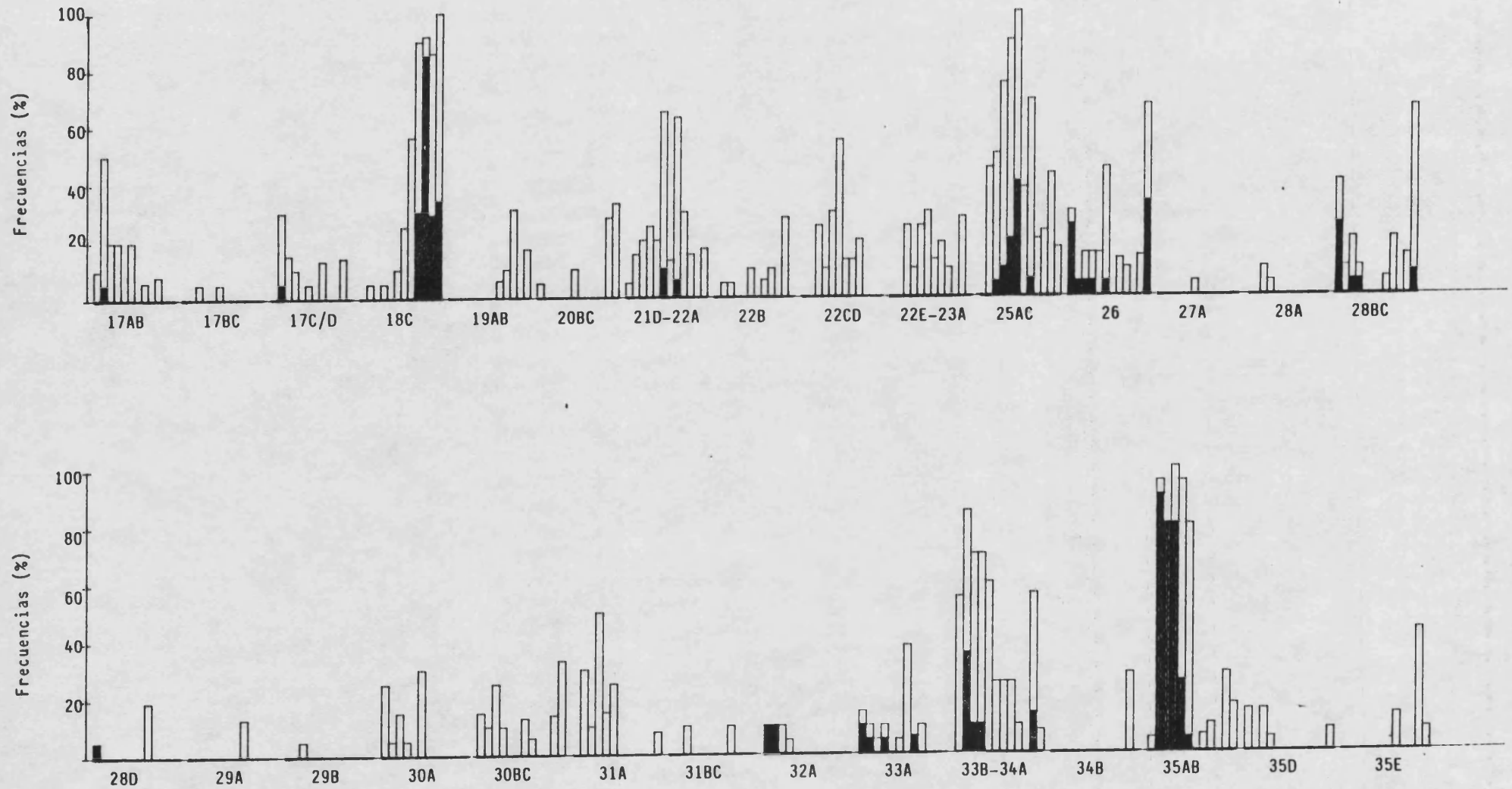


Figura 2.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma J en *D. madeirensis*.

CROMOSOMA U

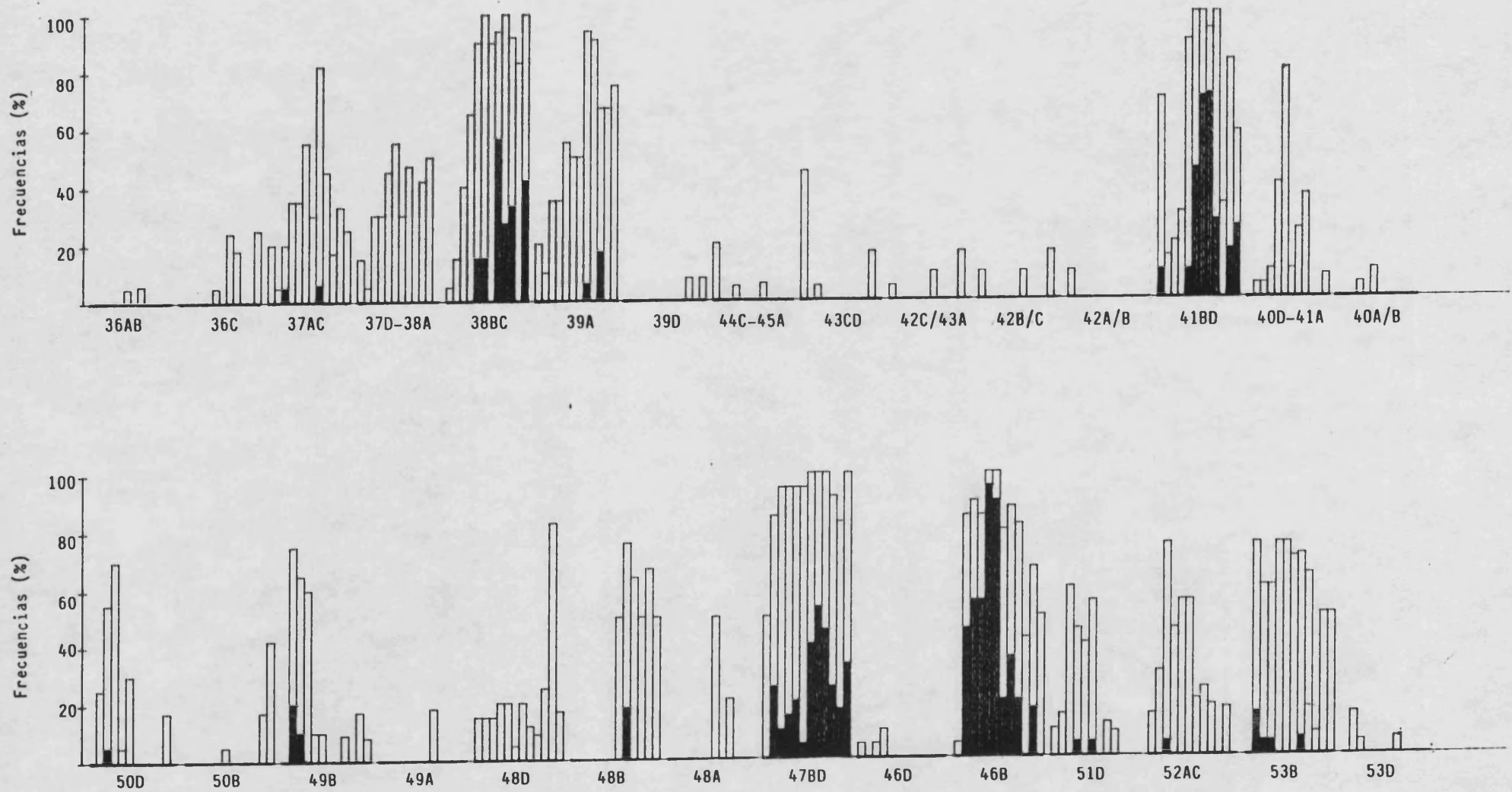


Figura 3.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma U en *D. madeirensis*.

CROMOSOMA E

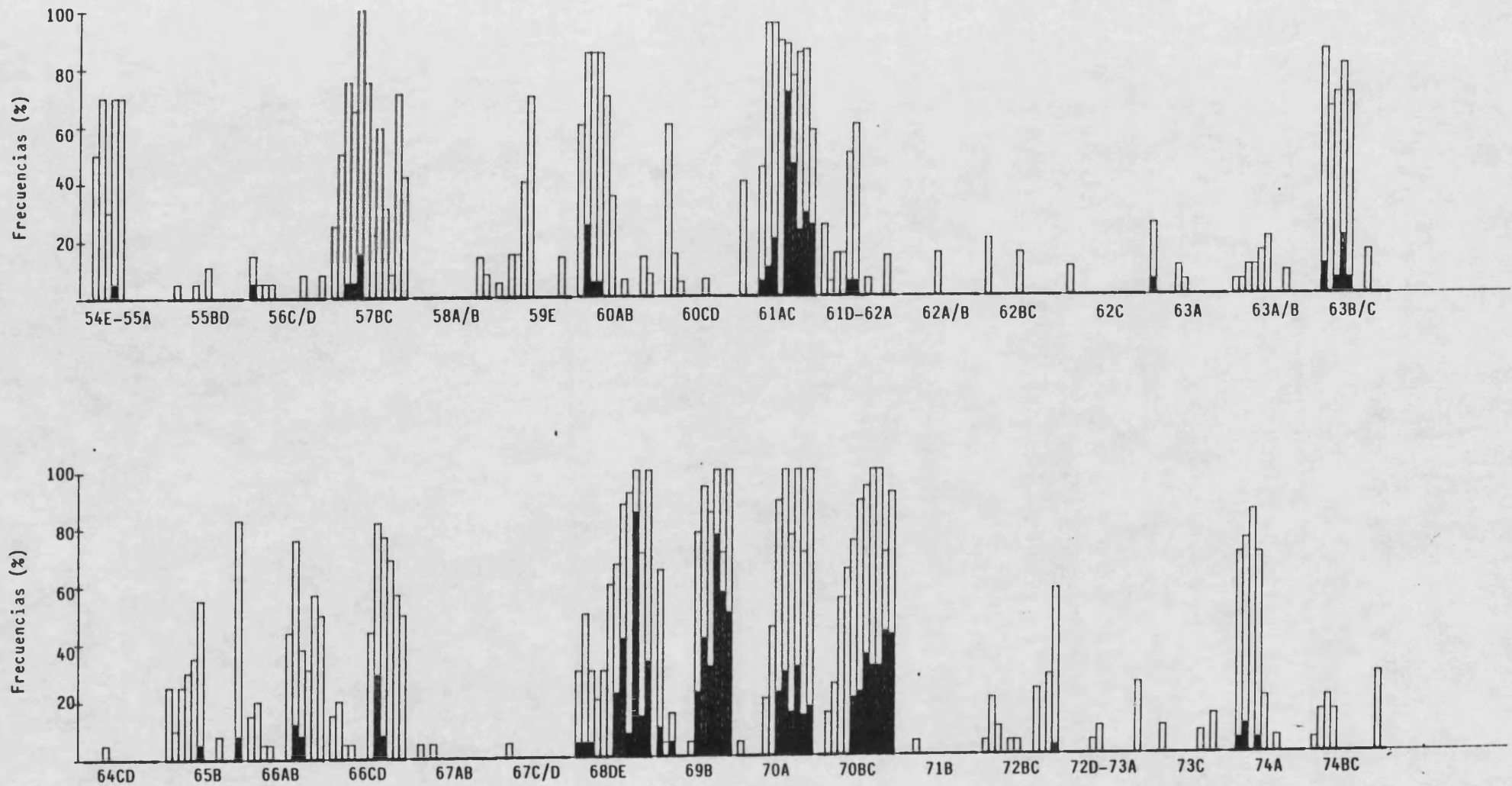


Figura 4.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma E en *D. madeirensis*.

CROMOSOMA O

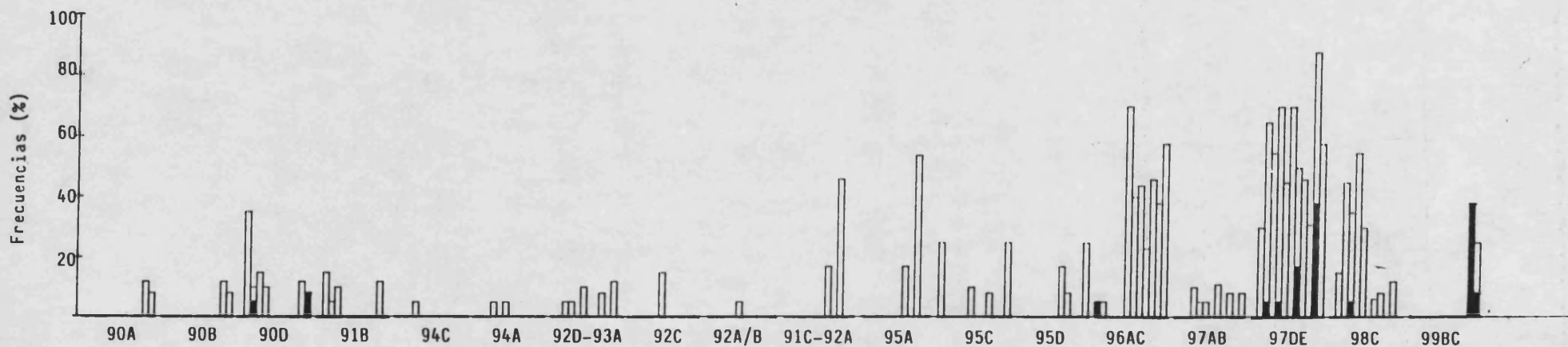
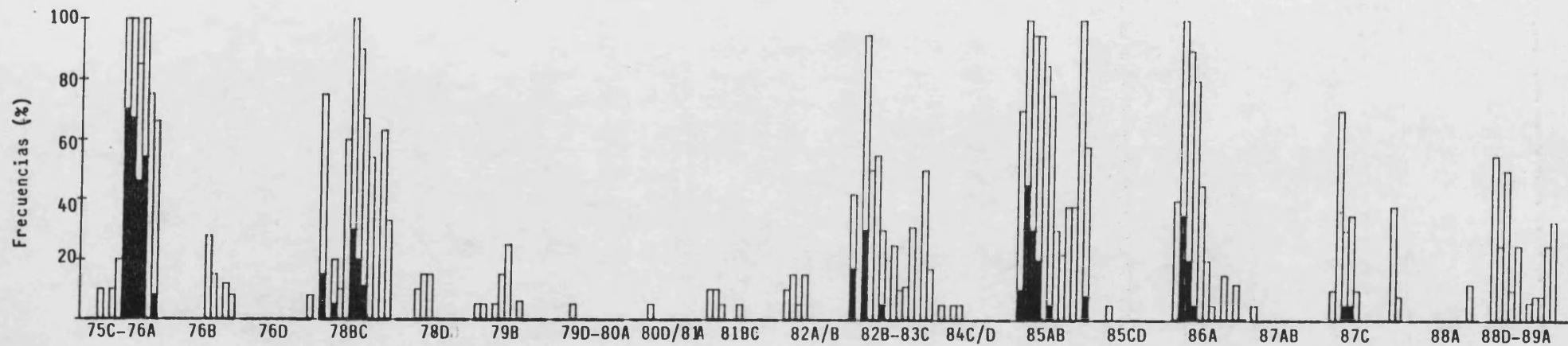


Figura 5.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma O en *D. madeirensis*.

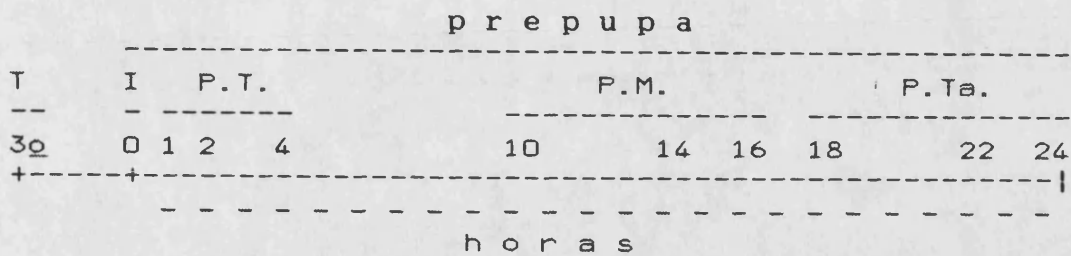


Figura 6.- Determinación esquemática de los intervalos de desarrollo en el estudio de los modelos de formación de "puffs". T: tercer estadio larvario tardío; I: inicio de la prepupación; P.T.: prepupa temprana; P.M.: prepupa media; P.Ta.: prepupa tardía.

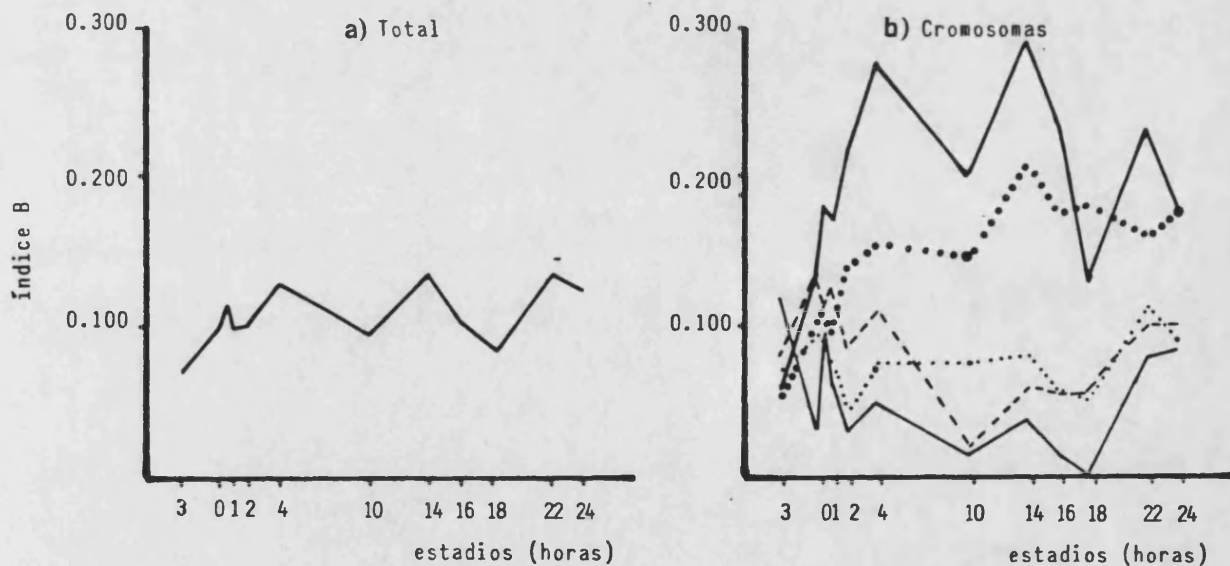


Figura 8.- Representación gráfica del índice de actividad génica B en *D. madeirensis*. (a) Actividad media por estadio (total); (b) Actividad media por estadio y cromosoma: cromosoma A (—); cromosoma J (----); cromosoma U (—); cromosoma E (.....); cromosoma O (.....).

Figura 7.- Modelos de expresión temporal de algunos loci en *D. madeirensis* (a: tercer estadio larvario tardío; b: inicio de la prepupación; c: prepupa temprana; d: prepupa media; e: prepupa tardía). Se incluyen los autorradiogramas de los "puffs" 35AB y 46B en el inicio de la prepupación.

FJ7

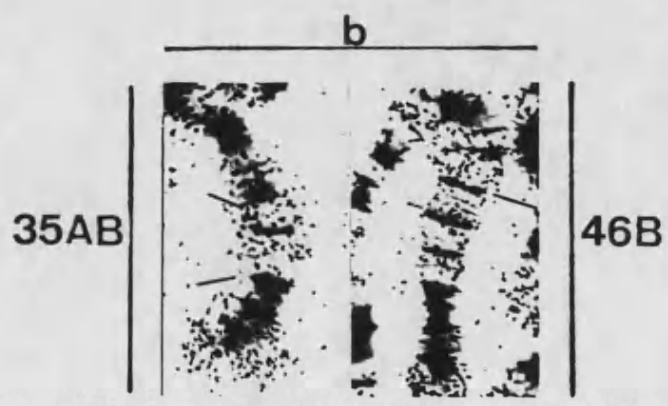
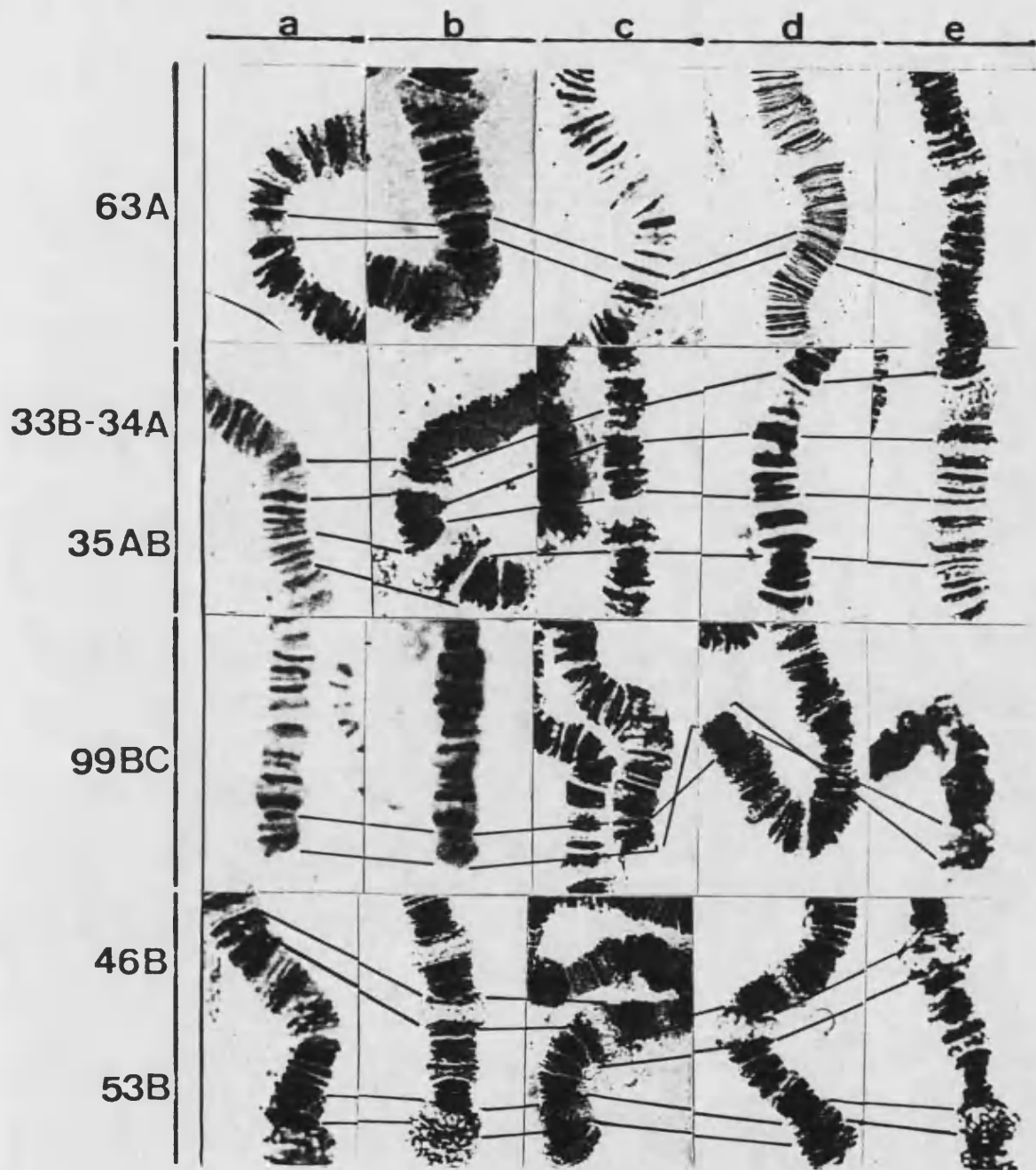


Tabla 1.- Clasificación de los "puffs" de *D.madeirensis* según su frecuencia máxima de preparaciones (+/-) y (+) en alguno de los doce estadios analizados. "Puffs" que forman el patrón característico ($\geq 75\%$); "puffs" de actividad media (25-75%) y "puffs" ocasionales ($\leq 25\%$).

	$\geq 75\%$	25-75%	$\leq 25\%$	
C r o m o s o m a s	A	4A, 10AB, 12AC, 16B	6CD, 11D, 13A, 13BC 13E, 15DE	1C, 6E-7A, 2C, 8D/E 8E/9A, 9B, 12D, 14C/D
	J	18C, 25AC, 33B-34A, 35AB	17AB, 17C/D, 19AB, 20BC, 21D-22A, 22B, 22CD, 22E-23A, 26, 28BC, 30A, 30BC, 31A, 33A, 34B, 35E	17B/C, 27A, 28A, 28D, 29A, 29B, 31BC 32A, 35D
	U	37AC, 38BC, 39A, 41BD, 40D-41A, 49B, 48D, 48B, 47BD, 46B 52AC, 53B	37D-38A, 43CD, 50D 50B, 48A, 51D	36AB, 36C, 39D, 44C-45A, 42C/43A, 42B/C, 42A/B, 40A/B 49A, 46D, 53D
	E	57BC, 60AB, 61AC, 63B/C, 65B, 66AB, 66CD, 68DE, 69A, 70A, 70BC, 74A	54E-55A, 59E, 60C/D 61D-62A, 63A, 72BC, 72D-73A, 74BC	55BD, 56C/D, 58A/B, 62A/B, 62BC, 62C, 63A/B, 64CD, 67AB 67C/D, 71B, 73C
	O	75C-76A, 78BC, 82B-83C, 85AB, 86A, 97DE	76B, 79B, 82A/B, 87C, 88D-89A, 90D, 91C-92A, 95A, 95C, 95D, 96AC, 98C, 99BC	76D, 78D, 79D-80A, 80D/81A, 81BC, 84C/D 85CD, 87AB, 88A, 90A, 90B, 91B, 94C, 94A, 92D-93A, 92C, 92A/B, 97AB

Tabla 2.- Valores q_i en el cromosoma A de *D. madeirensis*.

"puffs"	3 ⁰ n= 75	estadios analizados										
		0h	½h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
1C	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
6E-7A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.030
6CD	.0	.060	.200	.114	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
4A	.410	.0	.290	.030	.0	.0	.030	.060	.070	.0	.600	.600
2C	.0	.0	.015	.0	.040	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0
8D/E	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
8E/9A	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
9B	.013	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
10AB	.200	.080	.215	.090	.133	.110	.0	.040	.020	.0	.320	.400
11D	.120	.0	.060	.060	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
12AC	.373	.260	.323	.270	.110	.245	.0	.100	.020	.0	.080	.110
12D	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
13A	.186	.0	.076	.030	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0
13BC	.150	.040	.170	.090	.070	.030	.0	.040	.0	.0	.080	.060
13E	.187	.0	.080	.060	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0
14CD	.090	.0	.060	.070	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.140
15DE	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.120	.0	.0	.120	.0
16B	.0	.0	.030	.160	.090	.370	.130	.220	.160	.0	.040	.030

Tabla 3.- Valores q_i en el cromosoma J de *D. madeirensis*.

"puffs"	estadios analizados											
	3 ⁰	0h	½h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
17AB	.030	.190	.030	.030	.0	.030	.0	.010	.0	.010	.0	.0
17BC	.0	.0	.020	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0
17C/D	.0	.190	.040	.050	.0	.010	.0	.020	.0	.0	.030	.0
18C	.0	.010	.0	.010	.0	.020	.100	.240	.520	.860	.570	.630
19AB	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.040	.080	.0	.050
20BC	.020	.0	.0	.0	.0	.030	.0	.0	.040	.0	.060	.130
21D-22A	.010	.060	.060	.090	.050	.310	.020	.300	.060	.010	.140	.100
22B	.0	.010	.010	.0	.0	.020	.0	.010	.020	.0	.030	.0
22CD	.0	.0	.050	.030	.080	.190	.020	.025	.060	.0	.0	.0
22E-23A	.0	.0	.060	.020	.060	.090	.020	.040	.020	.0	.060	.0
25AC	.0	.160	.190	.390	.570	.670	.060	.220	.040	.060	.230	.030
26	.260	.060	.100	.080	.060	.170	.0	.025	.0	.0	.110	.530
27A	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0
28A	.0	.0	.040	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
28BC	.250	.050	.130	.060	.0	.0	.0	.010	.080	.0	.090	.310
28D	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.040	.0	.0	.0	.0
29A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0
29B	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
30A	.060	.010	.030	.020	.0	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0
30BC	.010	.020	.060	.020	.0	.030	.010	.010	.0	.0	.030	.030
31A	.0	.060	.010	.150	.030	.060	.0	.0	.0	.0	.0	.050
31BC	.0	.0	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.040	.0	.0	.0
32A	.080	.100	.040	.050	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
33A	.100	.090	.030	.070	.0	.010	.100	.060	.020	.0	.0	.0
33B-34A	.090	.640	.380	.360	.120	.070	.0	.010	.060	.0	.260	.0
34B	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.060	.0
35AB	.020	.940	.800	.930	.620	.320	.0	.010	.020	.0	.090	.030
35D	.040	.0	.050	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020
35E	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.170	.020

Tabla 4.- Valores q_i en el cromosoma U de *D. madeirensis*.

"puffs"	estadios analizados											
	3 ⁰	0h	½h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
36AB	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.050	.0	.0	.0	.0
36C	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.070	.040	.0	.0	.050
37AC	.070	.010	.120	.080	.160	.200	.060	.360	.110	.070	.130	.070
37D-38A	.070	.010	.110	.080	.190	.230	.100	.120	.0	.080	.200	.0
38BC	.030	.050	.160	.190	.490	.670	.380	.820	.700	.580	.500	.780
39A	.040	.020	.090	.080	.160	.190	.080	.300	.345	.350	.370	.330
39D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.020
44C-45A	.020	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0
43CD	.150	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
42C/43A	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.070	.0
42B/C	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.070	.0
42A/B	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
41BD	.340	.040	.070	.080	.510	.850	.940	.850	.760	.070	.670	.400
40D-41A	.0	.010	.010	.020	.120	.400	.020	.060	.110	.0	.0	.020
40A/B	.0	.0	.0	.010	.0	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0
50D	.0	.080	.240	.280	.010	.080	.0	.0	.0	.0	.030	.0
50B	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.100	.150
49B	.0	.470	.340	.220	.020	.020	.0	.0	.020	.0	.030	.020
49A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.060	.0	.0	.0	.0
48D	.030	.040	.030	.040	.040	.020	.040	.040	.020	.050	.160	.070
48B	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.120	.470	.300	.200	.370	.280
48A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.220	.0	.110	.0	.0	.0
47BD	.160	.520	.520	.530	.600	.530	.720	.880	.760	.630	.600	.580
46D	.010	.0	.020	.020	.000	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
46B	.010	.690	.770	.770	.970	.970	.480	.600	.600	.200	.430	.260
51D	.040	.050	.200	.170	.130	.220	.0	.060	.020	.0	.0	.0
52AC	.030	.060	.230	.160	.170	.210	.040	.070	.060	.0	.030	.0
53B	.0	.340	.290	.270	.330	.320	.340	.400	.240	.050	.330	.150
53D	.0	.030	.010	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0

Tabla 6.- Valores q_i en el cromosoma O de *D. madeirensis*.

"puffs"	estadios analizados											
	3 ⁰	0h	½h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
75C-76A	.0	.0	.020	.0	.030	.050	.820	.850	.700	.810	.450	.380
76B	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.030	.010	.0	.020	.030
76D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010
78BC	.400	.0	.090	.020	.210	.700	.520	.300	.180	.0	.220	.080
78D	.0	.0	.0	.040	.020	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0
79B	.010	.030	.0	.010	.020	.050	.0	.010	.0	.0	.0	.0
79D-80A	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
80D/81A	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
81BC	.030	.020	.010	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0
82A/B	.050	.040	.010	.050	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.250
82B-83C	.720	.210	.090	.070	.020	.050	.020	.020	.050	.0	.220	.030
84C/D	.010	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
85AB	.280	.710	.570	.520	.360	.220	.120	.080	.140	.050	.480	.350
85CD	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
86A	.110	.640	.440	.280	.060	.040	.020	.0	.010	.0	.125	.0
87AB	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
87C	.050	.220	.130	.160	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.020
88A	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.050	.0
88D-89A	.0	.210	.050	.140	.010	.070	.0	.010	.010	.010	.070	.130
90A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.050	.030
90B	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.030
90D	.0	.160	.070	.060	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.080
91B	.0	.010	.040	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0
94C	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
94A	.0	.0	.0	.010	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0
92D-93A	.0	.0	.010	.0	.0	.040	.0	.0	.010	.0	.020	.0
92C	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0
92A/B	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0
91C-92A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.0	.140	.0	.0
95A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.070	.0	.170	.0	.0
95C	.060	.0	.0	.0	.0	.050	.0	.0	.010	.0	.0	.080
95D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.040	.010	.0	.0	.070
96AC	.050	.0	.0	.0	.0	.260	.140	.130	.080	.080	.100	.230
97AB	.0	.0	.010	.0	.010	.010	.0	.030	.0	.010	.0	.020
97DE	.0	.100	.230	.190	.210	.170	.240	.300	.120	.050	.600	.230
98C	.0	.030	.200	.100	.120	.090	.0	.020	.010	.0	.050	.0
99BC	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.400	.160

1.2. Patrones temporales de actividad génica en *Drosophila guanche*.

Los resultados que se presentan en este capítulo se han obtenido del análisis de 11 estadios de desarrollo (tercer estadio larvario tardío, prepupa 0h, prepupa 1h, prepupa 2h, prepupa 4h, prepupa 10h, prepupa 14h, prepupa 16h, prepupa 18h, prepupa 22h y prepupa 24h) de los cuales solo cuatro (prepupas de 4h, 16h, 22h y 24h) se presentan por primera vez en este trabajo. El resto de estadios fueron objeto de estudio de mi Tesis de Licenciatura (Moltó, 1986; Moltó et al., 1988). Con el fin de abordar la descripción de los patrones de *D. guanche* de la misma forma que se ha hecho para *D. madeirensis*, incluimos todos los estadios citados. Esta descripción será más breve puesto que la metodología empleada es la misma en ambos casos.

1.2.1. Descripción de los "puffs".

En la cepa TF2 de *D. guanche* se han contado un total de 146 regiones cromosómicas que muestran estado de "puff" en, al menos, uno de los estadios analizados. Se distribuyen por el genoma de la forma siguiente:

Cromosoma A (20 "puffs"): 1C, 7BC, 6E-7A, 2C, 5D, 6CD, 8D/E, 4A, 8E/9A, 10AB, 13A, 12AC, 11D, 13BC, 13E, 14BC, 14CD, 15DE, 16D y 16B.

Cromosoma J (29 "puffs"): 17BC, 17C/D, 18C, 19AB, 20A, 20BC, 21D-22A, 22B, 22CD, 22E-23A, 24BD, 25AC, 26, 27A, 28BC, 28D, 29A, 29B, 30A, 33B-34A, 33A, 32B, 31C/D, 31BC, 31A, 30BC, 35AB, 35C y 35D.

Cromosoma U (25 "puffs"): 37AC, 37D-38A, 38BC, 39A, 39D, 45D/E, 44C-45A, 43CD, 41BD, 40D-41A, 40A/B, 50D, 50B, 49B, 48D, 48B, 48A, 47BD, 46D, 46C, 46B, 51D, 52AC, 53B y 53D.

Cromosoma E (37 "puffs"): 54C/D, 54E-55A, 55BD, 56AB, 57BC, 58A/B, 58BC, 59A/B, 66AB, 65B, 64C/D, 63C, 63B/C, 63A/B, 63A, 62BC, 61D-62A, 61AC, 60C/D, 60AB, 59E, 66D, 67AB, 72BC, 71C/72A, 70D-71AB, 70BC, 70A, 69B, 68DE, 68AB, 67D-72C, 72D-73A, 73B/C, 73C, 74A y 74BC.

Cromosoma O (35 "puffs"): 75C-76A, 78BC, 79B, 79D-80A, 80BC, 80D/81A, 81BC, 81C/D, 81D-82A, 82A/B, 82B-83C, 84A/B, 84C/D, 91B, 90D, 90B, 90A, 88D, 88D-89A, 88A, 87C, 87AB, 86A, 85E, 85CD, 85AB, 92D-93A, 92A/B, 91C-92A, 95C, 95D, 96AC, 97DE, 98C y 99BC.

Al igual que *D. madeirensis*, *D. guanche* presenta un único anillo de Balbiani permanente, localizado en la sección 24 del cromosoma J. En este caso, la enumeración de los "puffs" se ha hecho siguiendo la ordenación correspondiente de los cromosomas de *D. guanche*. Tampoco ha sido considerado el cromosoma "dot" en estos análisis.

Para una descripción detallada de cómo las regiones forman "puff" en *D. guanche*, ver Moltó (1986).

1.2.2. Modelos de formación de "puffs".

Las figuras 9 a 13 muestran los histogramas de frecuencias de los "puffs" de *D. guanche* para cada cromosoma. De acuerdo con ellos, se definen los 8 modelos de expresión:

Modelo I. "Puffs" activos en el tercer estadio larvario tardío.

Modelo II. "Puffs" activos en el inicio de la prepupación.

Modelo III. "Puffs" activos durante la prepupa temprana.

Modelo IV. "Puffs" activos durante la prepupa media.

Modelo V. "Puffs" activos durante la prepupa tardía.

Modelo VI. "Puffs" activos en el inicio y fin de la prepupación.

Modelo VII. "Puffs" activos en los estadios de prepupa.

Modelo VIII. "Puffs" activos a lo largo del desarrollo.

En la figura 14 se presentan algunos ejemplos de modelos de formación de "puffs", como son el del 13A (característico del tercer estadio larvario tardío); 54E-55A (de inicio de la prepupación); 26 y 28BC (modelo "croissant") y 51D, 52AC (activos a lo largo de todo el desarrollo). Se incluyen autorradiogramas correspondientes al tercer estadio larvario tardío, mostrándose la actividad de los "puffs" presentes en dicho momento del desarrollo (13A, 26 y 28BC).

1.2.3. Patrón característico de *D. guanche*.

Los "puffs" que constituyen el patrón característico de *D. guanche*, es decir, aquellos con frecuencias entre 75-100%, constituyen una fracción importante del total de "puffs" descritos en esta especie, alrededor de un 33%. Generalmente se trata de "puffs" de gran tamaño y son los que presentan un mayor número de preparaciones (+).

Los "puffs" de actividad media (con frecuencias entre 25-75%) y los ocasionales (con frecuencias inferiores al 25%) están representados por fracciones similares, 32% y 35%, respectivamente. Algunos de los "puffs" con actividad moderada, son también de gran tamaño, mientras que los



ocasionales son todos de pequeño tamaño y no suelen aparecer nunca en los 5 núcleos examinados de la misma preparación.

En la tabla 7 se muestra el conjunto de "puffs" pertenecientes a cada uno de los 3 grupos. Se especifican para cada cromosoma. La enumeración de los mismos se da siguiendo el orden específico de bandas de los cromosomas de *D. guanche*.

1.2.4. Frecuencias de aparición de "puffs".

Las tablas 8 a 12 presentan las frecuencias qi (cociente entre el número de veces que se observa el "puff" i y el total de observaciones realizadas) en cada estadio y en cada cromosoma. En el caso del cromosoma A, se indica el número de cromosomas observados (n) por estadio, puesto que su análisis depende del número de preparaciones que corresponden a hembras. Para el resto de los cromosomas se han realizado 100 observaciones por estadio.

Los valores de los índices de actividad media por estadio y de actividad media por estadio y cromosoma se muestran gráficamente en la figura 15.

El patrón de actividad de *D. guanche*, muestra un pico principal en el inicio de la prepupación, seguido de un fuerte descenso de la actividad en prepupa temprana (1h), recuperándose ligeramente una hora después (figura 15a). Los estadios intermedios y finales son de actividad moderada, con un suave pico en prepupa 18h. Merece señalarse que la actividad en tercer estadio larvario tardío es bastante elevada, superior a todos los estadios de prepupa, a excepción de su inicio.

Respecto de la actividad de cada cromosoma, no hay una clara dominancia de uno de ellos sobre los demás a lo largo de todo el desarrollo, más bien se observa que determinados cromosomas son más activos en determinados estadios (figura 15b). Por ejemplo, el cromosoma A en tercer estadio larvario tardío y prepupa 10h; el cromosoma U en inicios de la prepupación y prepupa temprana, etc, etc. Sin embargo, los perfiles de cada cromosoma siguen el mismo patrón: presentan tres máximos en la actividad (en inicios de la prepupación, a excepción del cromosoma A que lo tiene en el estadio anterior; prepupa 2h y prepupa media) y un declive de la misma a finales del desarrollo, menos para el cromosoma O que es cuando muestra, también, su mayor expresión.

CROMOSOMA A

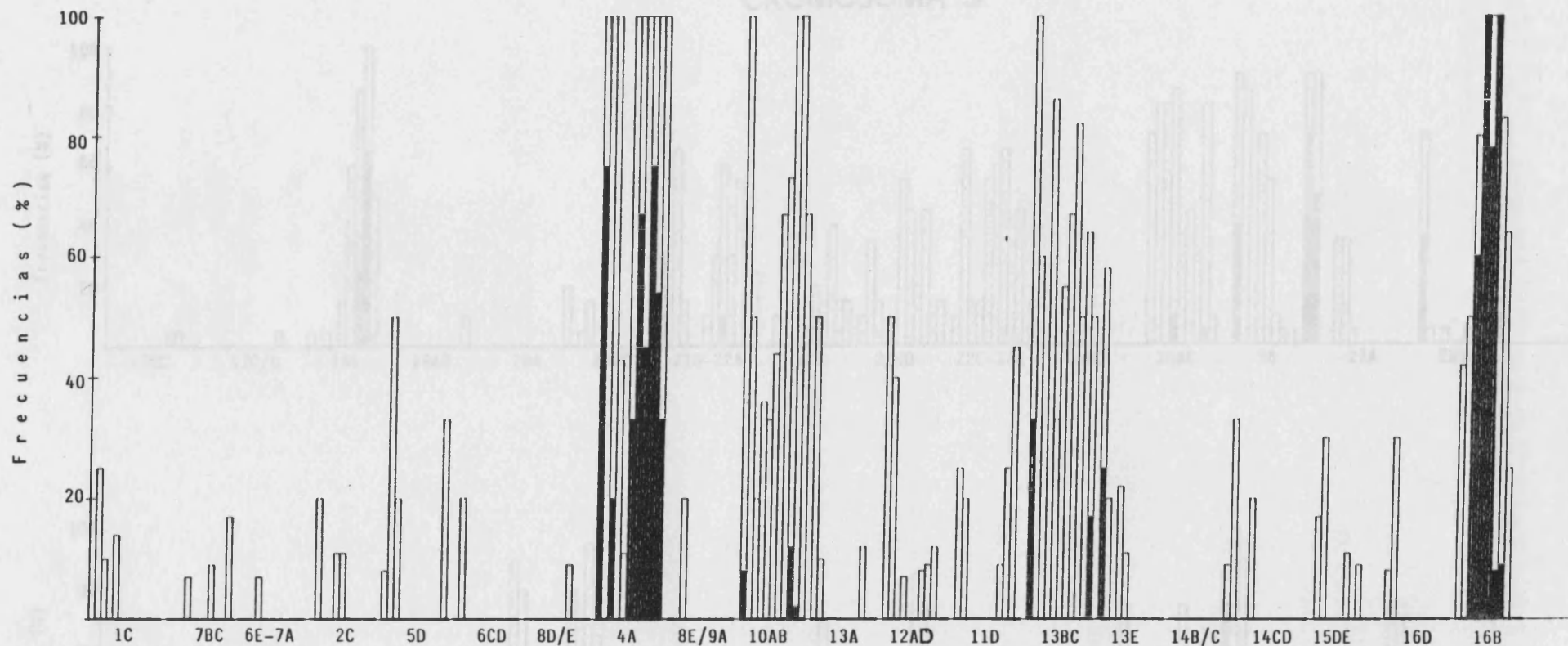


Figura 9.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma A en *D. guanche*. La altura de las barras representan el porcentaje de preparaciones (+) y (+/-) y las zonas sombreadas en negro, el de preparaciones (+), de cada "puff" en cada uno de los 11 estadios analizados.

guanche.

CROMOSOMA J

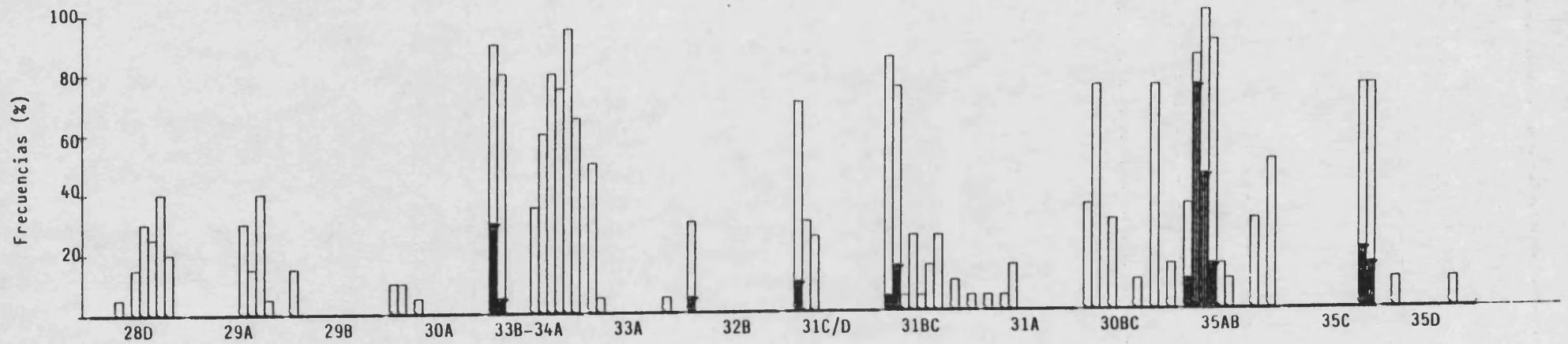
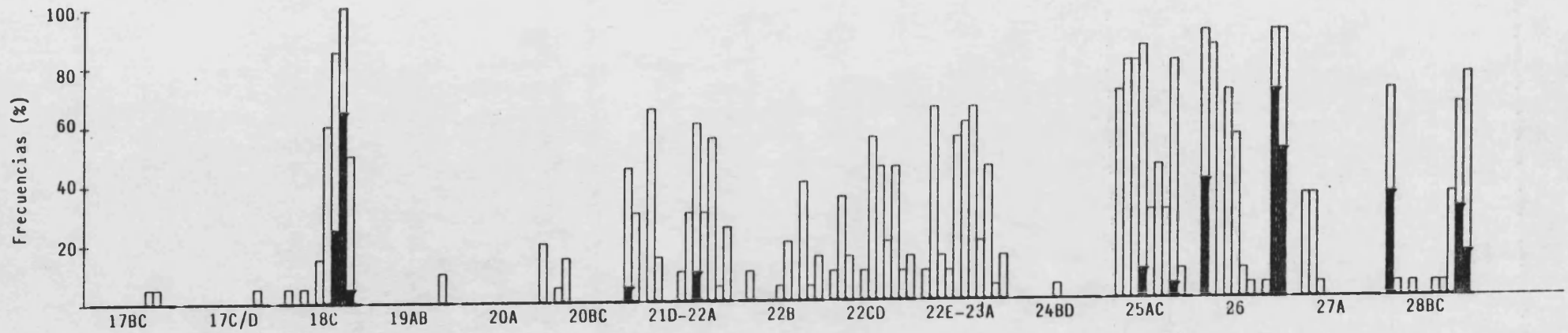


Figura 10.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma J en *D. guanche*.

CROMOSOMA U

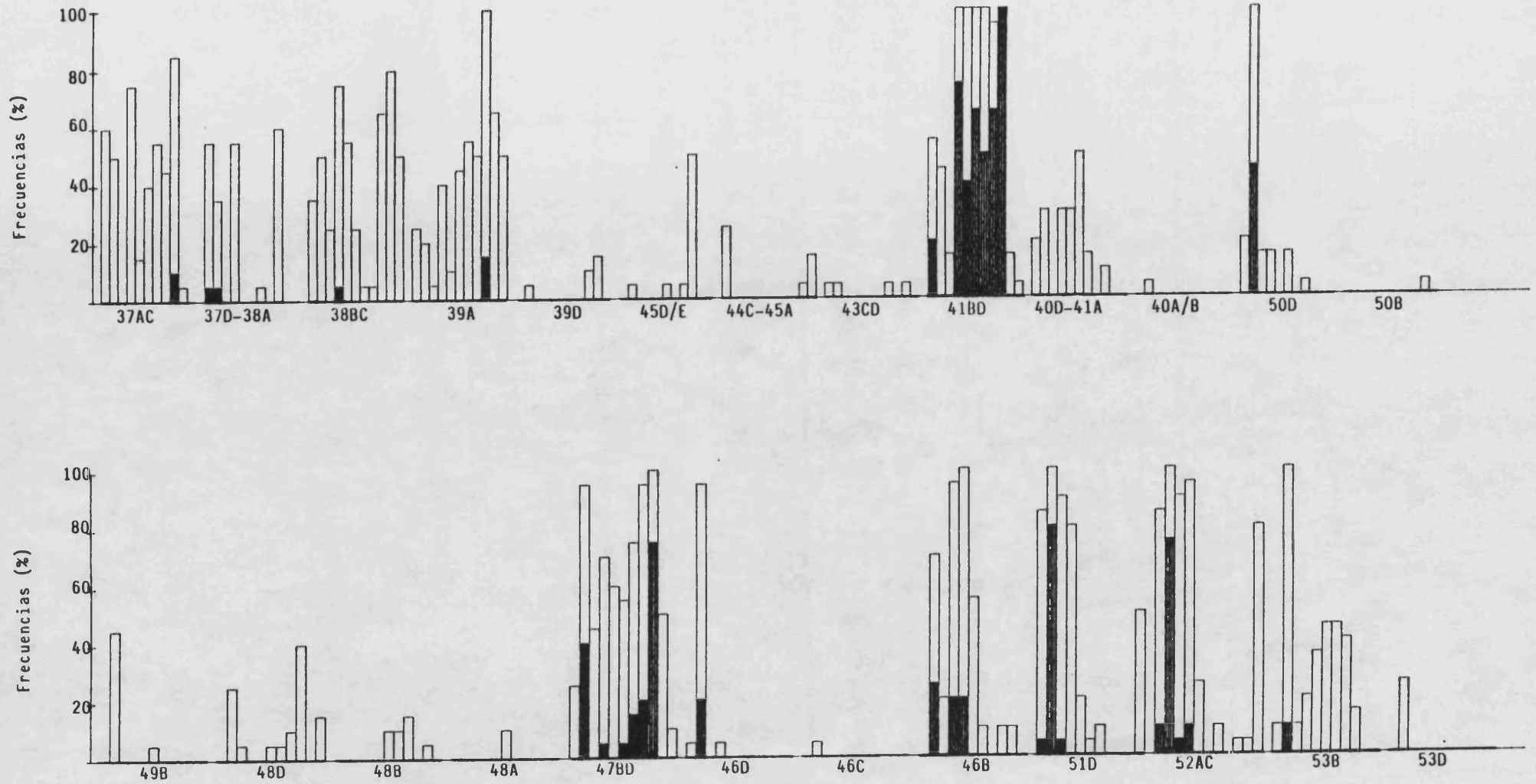


Figura 11.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma U en *D. guanche*.

CROMOSOMA E

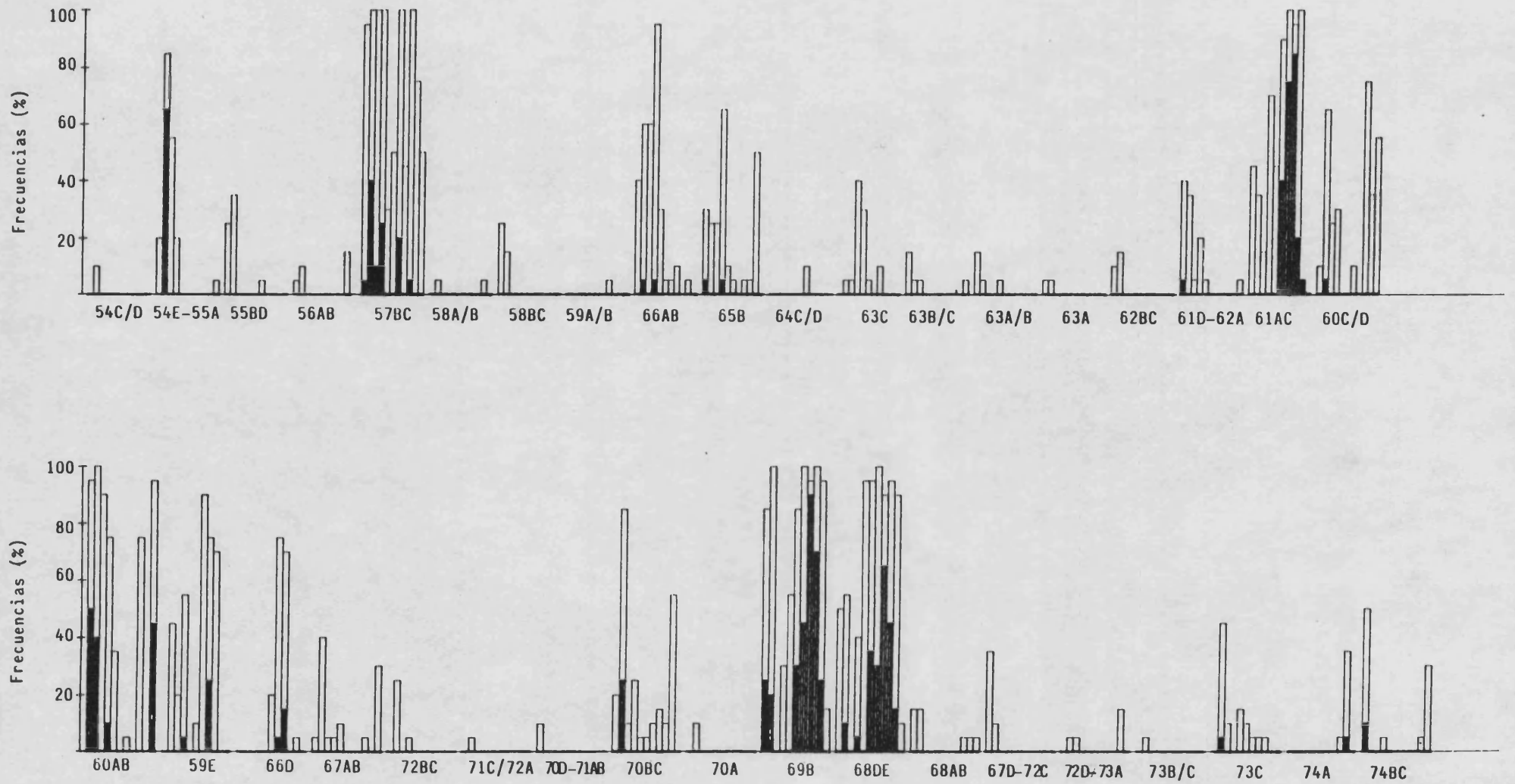
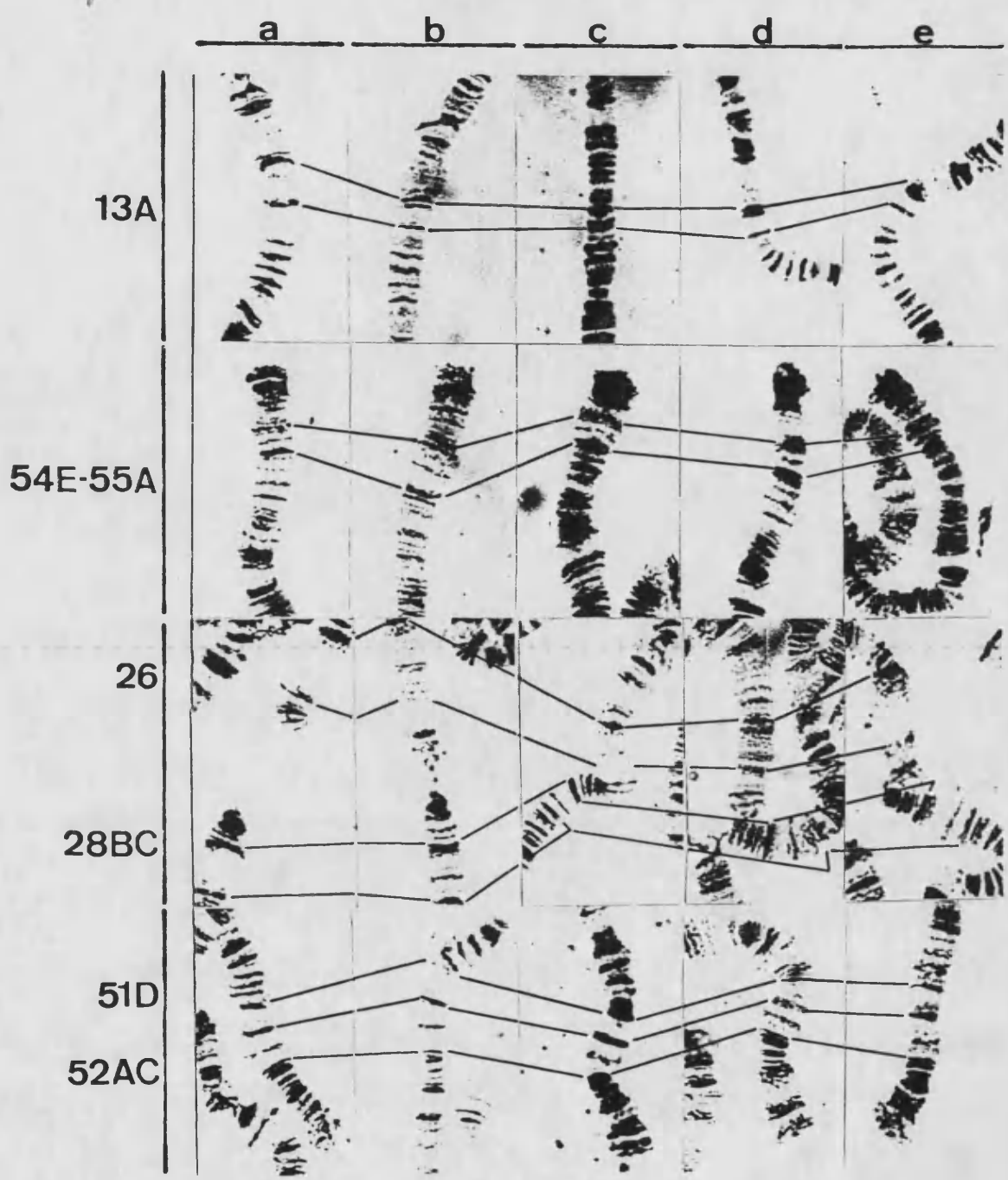


Figura 12.- Histograma de frecuencias de los "puffs" del cromosoma E en *D. guanche*.

Figura 14.- Modelos de expresión temporal de algunos loci en *D. guanche* (a: tercer estadio larvario tardío; b: inicio de la prepupación; c: prepupa temprana; d: prepupa media; e: prepupa tardía). Se incluyen los autorradiogramas de los "puffs" 13A, 26 y 28BC en tercer estadio larvario tardío.

Fig 14



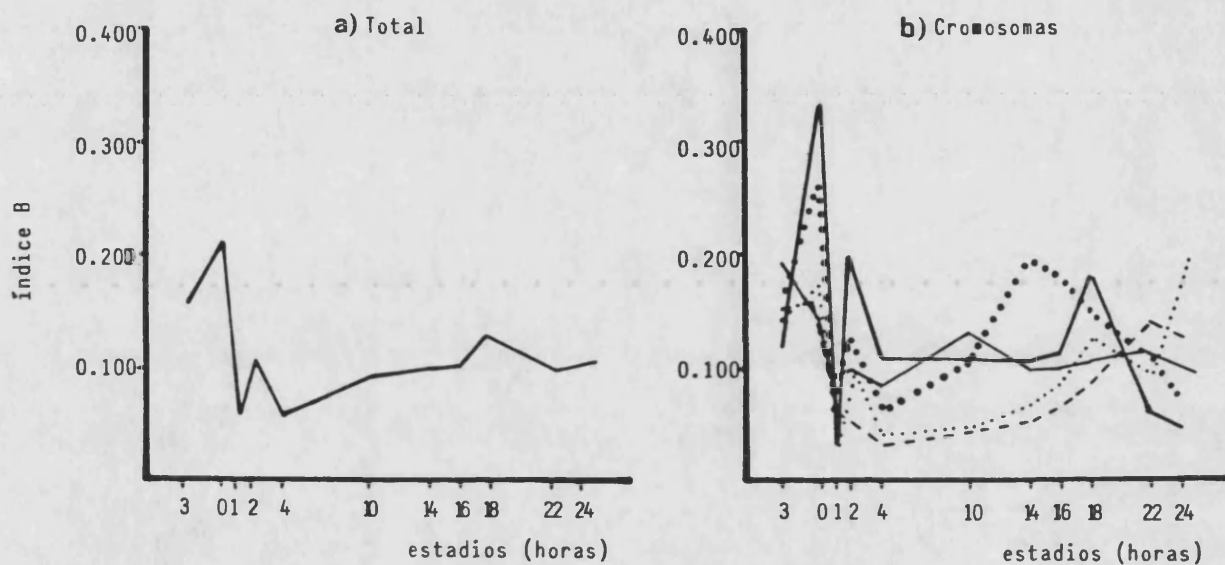


Figura 15.- Representación gráfica del índice de actividad génica B en *D. guanche*. (a) Actividad media por estadio (total); (b) Actividad media por estadio y cromosoma: cromosoma A (—); cromosoma J (- - - - -); cromosoma U (— — — — —); cromosoma E (· · · · ·); cromosoma O (· · · · ·).

Tabla 7.- Clasificación de los "puffs" de *D.guanche* según su frecuencia máxima de preparaciones (+/-) y (+) en alguno de los doce estadios analizados. "Puffs" que forman el patrón característico ($\geq 75\%$); "puffs" de actividad media (25-75%) y "puffs" ocasionales ($\leq 25\%$).

	$\geq 75\%$	25-75%	$\leq 25\%$	
C r o m o s o m a s O	A	4A, 10AB, 13BC, 16B	1C, 5D, 13A, 12AC, 11D, 13E, 14B/C, 15DE, 16D	7BC, 6E-7A, 2C, 6CD 8D/E, 8E/9A, 14C/D
	J	18C, 25AC, 26, 28BC 33B-34A, 31BC, 30BC 35AB, 35C	20BC, 21D-22A, 22B 22CD, 22E-23A, 27A, 28D, 29A, 33A, 32B, 31C/D	17B/C, 17C/D, 19AB, 20A, 24BD, 29B, 30A 31A, 35D
	U	37AC, 38BC, 39A, 41BD, 50D, 47BD, 46D, 46B, 51D, 52AC 53B	37D-38A, 45D/E, 44C-45A, 40D-41A, 49B, 48D, 53D	39D, 43CD, 40A/B, 50B, 48B, 48A, 46C
	E	54E-55A, 57BC, 66AB 61AC, 60C/D, 60AB, 59E, 66CD, 70BC, 69B, 68DE	55BD, 58BC, 65B, 63C, 61D-62A, 67AB, 72BC, 67D-72C, 73C, 74A, 74BC	54C/D, 56AB, 58A/B, 59A/B, 64C/D, 63B/C 63A/B, 63A, 62BC, 71C/72A, 70D-71AB, 70A, 68AB, 72D-73A, 73B/C
	O	82B-83C, 84A, 90D, 90A, 88D, 87C, 86A, 85E, 84AB, 92A/B, 91C-92A, 97DE, 98C, 99BC	78BC, 81C/D, 82A/B, 91B, 88D-89A, 92D-93A, 95C, 96AC ,	75C-76A, 79B, 79D-80A, 80BC, 80D/81A, 81BC, 81D-82A, 84C/D, 90B, 88A, 87AB, 85CD, 95D

Tabla 8.- Valores q_i en el cromosoma A de *D. guanche*.

"puffs"	estadios analizados										
	3 ⁰ n= 60	0h 50	1h 25	2h 70	4h 45	10h 45	14h 60	16h 55	18h 40	22h 55	24h 30
1C	.100	.040	.0	.014	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
7BC	.0	.0	.0	.014	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.030
6E-7A	.0	.0	.0	.014	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
2C	.0	.040	.0	.0	.070	.022	.0	.0	.0	.0	.0
5D	.020	.240	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.100
6CD	.0	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
8D/E	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0
4A	.866	.440	.720	.170	.020	.770	.900	.840	.950	.840	.600
8E/9A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
10AB	.416	.120	.0	.100	.070	.110	.220	.180	.580	.380	.330
13A	.130	.060	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
12AD	.200	.080	.0	.014	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0
11D	.070	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.075	.270	.0
13BC	.730	.380	.0	.270	.110	.130	.120	.240	.100	.330	.330
13E	.380	.100	.0	.030	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0
14BC	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.040
14CD	.0	.060	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
15DE	.030	.100	.0	.0	.0	.020	.0	.020	.0	.0	.0
16D	.020	.140	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
16B	.030	.420	.600	.999	.955	.999	.380	.240	.030	.0	.0

Tabla 9.- Valores qi en el cromosoma J de *D. guanche*.

"puffs"	estadios analizados										
	3 ⁰	0h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
17B/C	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.010	.0	.0
17C/D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0
18C	.0	.010	.0	.010	.0	.030	.250	.590	.850	.230	.0
19AB	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
20A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.060
20BC	.010	.030	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.220	.070
21D-22A	.110	.040	.0	.0	.010	.100	.180	.060	.010	.0	.070
22B	.0	.030	.0	.0	.0	.010	.020	.0	.0	.0	.040
22CD	.010	.080	.020	.0	.020	.140	.120	.030	.0	.010	.040
22E-23A	.010	.170	.0	.030	.070	.180	.080	.030	.0	.0	.040
24BD	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0
25AC	.0	.230	.150	.260	.360	.070	.180	.110	.320	.040	.0
26	.560	.230	.0	.050	.080	.0	.0	.0	.0	.790	.690
27A	.0	.040	.040	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
28BC	.510	.010	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.460	.530
28D	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0
29A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.040	.0	.0
29B	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
30A	.020	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
33B-34A	.610	.360	.0	.0	.0	.170	.120	.300	.130	.510	.200
33A	.110	.010	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.0
32B	.140	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
31C/D	.0	.350	.010	.060	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
31BC	.420	.430	.010	.060	.0	.020	.030	.0	.010	.0	.0
31A	.010	.0	.010	.050	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
30BC	.040	.120	.0	.040	.0	.0	.020	.0	.100	.0	.020
35AB	.230	.790	.760	.320	.0	.040	.0	.0	.0	.0	.080
35C	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.350	.470
35D	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0

Tabla 12.- Valores qi en el cromosoma O de *D. guanche*.

"puffs"	estadios analizados										
	3 ⁰	0h	1h	2h	4h	10h	14h	16h	18h	22h	24h
75C-76A	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.010	.0	.0
78BC	.070	.010	.0	.0	.010	.020	.050	.070	.030	.0	.0
79B	.0	.020	.0	.0	.0	.010	.0	.010	.0	.0	.0
79D-80A	.020	.010	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0
80BC	.0	.050	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.0	.0	.0
80D/81A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.040
81BC	.060	.0	.0	.0	.0	.020	.010	.030	.0	.0	.0
81C/D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.080	.090	.010	.0	.0
81D-82A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.030	.0	.010
82A/B	.330	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.040	.040
82B-83C	.590	.060	.0	.070	.020	.250	.230	.160	.060	.0	.070
84A/B	.470	.0	.0	.020	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.010
84C/D	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.040
91B	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.090
90D	.020	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.050	.680
90B	.020	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
90A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.800	.960
88D	.0	.0	.0	.350	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
88D-89A	.010	.060	.0	.020	.170	.060	.0	.050	.0	.0	.0
88A	.0	.0	.0	.010	.020	.0	.0	.020	.0	.0	.0
87C	.140	.290	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.020	.040	.710
87AB	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
86A	.320	.860	.050	.090	.0	.0	.0	.020	.060	.010	.030
85E	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.010	.020	.210	.010	.0
85CD	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.050
85AB	.620	.890	.290	.620	.050	.100	.070	.190	.490	.0	.170
92D-93A	.030	.210	.0	.0	.0	.0	.100	.010	.030	.0	.110
92A/B	.0	.080	.0	.030	.0	.0	.120	.300	.660	.110	.010
91C-92A	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.030	.070	.580	.140	.030
95C	.040	.010	.010	.030	.080	.0	.0	.0	.0	.0	.0
95D	.010	.0	.020	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
96AC	.070	.070	.0	.010	.130	.010	.0	.010	.0	.250	.140
97DE	.350	.510	.0	.450	.210	.740	.790	.930	.980	.650	.640
98C	.180	.880	.630	.480	.130	.030	.040	.0	.010	.0	.130
99BC	.060	.190	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.070	.620

1.3. Análisis comparativo entre los patrones de actividad de *Drosophila subobscura*, *Drosophila guanche* y *Drosophila madeirensis*.

Los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, muestran grandes similitudes en sus patrones de bandas, lo que permite establecer fácilmente homologías entre ellos. Debido a esta característica, se ha utilizado el mapa de los cromosomas de *D. subobscura* con ordenación estándar (Kunze-Mühl y Müller, 1958) para localizar los "puffs" en las tres especies. Esto nos ha permitido realizar, mediante el análisis de "puffs", un estudio comparativo entre sus patrones temporales de actividad génica.

Nuestro grupo de investigación ha trabajado fundamentalmente en *D. subobscura*, disponiéndose de abundante información de sus patrones de "puffs". Estos patrones se han determinado en diversas cepas, portadoras de diferentes inversiones en sus cromosomas, de distinto origen geográfico (de Frutos y Latorre, 1982a, 1982b; de Frutos *et.al.*, 1987a,b; Latorre *et.al.*, 1988a), que difieran en el nivel de consanguinidad (de Frutos *et.al.*, 1984); pero todos estos estudios se han realizado únicamente en los estadios del inicio de la prepupación. Solamente en una cepa de *D. subobscura*, Ra121, se han determinado los modelos de "puffing" a lo largo del desarrollo (tercer estadio larvario tardío; prepupas de 0h, ½h, 1½h, 2½h, 3½h, 4½h, 10h, 14h, 18h y 20h). Estos trabajos fueron realizados por Pascual *et.al.* (1985). En nuestro análisis comparativo tomamos esta cepa como representante de *D. subobscura*. Dicha cepa procede de una población natural de Las Raíces (Islas Canarias) y se caracteriza por ser homocigótica para las ordenaciones A₂, J₁, U₁₊₂, E₁₊₂₊₉₋₁₂ y O₃₊₄.

1.3.1. Comparación entre los patrones característicos de cada especie.

Un primer paso para estimar la actividad génica de una especie, es conocer el número de loci activos que presenta. Según este criterio, la especie más activa sería *D. subobscura* puesto que se ha encontrado un total de 166 "puffs" a lo largo de su desarrollo. Seguirían con actividades muy similares, *D. guanche* y *D. madeirensis* con 146 y 145 "puffs", respectivamente. En las tres especies se ha descrito la presencia de un único anillo de Balbiani en la región 24 del cromosoma J.

Asimismo, se puede comparar el número de loci activos por cromosoma. En todas las especies, el cromosoma menos activo, en cuanto al número de "puffs", es el A y el más activo es el O (*D. subobscura* y *D. madeirensis*) ó el E (*D. guanche*). Como norma general, podríamos dar el siguiente orden decreciente de actividad de los cromosomas: O, E, J, U y A. Hay una alta relación entre el número de loci activos y

el tamaño de cada cromosoma. Según Kunze-Mühl y Müller (1958), el cromosoma O está definido por 25 secciones de mapa, 21 el cromosoma E, 19 el cromosoma J, 18 el cromosoma U y 16 el cromosoma A. Esto parece indicar una distribución aleatoria de los "puffs" a lo largo de los cromosomas.

Debido a las diferencias cuantitativas observadas en los patrones de "puffs", especialmente el gran número de "puffs" ocasionales que se han descrito en las tres especies (entre el 30-40% del total), es obvio que el total de loci activos no es el mejor criterio para definir la actividad génica de una especie. Podemos centrarnos sólo en aquella fracción de "puffs" con elevadas frecuencias de aparición (75-100%), que hemos definido como **patrón característico de una especie**.

En *D. subobscura* el 37% del total de "puffs" constituye su patrón característico; el 34% en *D. guanche* y el 26% en *D. madeirensis*. De acuerdo con el nuevo criterio, *D. subobscura* es también la especie más activa, siguiéndole más de cerca *D. guanche* y por último *D. madeirensis*. Hasta ahora, ambos criterios coinciden en el orden decreciente de actividad de las especies: *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*; si bien, las diferencias de magnitud entre ellas son distintas.

En la tabla 13 se muestran los "puffs" que forman el patrón característico en cada una de las 3 especies, distinguiéndose 7 grupos, dependiendo de su actividad en cada una de ellas. Los "puffs" se indican en la tabla siguiendo, en este caso, la ordenación estándar de los cromosomas. Son un total de 80 regiones activas, el 31,25% de las cuales representa a los "puffs" característicos en las tres especies (SGM). Prácticamente todos estos "puffs" muestran igualmente el mismo modelo de expresión temporal en las tres especies (indicados en negrita). Se trata de los "puffs" de mayor tamaño.

Como norma general los "puffs" que son característicos en solo dos especies (SG; SM; GM) presentan actividades medias en la tercera especie. Muchos son de gran tamaño, otros presentan un desarrollo moderado. Dentro de ellos, un número relativamente alto (59%) muestra también un mismo modelo de expresión temporal. Por ejemplo, el "puff" 26 forma parte del patrón característico de *D. subobscura* y *D. guanche*, presentando actividad media en *D. madeirensis*. En las tres especies muestra su máxima actividad en el inicio y final de la prepupación. El 49B es un "puff" de inicios de la prepupación en los tres casos, característico de *D. subobscura* y *D. madeirensis*, pero con actividad intermedia en *D. guanche*.

Para los "puffs" que sólo son característicos de una especie (S; G; M), se observa mayor heterogeneidad en cuanto a su actividad en las otras dos especies: pueden presentar actividad moderada en una de ellas, mientras en la otra, tener un comportamiento ocasional ó incluso no ser activo.

Tomando como una unidad al conjunto de "puffs" de la tabla 13, el 40% muestra un patrón de expresión temporal idéntico en las tres especies (marcados en negrita), siendo la mayoría "puffs" del grupo SGM. Seguramente se trata de aquellos loci con un mismo sistema de regulación en las tres especies. El resto difiere en dicho patrón, en la mitad de los cuales *D. guanche* es la especie en discordia.

1.3.2. "Puffs" no descritos en algún miembro de la triada (*D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*).

De los 186 loci que forman el conjunto de "puffs" observados entre las tres especies, 166 son activos en *D. subobscura*, 146 en *D. guanche* y 145 en *D. madeirensis*. La tabla 14 muestra aquellos "puffs" que son propios de una especie, distinguiéndose 6 Tipos de acuerdo con su presencia/ausencia en cada una de ellas. Aunque son una muestra importante (71) respecto del número de "puffs" descritos, no lo son respecto de la actividad génica total. La mayoría de ellos son ocasionales o con frecuencias moderadas-bajas, destacando solamente 7 loci que forman parte del patrón característico de alguna especie: 35E, 49A, 97AB (característicos de *D. subobscura*); 84A, 85E, 88D (característicos de *D. guanche*) y 35C (característico de ambas especies).

El conjunto de estos "puffs" sumados a aquellos que presentan un patrón de expresión temporal distinto entre las tres especies, constituyen la fracción más evidente de regulación génica diferencial entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*.

1.3.3. Índices de Actividad Media.

Una aproximación cuantitativa para medir la actividad génica de una especie, es la estima del valor medio de las frecuencias de un conjunto determinado de "puffs". A este valor medio se le ha denominado índice de actividad media (B) (Pascual *et.al.*, 1985).

Los índices de actividad calculados han sido los siguientes:

- Índice de actividad media por especie.
Es el caso más general, obteniéndose un solo valor para cada especie.
- Índice de actividad media por cromosoma.
En este caso, se obtienen 5 valores en cada especie, uno por cromosoma.

- Índice de actividad media por estadio.

Se obtienen 12 valores en *D. madeirensis* y 11 en *D. subobscura* y *D. guanche*, uno por cada estadio analizado.

- Índice de actividad media por cromosoma y estadio.

En este caso, se obtienen 60 valores en *D. madeirensis* y 55 en *D. subobscura* y *D. guanche*, uno por cada estadio en cada uno de los cromosomas.

La tabla 15 presenta los valores de los índices de actividad media por especie y por cromosoma. De acuerdo con el primero de ellos, *D. subobscura* es más del doble de activa que sus especies próximas, puesto que el valor medio de su actividad total es de 0.236, mientras que *D. guanche* y *D. madeirensis* muestran actividades similares, de 0.109 y 0.108 respectivamente. La misma situación se observa para la mayoría de los cromosomas. En algunos casos se presentan diferencias de actividad muy acusadas: en el cromosoma A de *D. madeirensis*, en el U de *D. guanche* y en el O de ambas especies, a pesar de que en este cromosoma se han descrito un mayor número de "puffs" que en el resto, tal como se ha indicado en otro apartado. Todos ellos muestran la tercera parte de la actividad de los cromosomas de *D. subobscura*. Sin embargo, en las tres especies se cumple que los cromosomas más activos son el U y el E, mientras no hay acuerdo unánime respecto qué cromosomas son los menos activos. En este contexto, *D. subobscura* coincide con *D. guanche* en el cromosoma J y con *D. madeirensis* en el A. Por otro lado, *D. guanche* y *D. madeirensis* comparten el cromosoma O como uno de los menos activos.

Los valores de los índices de actividad media por estadio y de actividad media por estadio y cromosoma se presentan gráficamente en la figura 16. Como ya se ha indicado en el primer capítulo, el patrón de actividad génica muestra, para la mayoría de las especies de *Drosophila*, dos picos principales durante el desarrollo: en el inicio y fin de la prepupación. Además en algunas especies, como *D. pseudoobscura* (Stocker y Kastritsis, 1972), se ha descrito un tercer máximo de actividad en los estadios de prepupa media. Pascual et al., (1985) mostró que este patrón es también característico de *D. subobscura*, como puede observarse en la primera gráfica de la figura. Mientras *D. guanche* muestra su mayor actividad en los inicios de la prepupación, manteniéndose después con suaves oscilaciones, el patrón de *D. madeirensis* contrasta por su homogeneidad a lo largo de todo el desarrollo. Sin embargo, podemos distinguir en esta especie, tres suaves máximos en la actividad correspondientes a los estadios de prepupa temprana, media y tardía.

Al analizar la contribución de cada cromosoma a la actividad génica total en cada una de las especies, se

observa que los cromosomas de *D. subobscura* muestran los tres picos característicos de su patrón general, a excepción de una mayor actividad del cromosoma A en tercer estadio larvario tardío. Los cromosomas de *D. guanche* y *D. madeirensis* son menos activos que los de *D. subobscura* durante todo el desarrollo estudiado, especialmente el cromosoma O. En líneas generales destacar la mayor actividad en el inicio de la prepupación para los cromosomas de *D. guanche*, mientras *D. madeirensis* muestra cromosomas relativamente activos en tercer estadio larvario tardío e inicios de la prepupación y a finales de la prepupa (cromosomas A y J) y cromosomas muy activos durante los estadios de prepupa (U y E).

Si analizamos la actividad de los cinco cromosomas en el contexto de cada especie, se deduce que para *D. subobscura* y *D. madeirensis*, el cromosoma U es el más activo de todos, en la mayoría de los estadios de desarrollo analizados. En *D. guanche*, no podemos hablar de una clara dominancia de un cromosoma respecto de los demás, más bien de que determinados cromosomas son más activos en determinados estadios.

1.3.4. Medida de la distancia biológica.

El uso de coeficientes de distancia biológica, permite obtener una medida del alejamiento entre dos poblaciones, calculada a partir de los datos disponibles sobre uno o varios caracteres biológicos, los cuales pueden ser cuantitativos, cualitativos o una combinación de ambos.

Para el caso de los "puffs", podemos hablar de caracteres cualitativos, al menos en la perspectiva de este trabajo. Los dos estados alternativos que se han considerado, son el de su presencia y el de su ausencia. Para cada "puff" individual, puede calcularse la frecuencia relativa de aparición y la de ausencia. Puede considerarse análogo al caso de un gen con dos alelos, donde la presencia de un alelo equivale a la presencia del "puff" y la ausencia de ese alelo (presencia del alelo alternativo), a la ausencia del "puff".

Se han propuesto numerosos coeficientes como expresión de la distancia genética, pero todos presentan ventajas e inconvenientes (Prevosti, 1974). Lo mejor es utilizar más de uno por ver si los resultados obtenidos son similares. Independientemente del coeficiente de distancia aplicado, los órdenes de proximidad entre las poblaciones serán, aproximadamente los mismos.

Se han utilizado cuatro coeficientes de distancia, para determinar el grado de diferenciación entre las especies *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Las expresiones matemáticas de tales coeficientes se han presentado en el punto 2.5 de material y métodos. Se trata de la distancia de

Prevosti (Prevosti et al., 1975); Nei (1972); Cavalli-Sforza y Edwards (1967) y la distancia D^2_k de Kurczinsky (1970). A excepción de éste último, los demás son coeficientes de distancia medios, basados para su cálculo en las media de las diferencias entre los estados discretos de dos poblaciones. La D^2_k es, en cambio, un coeficiente acumulativo que depende del tamaño de la muestra estudiada y se le puede aplicar un test de significación.

El uso de tests de significación puede ser muy útil para determinar la validez estadística de los coeficientes de distancia y de los rangos de orden por ellos establecidos.

Los datos de que partimos son las frecuencias de aparición de un total de 186 "puffs", de los cuales 166 se han descrito en *D. subobscura* (tablas de frecuencia VII-XI en Pascual, 1983); 146 en *D. guanche* (tablas 8-12) y 145 en *D. madeirensis* (tablas 2-6). Tales "puffs" se distribuyen de la siguiente manera: 29 en el cromosoma A; 36 en el cromosoma J; 32 en el cromosoma U; 41 en el cromosoma E y 48 en el cromosoma O.

Debido a la presencia de un número relativamente importante de "puffs" con frecuencias muy bajas en las tres especies, el primer planteamiento fue intentar discriminar de los 186 "puffs", aquellos que realmente estuvieran contribuyendo a la diferenciación entre las especies. Para ello se realizó un análisis estadístico, aplicando el coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos indicaron que ningún "puff" contribuía a la diferenciación entre las tres especies. Este razonamiento es genéticamente, absurdo, más aún, si tenemos en cuenta que Latorre et al. (1988a) seleccionaron, por este mismo procedimiento, el 41,88% del total de "puffs" observados en 5 cepas de *D. subobscura*, como "puffs" que confieren variación entre las cepas.

Estos resultados no han sido presentados por esta razón y una explicación a ellos, podría ser el número reducido de grados de libertad que tenemos. Para 2 grados de libertad, las diferencias en la frecuencia de "puffs" entre las tres especies, deberían ser extraordinariamente grandes para que nos dieran significativas.

Como consecuencia de esto, se aplicaron los coeficientes de distancia biológica por un lado, al total de "puffs" descritos entre las tres especies (186) y por otro, a aquellos con una frecuencia media de aparición superior ó igual al 5% en, al menos, una especie (89 "puffs"). Esta selección supone el 47,85% del total de "puffs", eliminándose la gran mayoría de los "puffs" ocasionales y aquellos de actividades muy bajas, descritos en una sola especie. La tabla 16 muestra los "puffs" seleccionados según este criterio.

En ambos casos (total de "puffs"/"puffs" seleccionados) los seis coeficientes se aplicaron a dos niveles, de especie

y de cromosoma. Para cada "puff", se ha considerado el valor medio de los estadios de desarrollo analizados. De esta manera se evita el efecto de estadio, puesto que las tres especies no presentan un desarrollo prepupal de igual duración.

Al observar los resultados presentados en la tabla 17, se deduce una fuerte concordancia en los 4 coeficientes, en cuanto a un posible orden de las tres especies, de acuerdo con las distancias obtenidas entre ellas (lógicamente los valores de estas distancias difieren dependiendo del coeficiente utilizado). En todos los casos, *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M) son las especies más próximas, mientras *D. subobscura* (S) muestra distancias similares respecto a cada una de ellas.

Cuando consideramos el total de "puffs" descrito en las tres especies (tabla 17a), el valor de distancia D^2_k obtenido entre *D. guanche* y *D. madeirensis* no es significativo. Por tanto en términos estadísticos, las diferencias encontradas entre las dos especies no son lo suficientemente grandes, como para considerar que sus actividades génicas sean distintas. Por tal razón, no podemos aceptar las distancias obtenidas en este caso, por el resto de los coeficientes.

Sin embargo, no ocurre lo mismo respecto de los "puffs" seleccionados (tabla 17b), donde se encuentra un valor muy significativo para el par *D. guanche*-*D. madeirensis*. Pudiera ser que los numerosos "puffs" ocasionales descritos entre las tres especies, contribuyeran más como ruido de fondo que como fuente real de variación entre las especies. Así los "puffs" con frecuencias inferiores al 5%, contribuyen poco a la distancia, pero aumentan los grados de libertad. Ello hace más difícil detectar distancias significativas cuando se considera el total de "puffs".

Por otro lado, es importante destacar, que para los "puffs" seleccionados, la distancia de Prevosti y Nei son mayores, mientras que la de Cavalli y la D^2_k son menores respecto de los valores obtenidos al considerar todos los "puffs". Esto es consecuencia de la propia definición de cada coeficiente. Por ejemplo, para la distancia de Prevosti, al prescindir de los "puffs" con frecuencias inferiores al 5%, eliminamos poca contribución a la distancia, pero se divide por un menor número de loci y de ahí que los valores obtenidos sean mayores.

En conclusión, podemos tomar estadísticamente como válido, que *D. subobscura* es la especie más alejada dentro de la triada *D. subobscura*-*D. guanche*-*D. madeirensis*, mostrando distancias S-G y S-M que van desde razones de 1.25 (distancia de Cavalli-Sforza) a 2.25 (distancia D^2_p) la distancia G-M. Tomando los valores dados por la D^2_k , esta relación queda representada por el dendrograma construido según el método de Sokal y Sneath (1963), en la figura 17.

Cuando se tiene en cuenta cada uno de los cromosomas, se obtiene el mismo orden de distancia entre las tres especies (tabla 18). Para todos los cromosomas, excepto el A, *D. subobscura* y *D. guanche* son las especies más diferenciadas entre sí, siguiendo, a poca distancia, el par *D. subobscura-D. madeirensis*. De acuerdo con el test de significación de la D^2_k , nos encontramos con la misma situación de antes, es decir, algunas distancias no significativas al considerar los 186 loci, pasan a serlo si sólo se tienen en cuenta los 89 seleccionados. Es el caso de las distancias S-G en los cromosomas A y J; S-M en el cromosoma J y G-M en todos los cromosomas.

En definitiva, todo ello no es más que el reflejo de la actividad media con que cada cromosoma contribuye a la actividad total de una especie. Recordemos que en el apartado 1.3.3 de los resultados, se indicaba que *D. subobscura* es aproximadamente el doble de activa que sus especies próximas, las cuales muestran actividades similares, encontrando la misma situación al analizar los cromosomas individualmente. Al tener en cuenta solamente el conjunto de los "puffs" seleccionados, esta situación se traduce en valores significativos, puesto que eliminamos el ruido de fondo provocado por los loci de muy baja frecuencia.

En la figura 17 se presenta, para cada cromosoma, la relación entre las tres especies según la D^2_k . Para el cromosoma A, curiosamente, las especies más próximas son *D. subobscura* y *D. guanche*, a pesar de su gran diferenciación estructural. La muy baja actividad de este cromosoma en *D. madeirensis* explica estos resultados. Sin embargo, este cromosoma y el cromosoma J son los que muestran, respecto de los demás, las menores diferencias de actividad entre las tres especies.

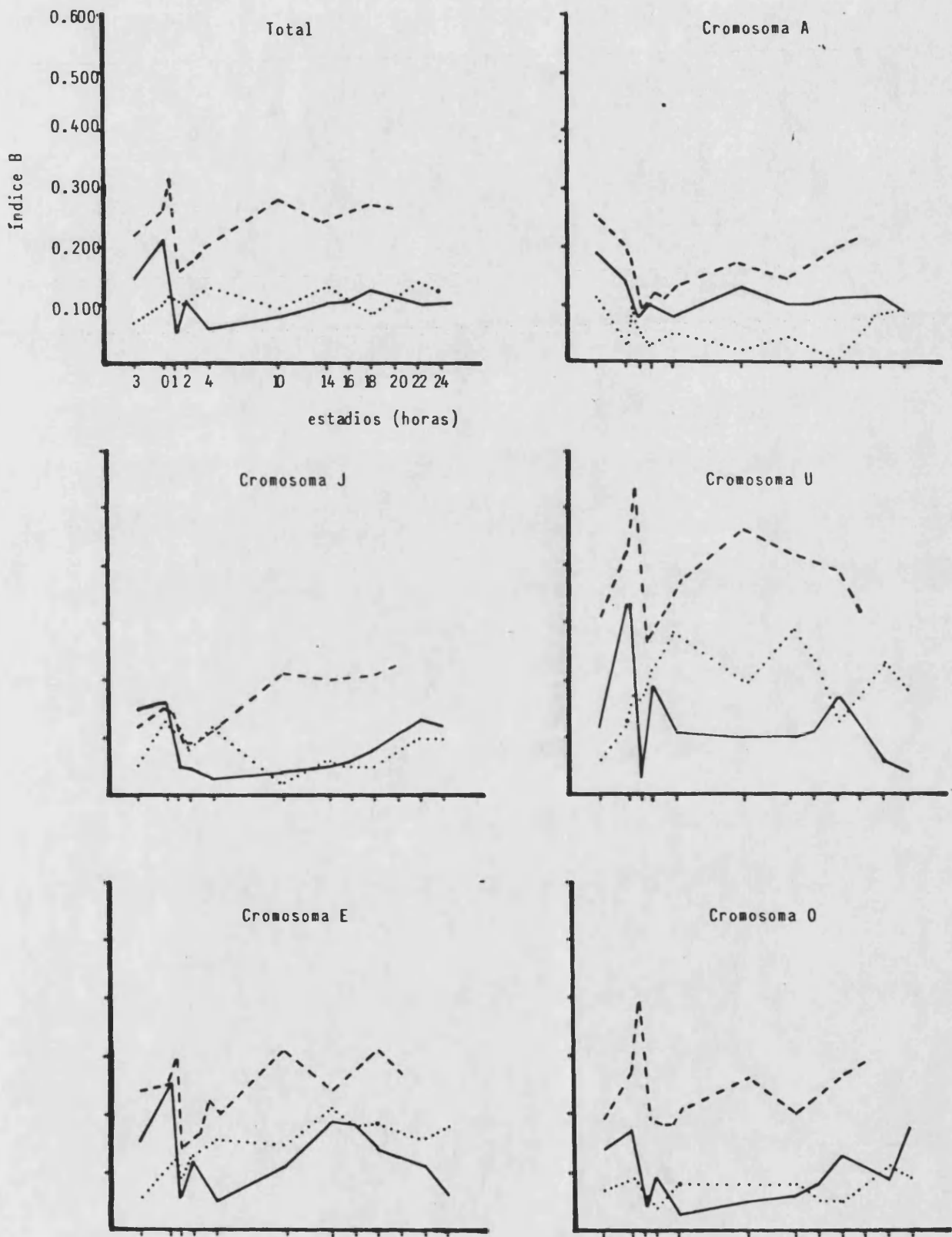


Figura 16.- Representación gráfica de los índices de actividad media por estadio (total) y de actividad media por estadio y cromosoma, en *D. subobscura* (----), *D. guanche* (—) y *D. madeirensis* (····).

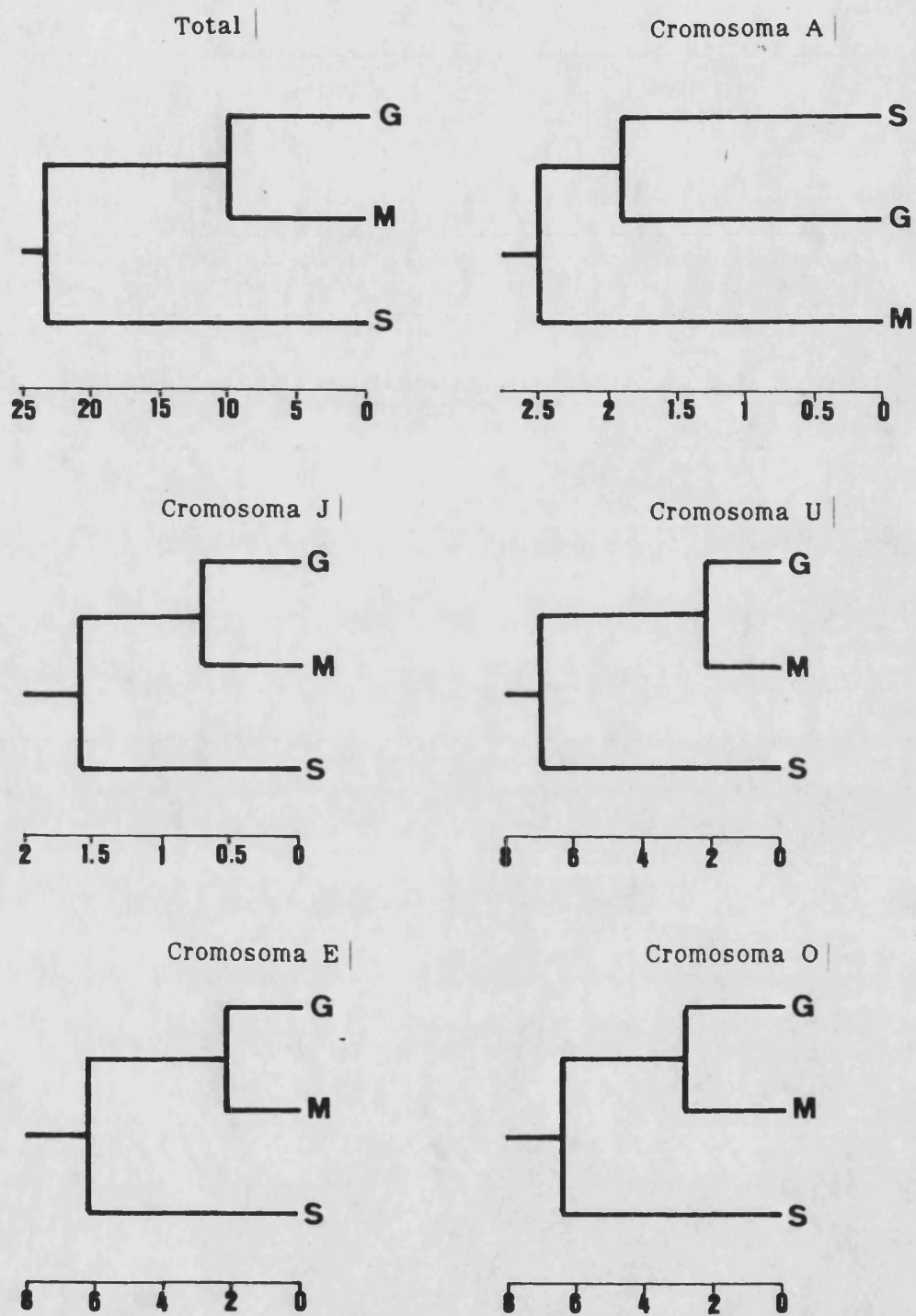


Figura 17.- Dendrogramas correspondientes a la distancia D^2_k entre las tres especies (S: *D. subobscura*; G: *D. guanche*; M: *D. madeirensis*) y entre cada uno de los cromosomas, teniendo en cuenta a los "puffs" seleccionados.

Tabla 13.- "Puffs" que constituyen el patrón característico de *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M). Se distinguen 7 grupos de acuerdo con su actividad en cada una de las especies. En negrita se indican aquellos "puffs" con un mismo modelo de expresión temporal en las tres especies.

grupos	cromosomas				
	A	J	U	E	O
S G M	4A, 10AB, 16B	18C, 25AC, 33B-34A, 35AB	37AC, 38BC 39A, 41BD, 46B, 47BD, 52AC, 53B	57BC, 60AB 66CD, 68DE 69B, 70BC	82B-83C, 85AB, 86A, 97DE
S G	13BC	26, 35C	50D, 51D	54E-55A	90A, 90D, 98C
S M			48D, 49B	61AC, 65B 70A	75C-76A, 78BC
G M				66AB	
S	13A, 15DE	17AB, 21D- 22A, 28D, 35E	37D-38A, 39D, 48A, 49A, 50B	61D-62A, 63A, 67AB, 72BC, 72D-73A	92D-93A, 95D, 96AC, 97AB
G		28BC, 30BC 31BC	46D	59E, 60C/D	84A, 85E, 87C, 88D, 91C-92A, 92AB, 99BC
M	12AC		40D-41A, 48B	63B/C, 74A	

Tabla 14.- "Puffs" no descritos en algún miembro de la triada. Tipo 1: "puffs" de *D. subobscura* no activos en *D. guanche* y *D. madeirensis*; Tipo 2: "puffs" de *D. guanche* no activos en *D. subobscura* y *D. madeirensis*; Tipo 3: "puffs" de *D. madeirensis* no activos en *D. subobscura* y *D. guanche*; Tipo 4: "puffs" activos en *D. subobscura* y *D. guanche* no descritos en *D. madeirensis*.; Tipo 5: "puffs" activos en *D. subobscura* y *D. madeirensis* no descritos en *D. guanche*; Tipo 6: "puffs" activos en *D. guanche* y *D. madeirensis*, no descritos en *D. subobscura*.

	cromosomas				
	A	J	U	E	O
Tipo 1	1B, 5B, 5C, 9D 10D, 11BC 15B/C	18A/B 27B	44A/B		77D, 80A, 86D, 93C, 99A/B
Tipo 2	7BC, 14BC 16D	20A		58BC, 63C 70D-71AB, 73B/C	88D
Tipo 3			36AB	62A/B, 62C	76B, 92C
Tipo 4	5D	24BD, 31C/D, 32B 35C	45D/E, 46C	54C/D, 56AB 59AB, 68AB 71C/72A	80BC, 81CD 81D-82A, 84A/B, 85E
Tipo 5	9B, 12D	17AB, 28A 32A, 34B, 35E	36C, 42A/B 42B/C, 42C/43A, 49A	56C/D, 71B	76D, 78D 94A, 94C, 95A, 97AB
Tipo 6	8D/E	22B, 29B			81BC, 87AB

Tabla 15.- Valores de los índices de actividad media por especie y por cromosoma.

	Total	A	J	U	E	O
<i>D. subobscura</i>	.236	.164	.152	.377	.241	.240
<i>D. guanche</i>	.109	.112	.084	.125	.130	.096
<i>D. madeirensis</i>	.108	.050	.084	.190	.143	.074

Tabla 16.- "Puffs" con una frecuencia media de aparición superior o igual al 5%, al menos, en una especie de la triada, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*.

c r o m o s o m a s

A	J	U	E	O	
2C	17AB	37AC	49A	54E-55A 67AB	75C-76A 92A/B
4A	18C	37D-38A	49B	57BC 68DE	78BC 92D-93A
5D	21D-22A	38BC	50B	59E 69B	79B 94C
10AB	22E-23A	39A	50D	60AB 70A	82A/B 95C
12AC	25AC	39D	51D	60C/D 70BC	82B-83C 95D
12D	26	40D-41A	52AC	61AC 72BC	85AB 96AC
13A	28BC	41BD	53B	61D-62A 72D-73A	86A 97AB
13BC	28D	43CD		63A 74A	87C 97DE
13E	31BC	46B		63A/B 74BC	88A 98C
15DE	33B-34A	47BD		63B/C	88D-89A 99BC
16B	35AB	48A		65B	90A
	35C	48B		66AB	90D
	35E	48D		66CD	91C-92A

Tabla 17.- Distancias de Prevosti (P); Nei (N); Cavalli-Sforza y Edwards (C) y D^2_k entre *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M). Se presentan los valores correspondientes a la T^2 multivariante de Hotelling para 186 y 89 grados de libertad; ns indica que el valor es no significativo para una probabilidad ≤ 0.05 ($X^2_{186}=218.53$; $X^2_{89}=112.02$).

(a) Se consideran el total de los 186 "puffs" descritos entre las tres especies.

	P	N	C	D^2_k	T^2
S-G	.0895	.0311	1.995	27.376	523.84
S-M	.0825	.0260	1.790	23.615	484.17
G-M	.0434	.0089	1.229	11.566ns	161.12

(b) Se consideran los 89 "puffs" seleccionados.

	P	N	C	D^2_k	T^2
S-G	.1219	.0827	1.688	25.450	1017.76
S-M	.1277	.0736	1.685	22.115	947.58
G-M	.1005	.0479	1.375	10.285	299.44

Tabla 18.- Distancias de Prevosti (P), Nei (N), Cavalli-Sforza y Edwards (C) y D^2_k , entre los cromosomas de las tres especies. La distancia D^2_k se ha calculado para el total de "puffs" (Dt) y para los seleccionados (Ds), indicándose en cada caso los valores de la T^2 de Hotelling, así como los grados de libertad; ns indica que la distancia es no significativa; ns* que está muy cerca del nivel de significación para una probabilidad ≤ 0.05 .

		P	N	C	Dt	Ds	T^2_t/T^2_s	gl	$\chi^2_{.05}$
A	S-G	.0593	.0135	.5653	2.265ns	1.916	32.07	29	42.55
							71.53	11	19.67
	S-M	.0695	.0220	.6825	3.197	2.918	52.66	29	
							126.74	11	
	G-M	.0484	.0144	.5119	2.315ns	2.138	23.51	29	
							57.24	11	
J	S-G	.0478	.0088	.5604	2.156ns*	1.707	47.07	36	50.99
							103.19	13	22.36
	S-M	.0457	.0078	.5095	1.979ns*	1.548	47.13	36	
							102.11	13	
	G-M	.0267	.0017	.4002	1.055ns	.697	16.83	36	
							30.78	13	
U	S-G	.1420	.0682	1.067	8.664	8.426	212.75	32	46.19
							331.03	20	31.41
	S-M	.1220	.0431	.8351	5.899	5.651	158.02	32	
							242.21	20	
	G-M	.0612	.0137	.5394	2.466ns*	2.248	44.24	32	
							65.56	20	
E	S-G	.1041	.0369	1.023	7.178	6.845	137.57	41	56.94
							244.49	22	33.92
	S-M	.0862	.0285	.8930	5.738	5.615	119.96	41	
							218.77	22	
	G-M	.0456	.0081	.5838	2.523ns	2.320	35.32	41	
							60.53	22	
O	S-G	.0913	.0310	1.078	7.110	6.554	116.38	48	65.17
							223.91	23	35.17
	S-M	.0886	.0297	.9923	6.800	6.381	121.43	48	
							237.81	23	
	G-M	.0390	.0084	.6757	3.205ns	2.844	38.32	48	
							70.97	23	

2. ACTIVIDAD GENICA EN CONDICIONES INDUCIDAS. ANALISIS GENETICO DE LA RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO.

En esta segunda parte de los resultados, se estudia cómo la expresión génica puede ser alterada por un agente exterior ajeno al sistema, la temperatura supraóptima. Cuando los cambios de temperatura tienen lugar de forma inesperada, rápida e intensa, se habla de choque térmico. Por respuesta al choque térmico, se conoce la reacción de los organismos frente a las acciones de la temperatura.

Para el análisis genético de dicha respuesta, se ha realizado un análisis cualitativo y cuantitativo de los "puffs", bajo distintos tratamientos térmicos, así como se ha estudiado el efecto del choque térmico en el patrón de síntesis de RNAm. Sin embargo, estos estudios van más allá de este primer planteamiento, al identificar aquellos genes implicados en este proceso (genes de choque térmico ó HSPs), y los productos de su actividad (proteínas de choque térmico ó hsp). Como tercer objetivo, se estudia la organización de los HSPs en los genomas de las especies del grupo *obscura* de las que nos ocupamos, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*.

2.1. Patrones de "puffs" inducidos por choque térmico.

El primer punto del trabajo, es la determinación de los "puffs"-temperatura en *D. subobscura* (cepa H271), *D. guanche* (cepa TF2) y *D. madeirensis* (cepa Md1). Dicho análisis se ha llevado a cabo en un estadio del desarrollo concreto, el inicio de la prepupación (momento de la eversión de los espiráculos anteriores). Estas prepupas de 0h. fueron sometidas a los distintos tratamientos térmicos indicados en el punto 3.1 de material y métodos.

Considerando en conjunto las tres especies, se ha observado un total de 118 "puffs", distribuidos de la siguiente forma: 18 en el cromosoma A; 24 en el cromosoma J; 21 en el cromosoma U; 22 en el cromosoma E y 33 en el cromosoma O. En las tablas 19 a 23 se presentan tales "puffs", junto con su frecuencia de aparición por cada temperatura de tratamiento y control (c19°C). Los datos de *D. subobscura* son de Pascual (1986).

Del análisis de estas tablas, se deduce que, en las tres especies, la respuesta frente al choque térmico muestra dos características principales:

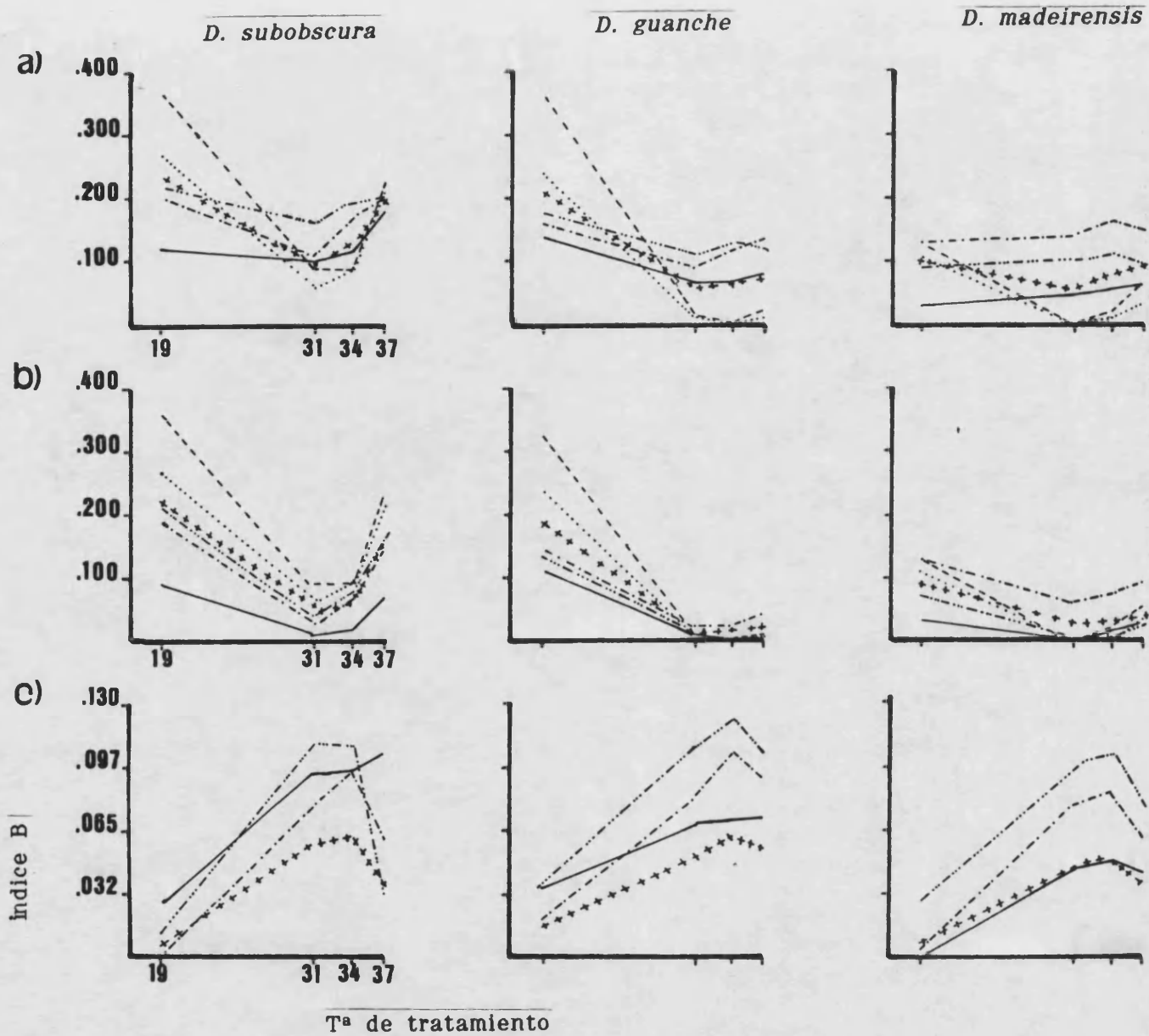
- Una fuerte regresión de la mayoría de los "puffs"-desarrollo característicos de las prepupas de 0h.
- La inducción extraordinaria de un número reducido de "puffs", en general, muy poco activos en los controles ("Puffs" temperatura). Se trata de los loci 2C, 15DE, 16B (en el cromosoma A), 18C, 27A y 31C/D (en el cromosoma J), 85AB, 89A y 94A (en el cromosoma O). Para su mejor localización en las tablas correspondientes, se han marcado en negrita.

Ambas características se ponen de manifiesto al calcular la actividad génica de los cromosomas politénicos en cada uno de los tratamientos. Para ello se ha aplicado el índice de actividad media (B) de Pascual et al. (1985) a los siguientes casos:

- al total de "puffs" observado en la experiencia.
- al total de "puffs" que no sufre ningún incremento de su actividad por efecto del choque térmico, es decir, que mantienen o disminuyen su frecuencia de aparición.
- al conjunto de "puffs" inducidos por los tratamientos térmicos, es decir, los "puffs"-temperatura.

En la figura 18, los apartados (a), (b) y (c) representan respectivamente, en forma gráfica, las tres situaciones anteriores.

En las tres especies se observa un fuerte descenso de la actividad génica de las prepupas 0h, por efecto del estrés térmico, acusado por todos los cromosomas, especialmente el E y el U. (figura 18a). El fuerte descenso de la actividad, es consecuencia de la regresión de la mayoría de los "puffs"-desarrollo característicos del estadio analizado, más acusado en *D. guanche* y en *D. madeirensis* (figura 18b). Se observa que, *D. madeirensis* muestra una menor actividad en los controles que sus especies próximas, y ello es debido a que en este estadio de desarrollo, *D. subobscura* y *D. guanche* son prácticamente el doble de activas que *D. madeirensis* (recordemos la figura 16). En cambio, la actividad génica del total de "puffs"-temperatura en las prepupas 0h, es de la misma magnitud en las tres especies, tanto para los cromosomas afectados (cromosomas A, J y O) como referida a todo el genoma (figura 18c). En los tres casos se detecta una mayor inducción de la expresión génica de choque, en el intervalo de temperatura de 31-34°C.



Cromosoma A —————
 Cromosoma J - - - - -
 Cromosoma U - · - - -
 Cromosoma E ······
 Cromosoma O - - - - -
 Total + + + + +

Figura 18.- Actividad génica media tras los tratamientos térmicos a 31°C, 34°C y 37°C, considerando (a) el total de "puffs" observado; (b) el total de "puffs" que mantienen o disminuyen su frecuencia de aparición; (c) los "puffs"-temperatura.

Tabla 19.- Frecuencia de aparición de los "puffs" del cromosoma A, tras los tratamientos térmicos a 31°, 34° y 37°C. Los espacios vacíos indican que no se ha descrito el "puff" en la especie correspondiente. (n= número de cromosomas analizados)

"puffs" n=	<i>D. subobscura</i>				<i>D. guanche</i>				<i>D. madeirensis</i>			
	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°
	35	25	35	35	50	55	65	75	50	65	65	65
1C	0	0	0	0	.040	0	0	0	.020	0	0	0
2C	.057	.720	.114	0	.040	.640	.540	.290	0	.740	.660	.280
4A	0	0	0	0	.440	.010	0	.020	0	0	0	.107
5D	.286	0	.086	.343	.240	0	0	0				
6CD	0	0	0	0	.040	0	0	0	.060	0	0	.015
6E-7A	0	0	0	.029	0	0	0	.020	0	0	0	0
8E/9A	0	0	.029	0	0	0	0	0	.020	0	0	0
10AB	.343	.040	.057	.286	.120	0	0	0	.080	0	.015	0
11D	0	0	0	0	.040	0	0	0	0	0	0	0
12AC	.114	.040	.029	.143	.080	0	0	0	.260	0	.090	.046
12D	.057	0	0	0					0	0	0	0
13A	0	0	.029	0	.060	0	0	.020	0	0	0	.030
13BC	.629	.080	.114	.143	.380	0	0	0	.040	0	0	0
13E	0	0	0	0	.100	.050	0	.020	0	0	0	.138
14CD	0	0	0	0	.060	0	0	0	0	0	0	.015
15DE	.029	.280	.686	.771	.100	0	.150	.410	0	0	.090	.200
16B	.400	.520	.743	.943	.420	.440	.430	.440	0	0	.030	.184
16D					.140	0	0	0				

Tabla 20.- Frecuencia de aparición de los "puffs" del cromosoma J, tras los tratamientos térmicos a 31º, 34º y 37ºC. Los espacios vacíos indican que no se ha descrito el "puff" en la especie correspondiente.

"puffs"	<i>D. subobscura</i>				<i>D. guanche</i>				<i>D. madeirensis</i>			
	c19º	31º	34º	37º	c19º	31º	34º	37º	c19º	31º	34º	37º
17AB	.080	.040	.020	.020					.190	0	0	0
17C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	.190	0	0	.040
18C	0	.620	.600	.340	.010	.790	.970	.840	.010	.640	.760	.730
20BC	.020	0	0	0	.030	0	0	0	0	0	0	.010
21D-22A	.080	0	.020	.120	.040	0	0	0	.060	0	0	0
22B					.030	0	0	0	.010	0	0	0
22C/D	.020	0	0	.020	.080	0	0	0	0	0	0	0
22E-23A	.040	0	.020	.020	.170	.010	0	.010	0	0	0	0
25AC	.960	.040	.140	.900	.230	0	0	.030	.160	0	0	.120
26	.260	.060	.040	.020	.230	.010	0	.130	.060	0	.110	.170
27A	0	.880	.840	.040	.040	.710	.940	.640	0	.830	.790	.260
28A	.120	0	0	0					0	0	0	0
28BC	0	0	0	0	.010	.010	.080	.130	.050	0	.170	.160
28D	.080	.020	.020	.040	0	0	0	0	0	0	0	0
30A	0	0	.020	0	.020	0	0	.010	.010	.030	.070	.010
30BC	.060	0	0	0	.120	0	0	.050	.020	0	0	0
31A	.440	0	0	.140	0	0	0	0	.060	0	.010	0
31BC	.080	0	0	0	.430	0	0	0	0	0	0	0
31C/D	0	0	.360	.720	.150	.020	.110	.270	0	0	.090	.220
32A	.040	0	0	0					.100	0	0	0
33A	0	0	0	0	.010	0	0	0	.090	0	.030	.100
33B-34A	.460	.060	.180	.440	.360	0	0	.060	.640	.730	.520	.450
35AB	1	.320	.920	.980	.790	.110	.270	.440	.940	.420	.480	.570
35D	0	0	0	.020	.020	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 21.- Frecuencia de aparición de los "puffs" del cromosoma U, tras los tratamientos térmicos a 31º, 34 y 37ºC. Los espacios vacíos indican que no se ha descrito el "puff" en la especie correspondiente.

"Puffs"	<i>D. subobscura</i>				<i>D. guanche</i>				<i>D. madeirensis</i>			
	c19º	31º	34º	37º	c19º	31º	34º	37º	c19º	31º	34º	37º
37AC	.280	.020	.060	.080	.190	.010	0	0	.010	0	0	0
37D-38A	.220	.060	.020	.080	.160	0	0	0	.010	0	0	0
38BC	.820	.160	.080	.240	.230	0	0	0	.050	0	0	0
39A	.400	.060	.040	.300	.060	0	0	0	.020	0	0	0
40D-41A	.360	.100	.240	.580	.090	0	0	0	.010	0	0	0
41BD	.800	.240	.120	.120	.140	.020	0	.020	.040	0	0	0
42A/B	.020	0	0	0					0	0	0	0
42B/C	.020	0	0	0					0	0	0	0
43CD	.020	0	0	.020	.010	0	0	0	0	0	0	0
45DE	0	0	0	.020	.010	0	0	0				
46B	1	.220	.400	.920	.500	0	0	0	.690	0	0	780
46D	.040	0	0	.020	.430	0	0	0	0	0	0	0
47BD	.760	0	.060	.340	.730	.010	0	.100	.520	0	.400	.140
48D	0	.020	0	.060	.040	0	0	0	.040	0	0	0
49B	.100	0	0	.160	.110	0	0	0	.470	0	0	0
50B	0	0	.020	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50D	.560	.120	.220	.300	.750	0	0	.040	.080	0	0	.020
51D	.120	0	0	0	.960	.030	0	.020	.050	0	0	.040
52AC	.160	.020	.020	.100	.950	.020	0	.010	.060	0	0	0
53B	.900	.540	.280	.840	.540	0	0	0	.340	0	0	0
53D	0	0	0	.020	.060	0	0	0	.030	0	0	0

Tabla 22.- Frecuencia de aparición de los "puffs" del cromosoma E, tras los tratamientos térmicos a 31°, 34° y 37°C. Los espacios vacíos indican que no se ha descrito el "puff" en la especie correspondiente.

"Puffs"	<i>D. subobscura</i>				<i>D. guanche</i>				<i>D. madeirensis</i>			
	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°
54C/D	0	.020	0	0	.030	0	0	0				
54E-55A	.360	.020	.040	.380	.730	.010	0	.050	.160	0	0	.080
57BC	.160	.020	.160	.220	.780	.020	0	.080	.130	.020	.020	.120
59E	.660	0	0	.180	.200	0	0	0	0	0	0	0
60AB	.640	.120	.160	.540	.780	.020	0	0	.500	0	0	0
60C/D	0	0	0	0	.300	0	0	0	.160	0	0	0
61AC	.300	0	0	0	.100	0	0	0	0	0	0	0
61D-62A	.060	.040	.020	.060	.110	0	0	0	.010	0	0	0
63A	.020	0	0	.040	.020	0	0	0	0	0	0	0
63A/B	.060	0	0	.040	.010	0	0	0	.010	0	0	0
63B/C	.540	0	.040	.620	.010	.010	0	0	.450	0	0	0
65B	.640	.320	.240	.660	.080	.030	0	0	.020	0	0	.020
66AB	.020	0	0	0	.220	.110	0	0	.050	0	0	0
67AB	.560	.480	.480	.300	.140	0	0	0	.010	0	0	0
68DE	.020	0	.020	0	.210	0	0	0	.240	0	0	0
69B	.380	.100	.120	.100	.530	0	0	.010	.010	0	0	0
70BC	.600	.140	.360	.540	.640	.020	0	0	.030	0	0	.140
71C/72A	.040	0	0	.140	.020	0	0	0				
72BC	.160	0	0	.040	.050	0	0	0	.040	0	.010	.040
73C	0	0	0	0	.160	0	0	0	0	0	.030	.140
74A	.460	.120	.320	.640	0	0	0	0	.370	0	.030	.120
74BC	0	0	0	0	0	0	0	0	.050	0	0	.020

Tabla 23.- Frecuencia de aparición de los "puffs" del cromosoma O, tras los tratamientos térmicos a 31°, 34° y 37°C. Los espacios vacíos indican que no se ha descrito el "puff" en la especie correspondiente.

"Puffs"	<i>D. subobscura</i>				<i>D. guanche</i>				<i>D. madeirensis</i>			
	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°	c19°	31°	34°	37°
75C-76A	.160	0	140	.080	0	0	0	0	0	0	0	0
77D	0	0	0	.020					0	.010	0	.030
78BC	0	0	0	0	.010	0	0	0	0	0	0	0
78D	.160	0	0	.100					0	0	0	0
79B	.160	.020	.040	0	.020	.030	0	.010	.030	0	0	0
79D-80A	0	0	0	0	.010	0	0	0	0	0	0	0
80BC	0	0	0	0	.050	0	0	.010				
80D/81A	.024	0	0	0	0	0	0	.020	0	0	0	0
81BC	0	0	0	.060	0	0	0	0	.020	0	0	0
82A/B	0	0	0	0	0	0	0	0	.040	0	0	0
82B-83C	.680	.180	.220	.320	.060	.010	0	.060	.210	0	.030	.130
84A/B	.010	0	0	0	0	0	0	.020				
85AB	.340	.960	.880	.780	.890	1	1	.940	.710	.720	.740	.650
85CD	.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86A	.560	.120	.360	.740	.860	.010	0	.100	.640	.020	.050	.150
87AB					.020	0	0	0	0	0	0	0
87C	0	0	0	.080	.290	0	0	.060	.220	0	0	.040
88D-89A	.060	0	0	.040	.060	0	0	0	.210	0	0	0
89A	0	.860	.900	0	0	.680	.990	.740	0	.850	.880	.600
90B	0	0	0	0	.020	0	0	0	0	0	0	0
90D	.160	0	.020	.240	.020	0	0	0	.160	0	0	0
91B	0	0	0	0	0	0	0	0	.010	0	0	0
92A/B	.260	.020	0	.020	.080	0	0	0	0	0	0	0
92D-93A	.400	.020	.040	.080	.210	0	0	0	0	0	0	0
94A	0	.940	.940	.060	0	1	1	.940	0	.880	.970	.740
94C	.020	0	0	0					0	0	0	0
95C	0	0	0	0	.010	0	0	0	0	0	0	0
95D	0	0	0	0	0	0	0	.015	0	0	0	0
96AC	.540	.100	.040	.320	.070	0	0	0	0	0	0	0
97AB	.580	.140	.100	.380					0	0	0	0
97DE	.560	.360	.360	.680	.510	0	0	.010	.100	0	0	.030
98C	.820	.100	.760	.940	.880	.120	.030	.175	.030	0	0	.010
99BC	0	0	0	0	.190	0	0	.010	0	0	0	0

2.2. Efecto del choque térmico en los patrones de síntesis de RNAm.

Un método muy común de determinación de la actividad transcripcional en los cromosomas politénicos es la autorradiografía. Del análisis de los autorradiogramas, obtenidos de los tratamientos a 34°C, se deduce que el choque térmico, provoca:

- Una clara inhibición general de la síntesis de RNAm en los cromosomas, que se traduce en una fuerte regresión de los "puffs"-desarrollo característicos (figura 19), tal y como se ha visto en el apartado anterior.
- La activación de un número reducido de "puffs" específicos, precisando más el conjunto de los "puffs"-temperatura (figuras 19 y 20).

En todos los autorradiogramas limpios de ruido de fondo, tanto de larvas de tercer estadio como de prepupas de 0h, se obtuvieron marcajes fuertes solamente en los loci 18C, 27A y en el anillo de Balbiani -A.B.- (cromosoma J); 85AB, 89A y 94A (en el cromosoma O), mientras que el "puff" 2C (cromosoma A) sólo mostró débiles marcas en *D. madeirensis*. En todos los casos, a excepción del anillo de Balbiani y el "puff" 85AB, los controles nos indicaron que tales regiones eran inducidas estrictamente tras choque térmico. Estos resultados pueden resumirse en el siguiente esquema, donde */- indican presencia/ausencia de señal autorradiográfica, respectivamente.

"puffs"	control (19°C)	choque térmico (34°C)
2C	-	*
15DE	-	-
16B	*	-
18C	-	*
A.B.	*	*
27A	-	*
31C/D	-	-
85AB	*	*
89A	-	*
94A	-	*

A raíz de estos resultados pueden establecerse 4 tipos de "puffs":

1. "Puffs", como el 85AB, y el anillo de Balbiani que son activos tanto en condiciones inducidas (choque térmico), como en condiciones no inducidas (controles) (figura 20b,c,d). El anillo de Balbiani es el único presente en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* y siempre aparece, supuestamente activo, a lo largo de todo el desarrollo larvario y prepupal. El 85AB es un "puff"-desarrollo, también muy activo en las tres especies, no reprimido por el choque térmico. Por tanto, no podemos afirmar, en sentido estricto, que sean regiones inducidas sólo por la temperatura.

2. "Puffs" con frecuencia de aparición relativamente alta tras choque térmico y sin embargo no muestran señales autorradiográficas en dichas condiciones. Se trata de los loci 15DE y 31C/D (figura 20a,b). Podríamos pensar en una menor actividad de ambas regiones respecto de las demás, siendo el método autorradiográfico poco sensible para detectar el bajo nivel de RNAm.

Un razonamiento similar sería válido para el "puff" 2C, ya que solamente se ha detectado, en este locus, un marcaje muy débil en los autorradiogramas de *D. madeirensis* (figura 19).

Según Pascual et al (1987), los tres loci muestran, en *D. subobscura*, una frecuencia de aparición distinta, dependiendo del momento del desarrollo en el cual se aplican los tratamientos térmicos. No descartamos, en principio, que todos ellos sean verdaderos "puffs"-temperatura.

3. El locus 16B es el único con frecuencia moderada en los controles, en *D. subobscura* y *D. guanche*, de ahí que detectemos RNAm en dichos casos. Sin embargo, su presencia después de los tratamientos térmicos, no va acompañada de actividad transcripcional, tal como lo demuestran los autorradiogramas (figura 20a).

Muchos "puffs" desarrollo mantienen, también, el estado abultado, tras los tratamientos térmicos, a pesar de que no se detecta síntesis de RNAm ó está muy disminuida. Por ejemplo, es el caso de los "puffs" 26 y 28BC del cromosoma J (figura 20b) y de otros muchos más como el 33B-34A, 35AB, 47BD, 82B-83C etc.

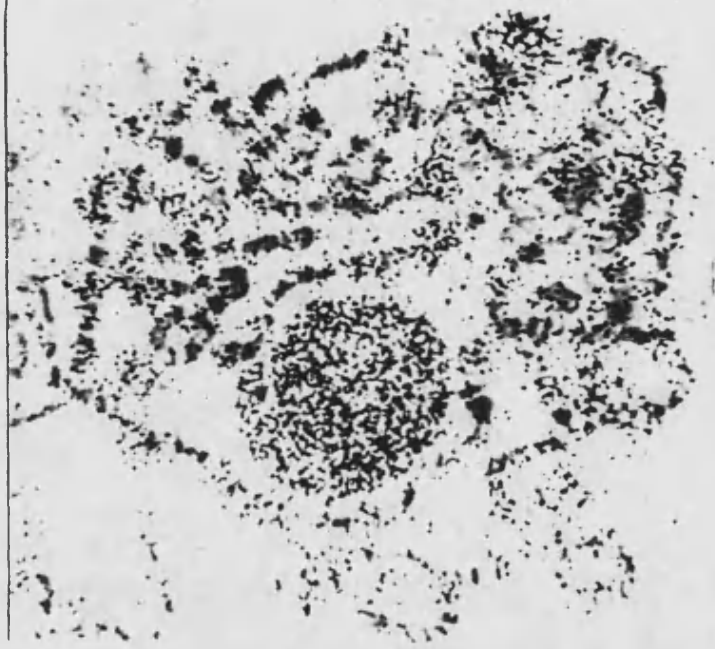
4. "Puffs" que muestran fuerte marcaje autorradiográfico solamente en condiciones inducidas. Se trata de los loci 18C, 27A, 89A y 94A (figura 20b,c,d). Todos ellos, según Pascual et al. (1987), presentan, en *D. subobscura*, una elevada frecuencia tras choque térmico, independientemente de la edad de los individuos sometidos a los tratamientos.

Es interesante hacer notar la peculiar localización, en *D. guanche*, de los "puffs" del cromosoma O inducidos por la temperatura (85AB, 89A y 94A). Mientras en *D. subobscura* y *D. madeirensis*, aparecen, tras choque térmico, tres regiones bien diferenciadas que forman "puff", correspondientes a los locus 85AB, 89A y 94A (figuras 19 y 20c), en *D. guanche*, sólo se detectan dos regiones descondensadas (figura 20d). La región proximal corresponde, citológicamente con el locus 89A, mientras el "puff" distal, de mayor desarrollo, agrupa a los loci 85AB y 94A. Como se observa en los controles de las figuras 19 y 20c,d, el 85AB, es además, un "puff"-desarrollo de actividad importante en las tres especies del grupo *obscura*.

La disposición característica de los "puffs" 85AB y 94A en *D. guanche*, se ha podido determinar a partir de los datos y observaciones de esta segunda parte de los resultados, tal y como se discutirá, más adelante, en el punto 2.7.

En vista, pues, de los resultados obtenidos en estas experiencias, podemos afirmar que el choque térmico induce, en sentido estricto, siete "puffs" en las tres especies del grupo *obscura*. Se trata del 2C, 15DE, 18C, 27A, 31C/D, 89A y 94A. Tales loci se sitúan en los cromosomas A, J y O, mostrando una localización diferente en las tres especies, debido a las inversiones paracéntricas características de sus cromosomas politénicos (figura 21).

control



choque térmico



Figura 19.- Autorradiogramas correspondientes a las condiciones control y tras choque térmico en *D. madeirensis*. Puede observarse una fuerte disminución en la actividad de los "puffs" desarrollo, mientras se inducen un número reducido de loci durante el estrés térmico. (no: nucleolo).

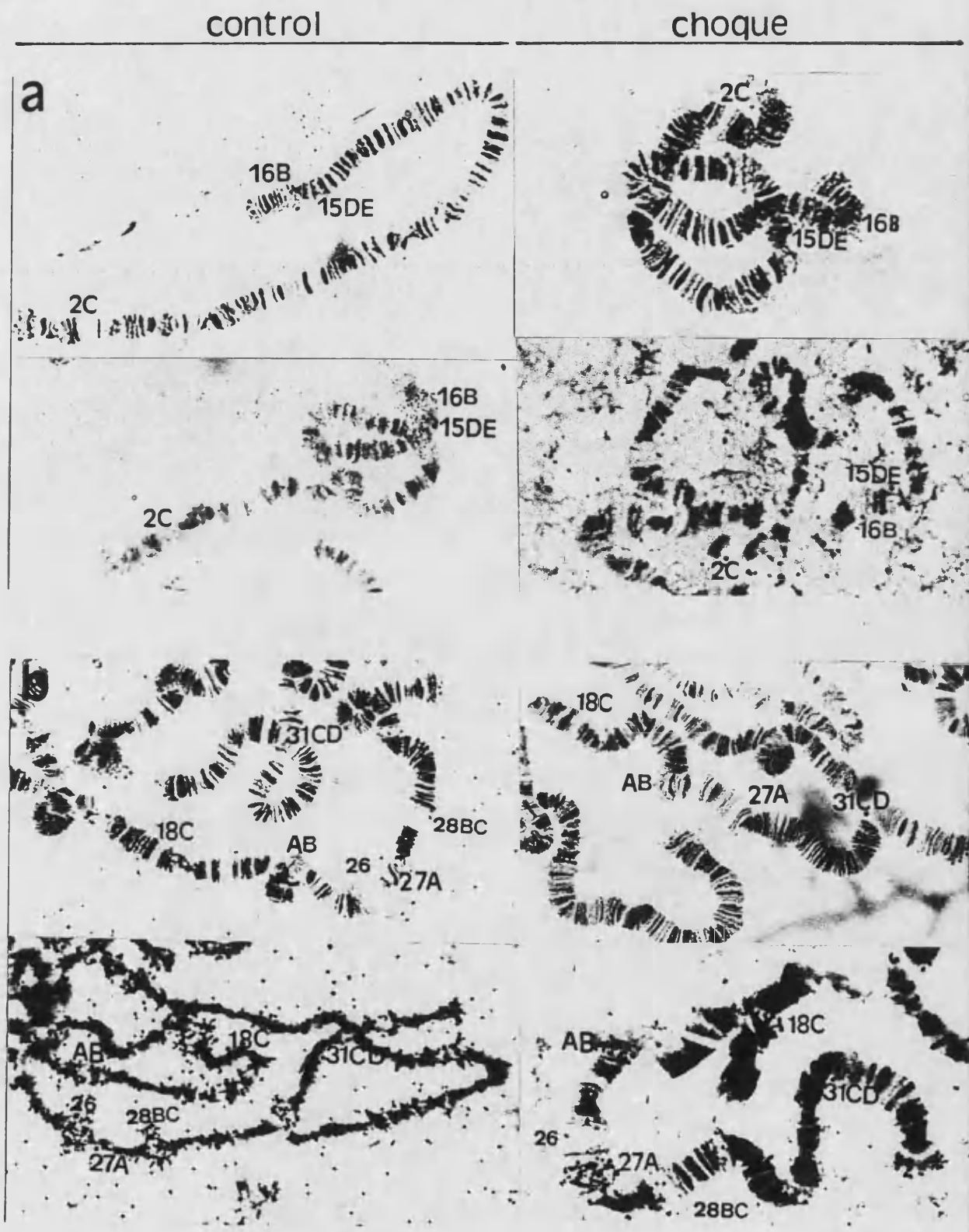


Figura 20.- Determinación, por autorradiografía, de los loci específicos ("puffs"-temperatura) que muestran actividad transcripcional tras los tratamientos térmicos.
 (a) Cromosoma A de *D. subobscura*.
 (b) Cromosoma J de *D. guanache*.

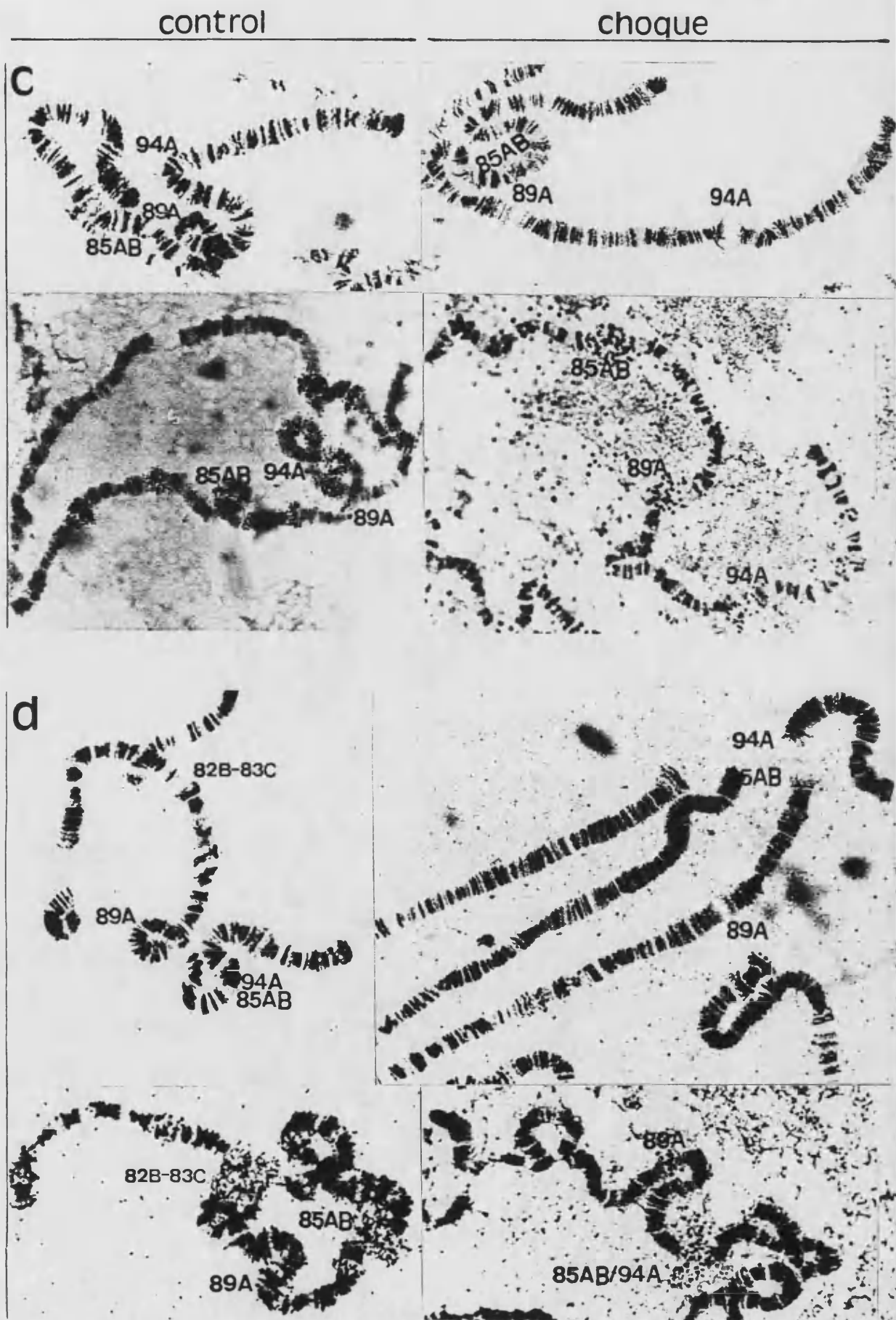


Figura 20.- (continuación).
 (c) y (d) Cromosomas O de *D. subobscura* y *D. guanche*,
 respectivamente.

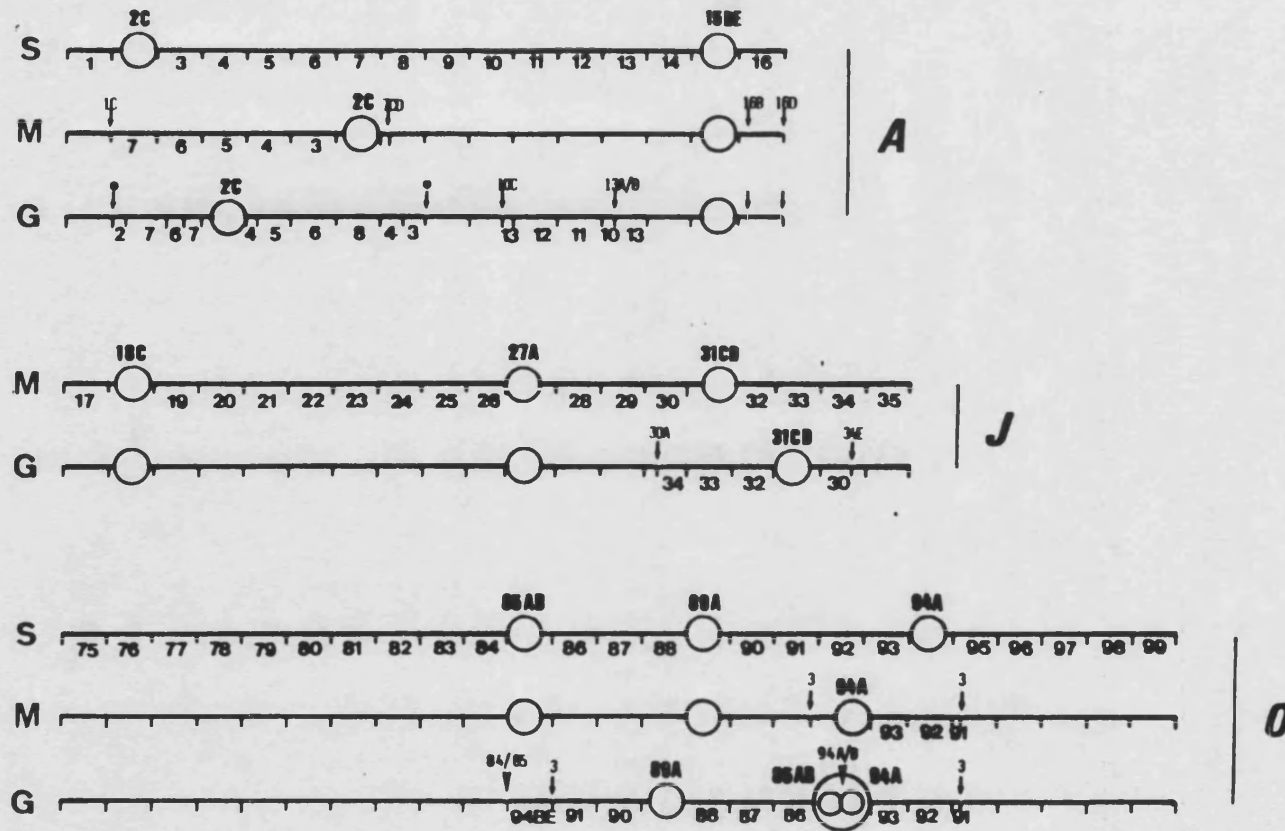


Figura 21.- Localización de los "puffs"-temperatura en los cromosomas politénicos de *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M). Mediante flechas se indican los límites de las inversiones cromosómicas, respecto de la ordenación estándar presente en los cromosomas de *D. subobscura*. Se incluye también, el "puff" 85AB por su peculiar localización en *D. guanche*.

2.3. Localización cromosómica de los genes de choque térmico.

Para localizar los genes de choque térmico (HSPs) en los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se llevaron a cabo experiencias de hibridación *in situ*, utilizando como sondas, los HSPs de *D. melanogaster*.

Los genes de choque térmico de *D. melanogaster*, se han agrupado, clásicamente, en tres familias principales en base a su homología estructural. Las sondas utilizadas, portadoras de los representantes de cada una de estas familias, fueron las siguientes:

- 301.1: contiene el gen HSP82 (Holmgren *et al.*, 1981), único miembro en *Drosophila*, de la familia de genes que codifican para las proteínas de choque térmico de alto peso molecular.
- 56H8 y 122: portadores de una y dos copias del gen HSP70, respectivamente (Schedl *et al.*, 1978 y Goldschmidt-Clermont, 1980).
- pPW227: lleva clonado el gen HSP68 (Holmgren *et al.*, 1979). Este y el anterior constituyen la familia de genes de choque térmico más conservada universalmente (familia HSP70).
- 88.5 y 88.6: contienen los genes que codifican para las proteínas de bajo peso molecular, HSP28-HSP23 y HSP26-HSP22, respectivamente (Corces *et al.*, 1980).

Los resultados obtenidos de las hibridaciones se muestran en las figuras 22 y 23. Para cada una de las tres especies del grupo *obscura*, se obtiene el mismo patrón de hibridación:

- La sonda portadora del gen HSP82 procedente del locus 63BC de *D. melanogaster*, dió señal autorradiográfica en el "puff" 18C, en el cromosoma J.
- Los genes HSP70 (loci 87A y 87C) y HSP68 (locus 95D) hibridaron, ambos, en los loci 89A y 94A, en el cromosoma O.
- Los HSPs que codifican para las proteínas de bajo peso molecular, procedentes del locus 67B de *D. melanogaster*, se agrupan en el "puff" 27A, en el cromosoma J.

Se observa, pues, que de los 7 "puffs" inducidos por el choque térmico en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, 4 de ellos contienen a los principales HSPs conocidos. Se trata de los "puffs" del tipo 4 que hemos descrito antes, es decir, aquellos con fuerte actividad transcripcional solamente en condiciones inducidas.

Al comparar la localización de los HSPs entre las especies del grupo *obscura* y *D. melanogaster*, se detecta, para estos genes, un mismo plan de organización (tabla 24). El gen HSP82 y aquellos para las proteínas de bajo peso molecular, se sitúan en un sólo locus, respectivamente, en el mismo cromosoma (cromosoma J en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*; cromosoma 3L en *D. melanogaster*). Los representantes de la familia HSP70 se localizan, también, en un mismo cromosoma (cromosoma O en las especies del grupo *obscura*; cromosoma 3R en *D. melanogaster*). Mientras en esta especie, se distingue entre el locus HSP68 (95D) y los loci HSP70 (87A y 87C), en las especies que estudiamos, los genes HSP70 y HSP68 de *D. melanogaster*, hibridaron con similar intensidad en los mismos "puffs" (89A y 94A) (figura 22). Es de esperar, pues, que ambos genes hayan divergido menos en las especies del grupo *obscura* y, por tanto, no podamos hacer una clara distinción entre ambos miembros de la familia HSP70.

En vista de estos resultados, se llevó a cabo una experiencia de hibridación *in situ*, empleando como sonda, en este caso, el fragmento *Hind*III de 6,7kb del clón pPW227 (figura 24a). Este fragmento contiene la región 3' adyacente a la secuencia codificadora del gen HSP68 de *D. melanogaster*. En este caso, se obtuvo hibridación, aunque más débil, solamente en el locus 89A en las tres especies del grupo *obscura* (figura 24b). Podemos concluir, pues, que el locus 89A de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* es el equivalente del 95D de *D. melanogaster*. Por tanto, se puede distinguir también en las especies del grupo *obscura*, entre dos tipos posibles de representantes de la familia HSP70 (¿HSP68?, ¿HSP70?), si bien, en estas especies, la secuencia codificadora de estos genes ha divergido menos que en *D. melanogaster*.

De entre las sondas empleadas en estas experiencias, las que contienen los genes que codifican para las proteínas de bajo peso molecular, fueron las que dieron, con diferencia, unos marcajes más débiles en los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* (figura 23). Esto puede interpretarse como el resultado de una menor homología entre *D. melanogaster* y las tres especies, ó por la existencia de un menor número de genes de esta familia en dichas especies, ó ambos hechos a la vez.

En *D. melanogaster* se ha descrito otro gen inducible por la temperatura, que no codifica para ninguna de las proteínas de choque térmico conocidas. Se trata de las secuencias $\alpha\beta$, unidades de 1.5 kb, agrupadas en una región de 38-40 kb entre las copias del gen HSP70 del locus 87C (Isch-Horowicz y Pinchin, 1980). Aunque, esencialmente, todos los transcritos $\alpha\beta$ derivan de este locus, se han detectado elementos α y elementos β dispersos en la

heterocromatina centromérica, constituyendo la mitad de las secuencias $\alpha\beta$ del genoma de esta especie (Lis et al., 1981).

Con objeto de averiguar si tales secuencias están presentes en los genomas de las especies del grupo *obscura*, realizamos paralelamente, una experiencia de detección sobre DNA genómico (hibridaciones en filtros de nylon) y otra de localización en los cromosomas politénicos (hibridación *in situ*). En ambos casos, se empleó como sonda, dos fragmentos *HindIII* de 1,5 kb. del clón G5 (Craig et al., 1979), portadores, cada uno de ellos, de una unidad $\alpha\beta$ (figura 25a). Para las hibridaciones *in situ*, la sonda fue marcada radioactivamente, mientras en la detección en el DNA genómico, se empleó la digoxigenina como molécula marcadora, tal y como se especifica en el punto 3.10 de material y métodos. Los lavados fueron de estringencia moderada (punto 3.12 y 3.13 de material y métodos). Los DNAs genómicos fueron digeridos con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

Los resultados obtenidos fueron negativos en las dos experiencias. Es decir, no se detectaron, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, secuencias relacionadas con las $\alpha\beta$ de *D. melanogaster* (figura 25b,c). Los patrones de restricción encontrados en esta especie, concuerdan con la distribución y organización de dichas secuencias en su genoma (Lis et al., 1981). Se puede observar, para ambas digestiones (*EcoRI* y *HindIII*), la presencia de secuencias α y β embebidas en la heterocromatina, obteniéndose un patrón característico de bandas en escalera. Así mismo, se detectan dos fragmentos *EcoRI* de 30kb y 15kb y otro *HindIII* de 1.5kb, todos de fuerte intensidad, que contienen las secuencias $\alpha\beta$ de la región 87C de *D. melanogaster*.

Tabla 24.- Organización de los genes de choque térmico en las especies del grupo *obscura* y en *D. melanogaster*.

<i>D. melanogaster</i>			grupo <i>obscura</i>	
cromosoma	"puff"	HSP	"puff"	cromosoma
3L	63BC	HSP82	18C	J
	67B	HSPs pequeñas	27A	
3R	87A	HSP70	89A	0
	87C	HSP70	94A	
	95D	HSP68	89A	
		HSP68	94A	

Figura 22.- Autorradiogramas de las hibridaciones entre las sondas portadoras de los genes HSP82, HSP70 y HSP68 de *D. melanogaster* (M) y los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (MD).

M

MD

G

S

HSP82

HSP70

HSP68



Figura 23.- Autorradiogramas de las hibridaciones entre las sondas portadoras de los genes HSPS28-23 y HSPS26-22 de *D. melanogaster* (M) y los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (MD).

M



MD



G



S



HSP28-23

HSP26-22

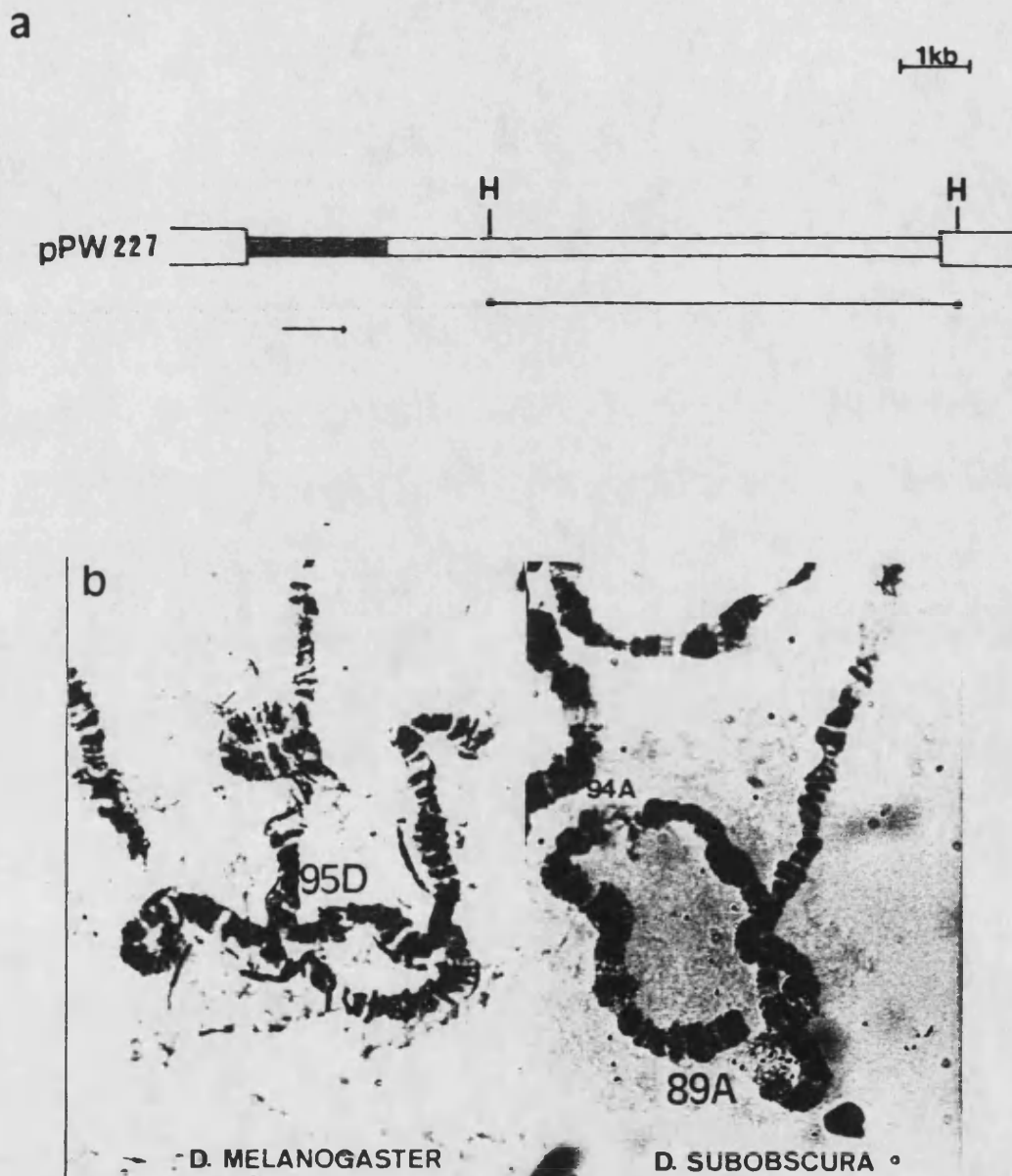


Figura 24.- Identificación, en las especies del grupo *obscura*, del locus equivalente al 95D de *D. melanogaster*.

(a) Sonda empleada en las experiencias de hibridación *in situ*: fragmento *Hind*III (H) del clón pPW227 (Holmgren *et al.*, 1979). El sitio *Hind*III del extremo distal se localiza en el vector de clonación (pMB9) a 29pb del lugar de inserción de la secuencia. El área en negro representa la región codificadora del gen HSP68 y la flecha indica la polaridad de la unidad de transcripción.

(b) Autorradiogramas obtenidos de las hibridaciones en los cromosomas de *D. melanogaster* (control) y en una de las especies estudiadas, *D. subobscura*

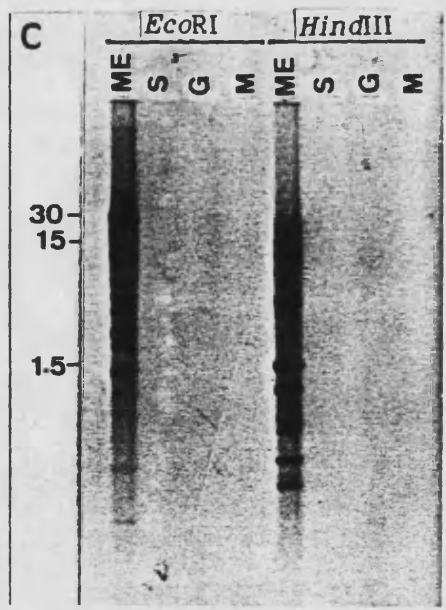
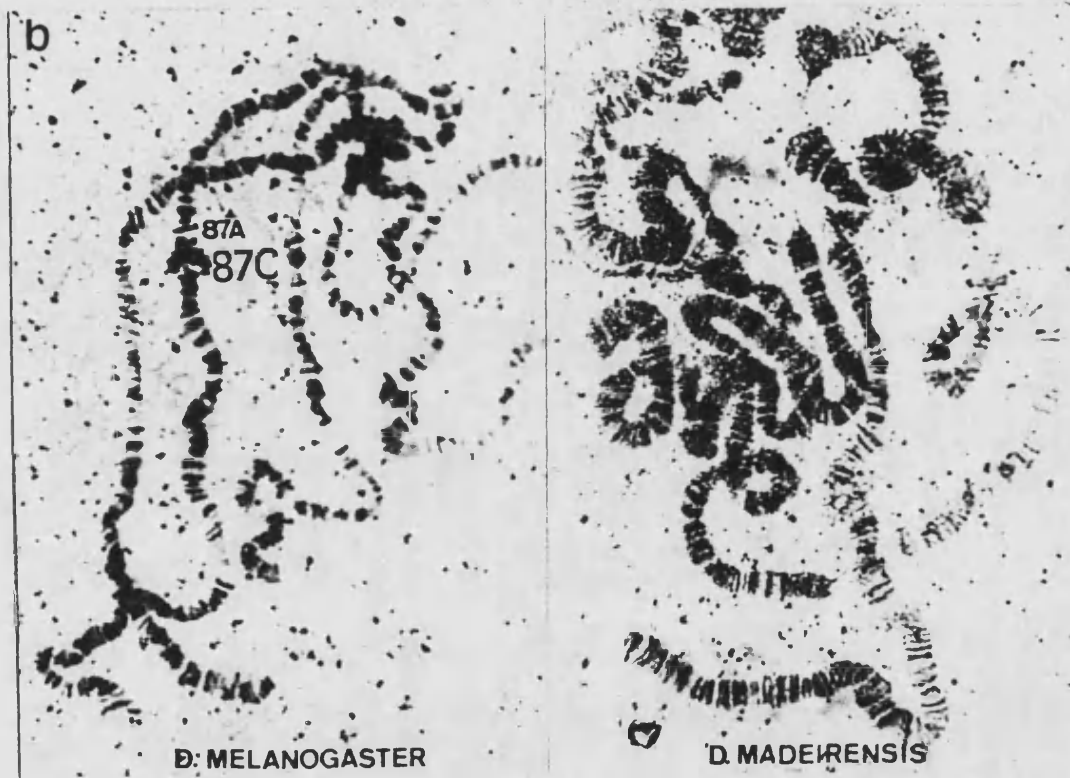
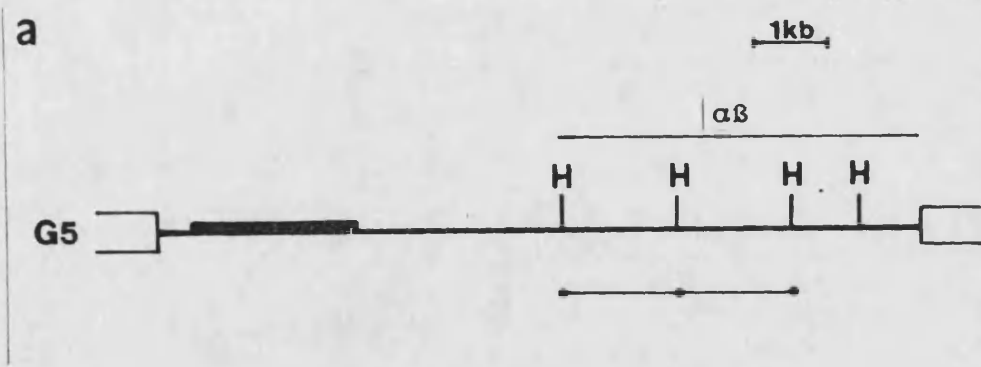
Figura 25.- Determinación de la presencia de secuencias relacionadas a las $\alpha\beta$ de *D. melanogaster*, en las especies del grupo *obscura*.

(a) Sonda empleada en las experiencias de hibridación: fragmentos *Hind*III (H) de 1.5kb del clón G5 (Craig et al., 1979). El área en negro representa la región codificadora de una de las copias del gen HSP70 del locus 87C en *D. melanogaster*.

(b) Autorradiogramas obtenidos de las hibridaciones *in situ* en los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* (control) y en una de las especies estudiadas, *D. madeirensis*.

(c) Resultados de las hibridaciones en los filtros de nylon (ME: *D. melanogaster*; S: *D. subobscura*; G: *D. guanche*; M: *D. madeirensis*). El tamaño de las bandas se indica en kb.

Fig 25



2.4. Proteínas de choque térmico.

Una vez localizados los genes de choque térmico en las especies del grupo *obscura*, el siguiente paso fue identificar los productos de su actividad, es decir las proteínas de choque térmico (hsps). Para ello se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Los tratamientos térmicos se aplicaron tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* y las glándulas salivares se mantuvieron, durante las incubaciones con el precursor radiactivo, a temperatura control ó de tratamiento.

En todas las variantes experimentales se obtuvieron los mismos resultados, que podemos resumir en dos puntos principales:

- Una clara disminución de las proteínas de desarrollo que están siendo sintetizadas en el momento de aplicar el tratamiento.
- La inducción extraordinaria de un número reducido de hsps, algunas de ellas presentes en los controles, pero en cantidades relativamente bajas. Concretamente se trata de 6 proteínas de choque térmico de pesos moleculares aparentes de 78800, 71000, 69650, 41060, 32000-32500 y 25400-26170 daltons.

Ambas características coinciden con lo encontrado en el estudio de los patrones de "puffs" inducidos por el choque térmico en las tres especies, siendo, en definitiva, el resultado de la fuerte regresión de la mayoría de los "puffs"-desarrollo y de la gran expresión de un pequeño número de "puffs"-temperatura.

En la figura 26 se presenta, como ejemplo, algunos densitogramas de los fluorogramas obtenidos. Se puede observar, además, que a medida que el tratamiento térmico es más severo (37°C), la disminución de las proteínas de desarrollo es más acusada, manteniéndose fundamentalmente la proteína de choque de 71000 daltons.

Al comparar los patrones de hsps de las especies del grupo *obscura* con el de *D. melanogaster* (figura 27), se detecta una clara homología entre ellos, como es de esperar, de acuerdo con los resultados de las hibridaciones *in situ*. Sin embargo, se pueden citar algunas diferencias de importancia:

- La familia hsp82 está representada en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, por una proteína (peso molecular aparente 78800 daltons) con idéntica movilidad electroforética que la hsp82 de *D. melanogaster*.

- La familia hsp70 de *D. melanogaster*, está formada por la hsp70 y hsp68, siendo la primera el producto más abundante del choque térmico (Tissières et al., 1974 y Lewis et al., 1975). Para las especies que nos ocupamos, se detecta fundamentalmente una proteína de peso aparente de 71000 daltons, equivalente a la hsp70 de *D. melanogaster*, mientras, que en ningún caso, se observa una proteína homóloga a la hsp68. Sin embargo, en los geles de concentración más baja y cuando los tiempos de exposición, de los fluorogramas, son más cortos, se puede apreciar para *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, una banda discreta muy pegada a la hsp70 (figura 28). Para esta proteína se ha calculado un peso aparente de 69650 daltons y por ello la designamos por hsp69.

Estos resultados, están de acuerdo con los obtenidos de las hibridaciones *in situ*, en las especies del grupo *obscura*, para ambos miembros de esta familia. Apoyan la hipótesis de que, en estas tres especies, se puede distinguir entre dos tipos de representantes de la familia hsp70 (hsp70 y hsp69), si bien los genes que codifican para estas proteínas han divergido mucho menos que en *D. melanogaster*.

- La familia de proteínas de bajo peso molecular, está representada por distintos miembros en las especies de ambos grupos. Esto no es de extrañar, puesto que constituye la familia más heterogénea del estrés térmico, incluso dentro del género *Drosophila*. Mientras en *D. melanogaster*, se distinguen dos dobletes de 28-26 kd. y 23-22 kd. respectivamente (Tissières et al., 1974 y Lewis et al., 1975), en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se detectan, sólo, dos proteínas, siendo éste el único caso de variabilidad dentro de las especies del grupo *obscura*. Esta variabilidad se traduce en diferentes pesos de estas proteínas en cada especie (*D. subobscura*: 32000 y 25500 ; *D. guanche*: 32200 y 25400; *D. madeirensis*: 32500 y 26170). Al tratarse de diferencias de poca magnitud, hablaremos de una hsp32 y hsp25, respectivamente, en las tres especies.

A raíz de estos resultados, podemos entender mejor los débiles marcajes obtenidos en las experiencias de hibridación *in situ*, cuando la sonda empleada correspondía a los genes de *D. melanogaster* que codifican para esta familia.

- Finalmente, se observa en los fluorogramas de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, una proteína de peso aparente de 41kd (hsp41) (figura 27). Esta proteína puede correlacionarse con la hsp34 de *D. melanogaster*, descrita por Tanguay (1985).

De los fluorogramas obtenidos se observa, además, que la síntesis proteica bajo diferentes temperaturas de tratamiento, muestra idénticos patrones en las tres especies del grupo *obscura*, alcanzando su máximo a 34°C (figura 27), tal como ocurre para los "puffs"-temperatura. Se observa un drástico descenso de esta actividad a 37°C, que es la temperatura óptima a la cual se pone en marcha todo el mecanismo genético del choque térmico de *D. melanogaster*.

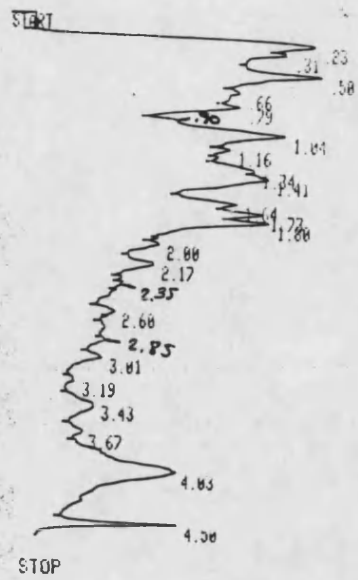
El estudio realizado en este apartado ha sido fundamentalmente de carácter cualitativo, puesto que éste era el objetivo principal que nos planteamos. Sin embargo, los densitogramas obtenidos de cada fluorograma, nos han proporcionado algunos datos sobre la cantidad sintetizada de hsp en relación al total de las proteínas que se han detectado. Tales datos vienen dados en forma de porcentajes, referidos al área que ocupa una banda proteica determinada, en el área total de su carrera electroforética. Por tanto, para una banda concreta, un área mayor indicaría una síntesis mayor de dicha proteína respecto de las demás. En la tabla 25 se indica, en estos términos, la cantidad de proteína sintetizada para cada hsp, en *D. subobscura*, *D. guanche*, *D. madeirensis* y *D. melanogaster*. Estos valores se han calculado como el promedio de los datos obtenidos de ocho fluorogramas. Puede observarse, que la relación entre la cantidad de proteína sintetizada en cada una de las especies del grupo *obscura*, y en *D. melanogaster*, es aproximadamente de 1:1 para la hsp82, y las hsps de la familia 70. En cuanto a las hsps de bajo peso molecular, la relación es de 2:1, entre *D. melanogaster* y cada una de las tres especies analizadas. Es decir, en todos los casos, se detecta una misma cantidad de hsp82 y de hsps de la familia 70, mientras que, en *D. melanogaster*, las proteínas de bajo peso molecular se sintetizan en doble cantidad que en las especies del grupo *obscura*. Ello es el resultado de que, en estas especies, hemos detectado sólo dos proteínas de esta familia (hsp32 y hsp25) frente a las cuatro de *D. melanogaster* (hsp28, hsp26, hsp23 y hsp22).

Con tales datos podemos suponer, como punto de partida, un número similar de genes ó copias de las familias HSP82 y HSP70 en todas las especies aquí tratadas, mientras en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, habría la mitad de genes que codifican para las hsps de bajo peso molecular, que en *D. melanogaster*. Esta cuestión será abordada, utilizando otra metodología, en el apartado siguiente.

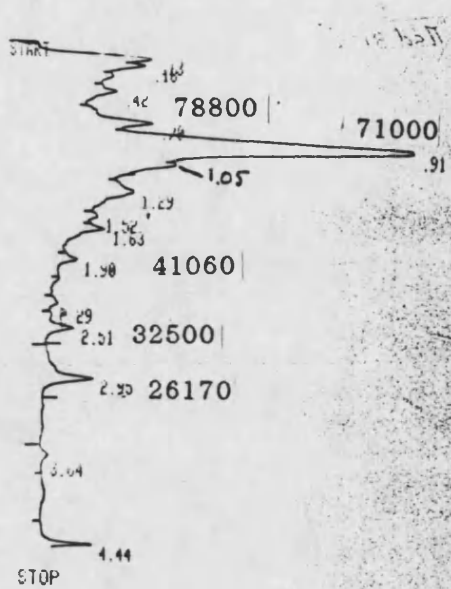
Tabla 25.- Cantidad relativa de proteína de choque sintetizada en las especies estudiadas.

	hsp82	hsps70	hsps de bajo PM
<i>D. melanogaster</i>	8.000	43.741	19.121
<i>D. subobscura</i>	9.179	38.668	8.121
<i>D. guanche</i>	7.776	38.422	8.541
<i>D. madeirensis</i>	7.849	45.541	9.203

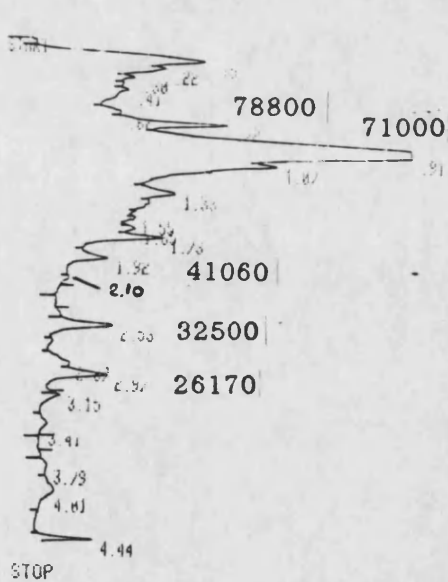
control



choque 31°C



choque 34°C



choque 37°C

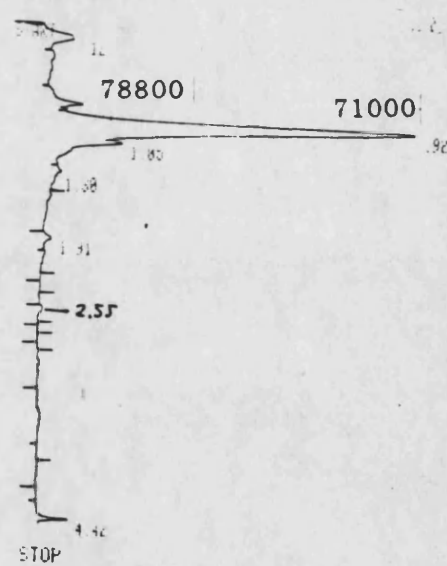


Figura 26.- Densitogramas correspondientes a los perfiles de síntesis proteica en *D. madeirensis*, en condiciones control y tras los diferentes tratamientos térmicos. Los pesos moleculares de las proteínas de choque se indican en daltons.

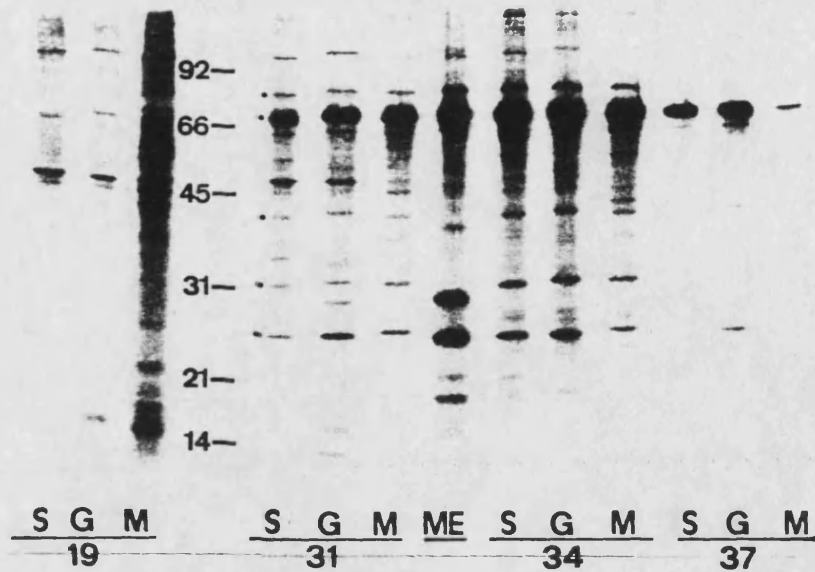


Figura 27.- Fluorograma de las proteínas marcadas en *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M), en condiciones no inducidas (19°C) y durante choques térmicos a 31°, 34° y 37°C. Se presenta el patrón de proteínas de choque de *D. melanogaster* (ME), así como un patrón estándar de pesos moleculares (92500, 66200, 45000, 31000, 21500 y 14500).

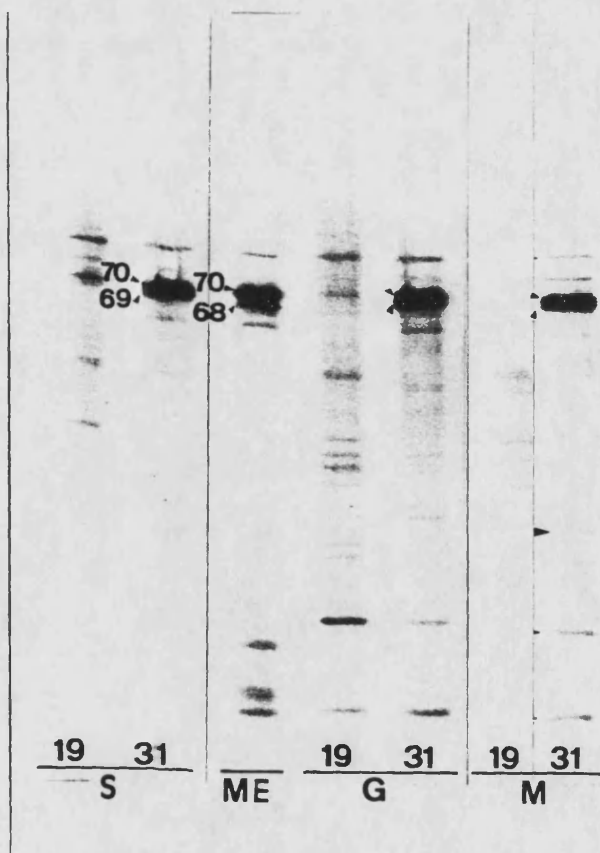


Figura 28.- Determinación, en las especies del grupo *obscura*, de proteínas diferentes dentro de la familia hsp70: hsp70 y hsp69. Las electroforesis fueron llevadas a cabo en geles del 9% de acrilamida y los tiempos de exposición de los fluorogramas fueron, aproximadamente, de 40 horas.

2.5. Caracterización molecular de los genes de choque térmico.

Una vez localizados los genes de choque térmico e identificado los productos de su actividad en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, nos planteamos hacer una primera caracterización molecular de dichos genes, en las citadas especies. Para ello, se analizaron los patrones de restricción de DNA genómico, de las tres especies, que se hibridaron con cada una de las sondas portadoras de los HSPs de *D. melanogaster*. En todos los casos, las hibridaciones se llevaron a cabo tal y como se especifica en el punto 3.12 de material y métodos.

Los resultados obtenidos nos dieron información referente, al número de miembros que integran cada familia HSP, a la estructura molecular de los mismos y a su posible organización en los genomas de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, valiéndose del conocimiento disponible de esta familia multigénica en *D. melanogaster*.

En este apartado emplearemos el término gen para referirnos a su secuencia codificadora y a las regiones adyacentes conservadas del mismo.

Analizaremos cada familia génica por separado:

2.5.1. Familia HSP82.

Los DNAs genómicos, de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, fueron digeridos con los enzimas de restricción *HaeII*, *PstI*, *PvuII*, *SalI*, *XbaI* y *XhoI*. llevándose a cabo, en algunos casos, digestiones dobles con tales endonucleasas.

La sonda empleada en las hibridaciones fue el fragmento interno *HaeII* de 2.8kb del clon 301.1 (Holmgren et al., 1981), que contiene prácticamente toda la unidad de transcripción del gen HSP82 de *D. melanogaster* (figura 29a). Como se observa en la figura, la unidad de transcripción de dicho gen, está formada por dos exones de 0.15 y 2.6kb respectivamente (áreas negras), entre las cuales se sitúa un intrón de 1.1kb (área en blanco). En dicha figura se indican los puntos de corte de los enzimas de restricción empleados en las digestiones de los DNAs genómicos. En todos los casos, se llevaron a cabo controles con DNA genómico de *D. melanogaster* (cepa OrR), digerido con tales enzimas. Los lavados de los filtros fueron siempre de estringencia moderada.

En la figura 29b se presentan algunos de los filtros obtenidos en estas experiencias. De su análisis se deducen dos características importantes, respecto de la organización y estructura molecular del gen HSP82 en las especies del grupo *obscura*:

1. Los patrones de hibridación se adaptan a la hipótesis de que hay una sola copia del gen HSP82 por

genoma haploide, en las tres especies, al igual que en *D. melanogaster*.

2. Los patrones de hibridación son muy similares, aunque no idénticos, entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, mostrando diferencias muy marcadas respecto de *D. melanogaster*. En ninguna especie del grupo *obscura*, se detectan los fragmentos internos *HaeII* de 2.8kb y *PstI* de 0.85kb de *D. melanogaster*. De igual modo, al menos dos sitios *PvuII*, característicos de esta especie, se han perdido en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Por el contrario, las tres especies muestran un fragmento *SalI* de 1.1kb, no observado en *D. melanogaster*.

Para los enzimas *XhoI* y *XbaI*, los resultados obtenidos indican la presencia de un único punto *XhoI* y de varios *XbaI*, probablemente en el intrón, como ocurre en *D. melanogaster*.

Con el fin de localizar el fragmento *SalI* de 1.1kb, característico de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, en el gen HSP82 de estas especies, los DNAs genómicos fueron digeridos doblemente con los enzimas *HaeII* y *SalI*, e hibridados, esta vez, con el fragmento *EcoRI-SalI* de 2.6kb del clón 301.1 (figura 29a). A pesar del bajo nivel de detección de los híbridos los resultados fueron satisfactorios. Como era de esperar, sólo se detectó, en *D. melanogaster* (control), el fragmento *HaeII-SalI* de 1.9kb (figura 29b*), mientras en ninguna de las especies del grupo *obscura* se observó el fragmento *SalI* característico. Estos resultados indicaron la presencia de dicho fragmento en la región del gen donde no hibrida la sonda, es decir, en el extremo 3' del segundo exón. En cambio, se detectó en *D. subobscura* el fragmento *HaeII-SalI* de 3.4kb y en *D. guanche* y *D. madeirensis* el de 0.75kb. indicándonos la presencia de dichos fragmentos, en la región 5' del gen, donde la sonda hibrida.

Por la metodología empleada, no podemos determinar con exactitud la estructura del gen HSP82 en las tres especies analizadas. Sin embargo, dada la gran conservación que muestra este gen en especies evolutivamente alejadas (Blackman y Meselson, 1986), suponemos que, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, muestran, igualmente, una organización similar a la descrita en *D. melanogaster*, es decir, con dos exones y un intrón central. Partiendo de este presupuesto, proponemos para el gen HSP82 de las especies del grupo *obscura*, un primer mapa de restricción, a partir de los sitios de restricción detectados (figura 29c). Según este mapa, se han producido, respecto de *D. melanogaster*, al menos, ocho cambios, dos de ellos suponen ganancia en nuevos sitios de restricción (*SalI* y *HaeII*, éste último sólo para *D. guanche* y *D. madeirensis*) y el resto constituyen pérdidas en dianas de reconocimiento para los enzimas *HaeII*, *PstI* y

PvuII. Se observa, pues, cómo un número de cambios relativamente pequeño puede modificar fuertemente los patrones de restricción de las especies analizadas respecto a los de *D. melanogaster*. Por otra parte, las diferencias observadas entre los patrones de hibridación de las tres especies del grupo *obscura*, se explicarían por distintos puntos de corte de los enzimas, fuera de la unidad de transcripción del gen, es decir, en regiones menos conservadas. Datos preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación, sobre la secuencia del gen HSP82, en *D. subobscura*, confirman estos resultados.

2.5.2. Familia HSP70.

En *D. melanogaster*, la familia HSP70 está representada por dos genes relacionados, conocidos como HSP70 y HSP68. El primero se organiza en copias múltiples en los loci 87A y 87C, mientras el gen HSP68 se localiza, en copia única, en el locus 95D. Entre ambos genes se ha determinado un 15% de divergencia a partir de los estudios de reasociación del DNA (Holmgren *et al.*, 1979).

La organización de las múltiples copias del gen HSP70 en *D. melanogaster*, es bastante compleja. El locus 87A contiene dos copias con polaridad opuesta, mientras en el locus 87C, los genes HSP70 se organizan en dos dominios diferentes. Generalmente, se distingue, en dicho locus, un sólo gen proximal, separado por unas 40kb de DNA (región $\alpha\beta$), de otros dos genes situados en la parte distal de dicho locus. El número de genes HSP70 en el locus 87C varía entre 3-5 copias dependiendo del genotipo y cepa de *Drosophila* estudiada.

Cada copia del gen HSP70 se organiza en una unidad básica muy conservada, de 2.5kb (elemento z), que comprende la región codificadora, de 2.1kb (z_c) y 400pb situadas en el extremo 5' de z_c , que no transcriben (z_{nc}). Los elementos z de cada locus cromosómico pueden diferenciarse entre sí por la presencia de sitios de restricción característicos, determinándose un 4.2% de divergencia entre las copias HSP70 de ambos loci (ver revisión de Craig, 1985).

Los resultados obtenidos de las experiencias de hibridación *in situ*, en las especies del grupo *obscura*, indicaron la presencia de genes de la familia HSP70 en los loci cromosómicos 89A y 94A. A diferencia de *D. melanogaster*, los miembros de esta familia han divergido menos en estas especies. De acuerdo con los resultados obtenidos de los patrones de proteínas de choque térmico, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se han podido distinguir dos miembros de esta familia, HSP70 y HSP69. Ambos muestran mayores homologías entre sus secuencias codificadoras que los genes HSP70 y HSP68 de *D. melanogaster*. Por tales razones, y por la metodología

empleada en la caracterización molecular de los genes de choque térmico, no vamos a poder discriminar entre genes distintos de la familia HSP70 en las especies del grupo *obscura*. Por tanto, hablaremos de miembros de esta familia, sin hacer distinción entre sus posibles componentes (HSP70 y HSP69).

Para determinar el número de copias de los genes de la familia HSP70 en las tres especies estudiadas, los DNAs genómicos fueron digeridos con los enzimas *XhoI-EcoRI* y *HincII*. En *D. melanogaster*, *XhoI* corta dentro de la región α del gen HSP70, mientras *EcoRI* presenta cortes externos (Ish-Horowicz et al., 1979). Para *HincII* hay dianas tanto dentro como fuera de la región codificadora de este gen (Holmgren et al., 1979).

La sonda empleada en las hibridaciones fue el fragmento *XbaI* de 2.2kb del clón 122 (Goldschmidt-Clermont, 1980) que contiene la mayor parte de la unidad α del gen HSP70 de *D. melanogaster* (figura 30a). Los lavados se llevaron a cabo a estringencias moderada-alta y alta, con el fin de evitar la hibridación de la sonda con secuencias del gen HSP68, en *D. melanogaster*.

En la figura 30b, se presentan los resultados obtenidos para las digestiones *XhoI-EcoRI* y *HincII*. En *D. melanogaster* (cepa OrR), se detectan, en ambos casos, 4 bandas de intensidad relativa de 1:1:1:2, indicándonos la presencia de las 5 copias del gen HSP70 características de esta cepa. Siguiendo el mismo razonamiento, para *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, pueden contarse, al menos, 4 copias por genoma haploide. En la digestión *XhoI-EcoRI*, se obtienen, en *D. subobscura* y *D. madeirensis*, 3 bandas de intensidad relativa 1:1:2, mientras en *D. guanche* se detectan 4 fragmentos de igual intensidad. La quinta banda observada en esta especie, es demasiado pequeña para contener un gen completo. Igualmente, en la digestión *HincII* se detectan 3 bandas o un doblete y una banda, según qué especie, de intensidades relativas de 1:1:2.

Al no examinar otras cepas de *D. subobscura*, *D. guanche* ó *D. madeirensis*, no se ha determinado, si el número de copias para los genes de esta familia, varían en estas especies, como ocurre en *D. melanogaster*.

La organización de las copias del gen HSP70 en los loci 87A y 87C en las especies del grupo *melanogaster*, puede determinarse de las digestiones *SacI*. Este enzima se caracteriza por cortar específicamente en los extremos 3' del gen HSP70 en estas especies (Craig et al., 1979; Ish-Horowicz y Pinchin, 1980; Brown y Ish-Horowicz, 1981). Para *D. melanogaster* se observan, en los filtros, una banda de gran tamaño y otra menor de 5.2kb, correspondientes a las copias de los loci 87C y 87A respectivamente. En otras especies del mismo grupo, se detecta, solamente la banda de

5,2kb, resultado de una organización idéntica en ambos loci (Brown y Ish-Horowicz, 1981).

De los patrones de hibridación obtenidos en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* (figura 30c), podemos deducir que tales especies, a excepción de *D. guanche*, no presentan la organización característica de la mayoría de las especies del grupo *melanogaster*, es decir la presencia de dos genes HSP70 adyacentes, con polaridad opuesta. En *D. guanche* se detecta una banda de 5,3kb que podría responder a dicha organización.

Con el fin de caracterizar la región z de los genes de esta familia, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se llevaron a cabo digestiones dobles *Bam*HI-*Xho*I, *Bam*HI-*Sal*I y *Sal*I-*Pst*I. De las tres digestiones se obtienen, en *D. melanogaster*, fragmentos internos del gen HSP70, siendo unos característicos de todas las copias de este gen, independientemente de su localización y otros propios de cada locus (variante 87A/variante 87C) (Holmgren et al., 1979). Los fragmentos internos *Bam*HI-*Xho*I de 1.4kb y *Bam*HI-*Sal*I de 0.9kb, característicos de todos los genes HSP70 de *D. melanogaster*, no se detectaron en ninguna de las tres especies del grupo *obscura* (figura 30d). Lo mismo se obtuvo para los fragmentos *Pst*I-*Sal*I de 1.25 y 0.85kb, propios del locus 87A de *D. melanogaster* y el fragmento *Pst*I-*Sal*I de 1.09kb del locus 87C (figura 30d).

De los resultados hasta ahora presentados y de aquellos que se muestran en la figura 30e, proponemos una sencilla estructura para un elemento z de alguno de los miembros HSP70 de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Por la intensidad de la señal de los híbridos en las bandas electroforéticas correspondientes, pensamos que más de uno de los cuatro miembros postulados, presentará dicha estructura. De acuerdo con ella, dicho elemento z, se caracteriza por contener un fragmento *Xho*I de 2Kb (1.8kb en *D. guanche*), que no presenta ninguna diana interna para los enzimas *Eco*RI (ver digestión *Xho*I-*Eco*RI de la figura 30b), *Bam*HI (digestión *Xho*I-*Bam*HI de la figura 30d) y *Sal*I (digestión *Xho*I-*Sal*I de la figura 30e). Los enzimas *Xba*I y *Sal*I cortarían fuera del fragmento *Xho*I, cerca de los puntos de restricción de dicho enzima, de forma que de la digestión doble *Xba*I-*Sal*I se detecta un fragmento de 2.2 kb, al igual que en *D. melanogaster* (figura 30e).

2.5.3. Familia de genes HSPs que codifican para las proteínas de choque de bajo peso molecular.

En *D. melanogaster*, se han identificado dentro de esta familia, cuatro genes de copia única (HSP28, HSP26, HSP23 y HSP22), agrupados en una región de 12kb en el locus cromosómico 67B, cuyos transcritos presentan un tamaño entre 1.25-1kb (Corces et al., 1980). Todos ellos muestran una amplia homología entre si, que puede detectarse con experiencias de hibridación bajo condiciones poco severas de estringencia (Wadsworth et al., 1980).

Los genes que codifican para las proteínas de bajo peso molecular, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, mantienen, al igual que en *D. melanogaster*, una estrecha unión citológica, tal y como se ha visto en las experiencias de hibridación *in situ*, en el apartado 2.3.

Con el fin de continuar en el estudio molecular de estos genes, se llevaron a cabo experiencias de detección de secuencias homólogas a los genes de *D. melanogaster*, en el DNA genómico de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Estos fueron digeridos con los enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I y *Sal*I. Las sondas empleadas en las hibridaciones fueron las siguientes (figura 31a): Los fragmentos *Eco*RI-*Pst*I de 2.7kb y 2.15kb del clón 88.5 (Corces et al., 1980), que contienen, respectivamente, los genes HSP28 y HSP23 de *D. melanogaster* (cepa Cantón S), y los fragmentos *Eco*RI-*Bam*HI de 2.35kb y *Bam*HI-*Hind*III de 1kb del clón 88.6 (Corces et al., 1980), portadores, respectivamente, de los genes HSP26 y HSP22 de esta especie.

Las hibridaciones fueron, en todos los casos, de estringencia moderada. Los controles se llevaron a cabo con DNA genómico de la cepa Canton S de *D. melanogaster*, digerido con los enzimas mencionados.

De los resultados obtenidos en estas experiencias, se deducen, principalmente, cuatro hechos:

1.- *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, presentan secuencias relacionadas con los cuatro genes de *D. melanogaster*, pertenecientes a esta familia. El grado de similitud mostrado entre tales secuencias es menor que el existente entre los otros genes HSPs de estas especies, de acuerdo con los resultados de las hibridaciones *in situ*.

2.- Para cada uno de los enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Sal*I, se detectaron los mismos fragmentos, en las tres especies del grupo *obscura*, independientemente de la sonda utilizada (figura 31b).

En *D. melanogaster*, los patrones de hibridación obtenidos responden a la organización de los cuatro genes en el locus 67B de esta especie. Así, de la digestión *Hind*III se obtiene un fragmento de 12kb que

contiene a los cuatro genes (Corces et al., 1980), de ahí que todas las sondas detecten el mismo fragmento. Para el enzima *Bam*HI se originan dos fragmentos de 12 y 4.7kb, portadores de los genes HSPs28,23,26 y HSP22, respectivamente (Craig y McCarthy, 1980). Finalmente, la digestión *Sa*II da lugar a dos secuencias, una de 5.8kb (HSPs28-23) y otra mucho mayor que contiene a los genes HSP26 y HSP22 (Corces et al., 1980).

En las tres especies del grupo *obscura*, se detectaron los fragmentos *Hind*III de 3.5-3.7kb; *Bam*HI de 7-7.4kb y *Sa*II de 6.5kb, independientemente de la sonda utilizada (figura 31b). Podemos pensar que tales enzimas den lugar a fragmentos que contengan a los HSPs de esta familia, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Teniendo en cuenta que la unidad de transcripción necesaria para que un gen codifique una proteína de bajo peso molecular, se calcula de 1.5-1kb, el tamaño de los fragmentos de restricción *Hind*III, indicaría que, al menos, hay dos genes en las citadas especies. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en la detección de proteínas de choque en geles de poliacrilamida. Recordemos que en estas especies, hemos identificado dos proteínas de bajo peso molecular (hsp32 y hsp25).

Las ligeras variaciones que se observan, en la movilidad electroforética de los híbridos de DNA, entre las especies del grupo *obscura*, pueden corresponderse con las pequeñas variaciones, que también detectábamos, en la migración de las bandas proteicas entre estas especies. En definitiva, ello nos indica que los HSPs de esta familia, y por tanto, las proteínas por ellos codificadas, presentan tamaños ligeramente diferentes entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*.

3.- Las hibridaciones realizadas sobre DNA genómico digerido con el enzima *Pst*I, mostraron un diferente patrón dependiendo de la sonda utilizada. Para aquellas que contienen los genes HSP28 ó HSP23 de *D. melanogaster*, se detectaron los mismos fragmentos en las tres especies del grupo *obscura*. Lo mismo se obtuvo para las sondas portadoras del gen HSP26 ó HSP22, siendo este patrón diferente al observado con los otros dos genes (figura 31c). La misma situación se dió, en *D. guanche*, en la digestión *Eco*RI, es decir, las sondas HSP28 y HSP23 mostraron el mismo patrón, el cual difería del que se obtuvo para las sondas HSP26 y HSP22, siendo el de estas idénticos. En las otras dos especies del grupo *obscura*, se obtuvieron idénticos perfiles *Eco*RI independientemente de la sonda utilizada.

Esta variabilidad encontrada entre la detección de las sondas HSP28 y HSP23 respecto de las sondas HSP26 y HSP22, sugiere, de nuevo, la presencia de, al menos, dos genes de esta familia en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. De los dos genes, uno de ellos mostraría mayor homología con los HSP28 y HSP23 de *D. melanogaster*, que con los HSP26 y HSP22 de dicha especie. Para el otro gen la relación de similitud sería la contraria.

En las digestiones *Bam*HI, *Hind*III y *Sal*I no se detectaron diferencias de este tipo, lo cual se explica si suponemos, como hemos considerado antes, que dichos enzimas den lugar a fragmentos que contengan a ambos genes, cosa que no ocurre para *Pst*I y *Eco*RI. Debe haber dianas *Pst*I dentro de uno de los genes, en las tres especies estudiadas, tal y como se observa en la figura 31c.

4.- Al nivel de estringencia en el que nos hemos movido, los genes de *D. melanogaster*, pertenecientes a esta familia, detectaron secuencias relacionadas en los genomas de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Por el contrario, en *D. melanogaster* no se detectaron, en ningún caso, secuencias homólogas entre los distintos genes de la familia. Este hecho parece indicarnos un menor grado de evolución de los HSPs de las especies del grupo *obscura*, cuya interpretación será discutida en el apartado correspondiente de la discusión, de acuerdo con la existencia de un ancestro común del cual derivaron, durante la radiación *Sophophora*, todos los genes que codifican para las proteínas de choque de bajo peso molecular.

Figura 29.- Caracterización molecular del gen HSP82 en *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M).

(a) Mapa de restricción del clón 301.1 (Holmgren et al., 1981) y de la unidad de transcripción del gen HSP82 (Blackman y Meselson, 1986). H: *Hae*II, S: *Sal*I, P: *Pst*I, Pv: *Pvu*II, Xh: *Xho*I, Xb: *Xba*I y R: *Eco*RI. Las áreas en negro representan a sendos exones separados por un intrón central (área en blanco). Las sondas empleadas en las hibridaciones se indican por líneas horizontales flanqueadas por círculos.

(b) Resultados obtenidos de las hibridaciones en los filtros de nylon. En todos los casos se utilizó como sonda el fragmento interno *Hae*II de 2.8kb, a excepción de la digestión *Hae*II-*Sal*I(*), en la cual fue el fragmento *Eco*RI-*Sal*I de 2.6kb.

El fragmento *Sal*I de 1.1kb característico de las tres especies estudiadas, es señalado por puntas de flecha en los patrones de hibridación correspondientes.

Como patrón de pesos moleculares se indica, en kb, el de las bandas detectadas en los controles, representados por el DNA genómico de *D. melanogaster* (ME).

(c) Mapa de restricción del gen HSP82 en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Se ha tenido en cuenta la estructura que dicho gen presenta en *D. melanogaster* (e1, e2 hacen referencia a ambos exones; i al intrón). Xb* indica que es posible varias dianas para este enzima en la región señalada.

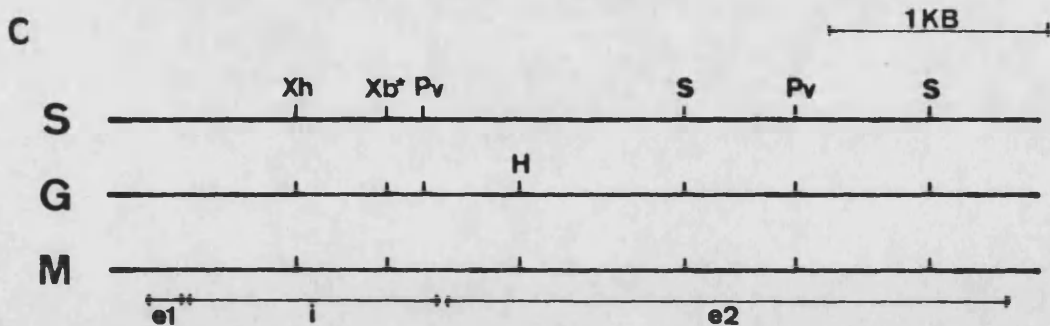
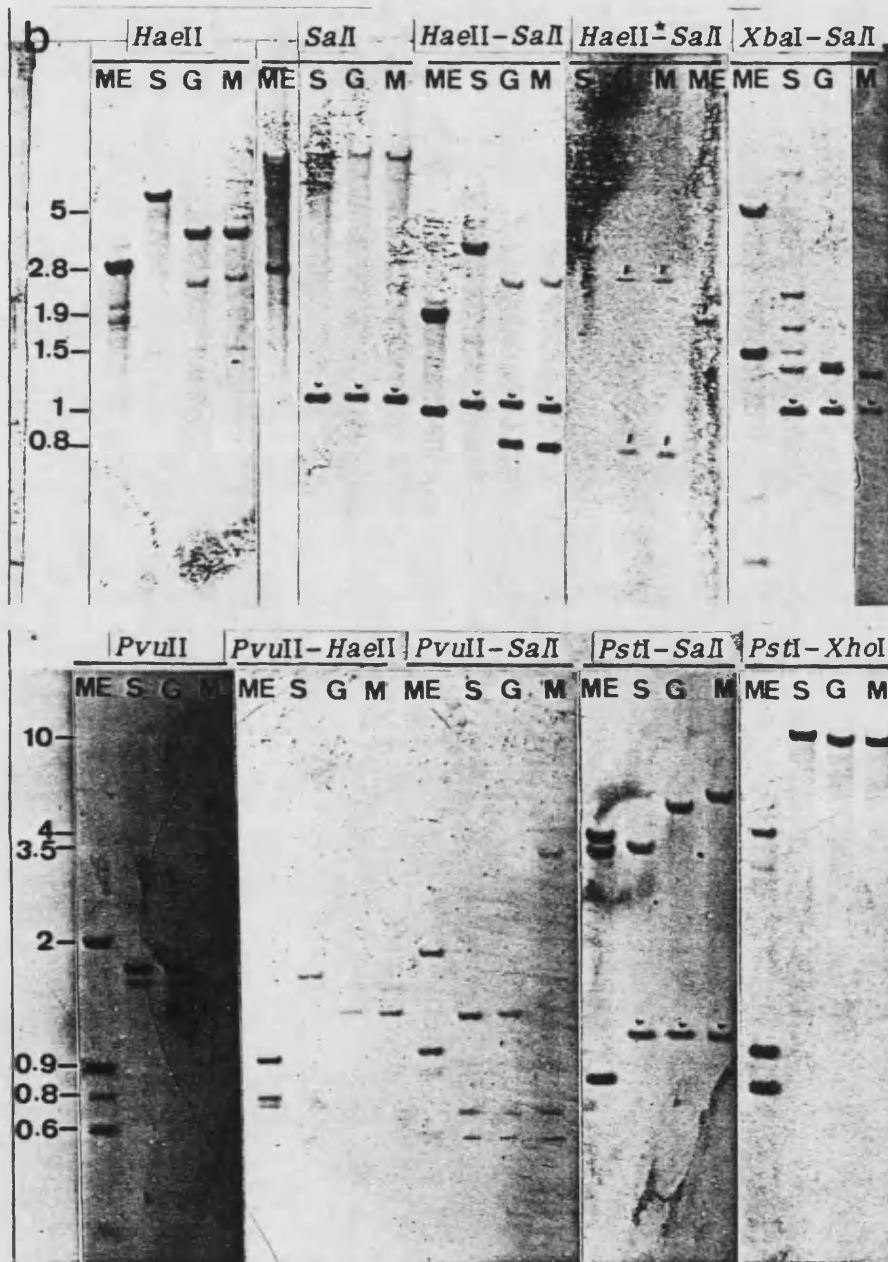
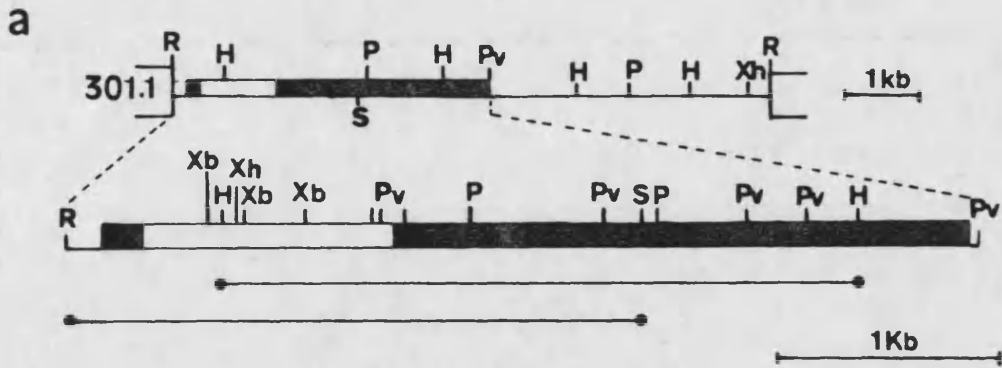


Figura 30.- Caracterización molecular de la familia HSP70 en *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M).

(a) Mapa de restricción del clón 122, que contiene las copias del gen HSP70 del locus 87A de *D. melanogaster* (Goldschmidt-Clermont, 1980). B: *Bam*HI, S: *Sal*I, P: *Pst*I, Xh: *Xho*I, Xb: *Xba*I y R: *Eco*RI. Las áreas en negro representan las regiones codificadoras del elemento z (z_c) y las áreas rayadas a z_{nc} . Mediante flechas se indica la polaridad de ambas unidades de transcripción. La sonda empleada en las hibridaciones viene indicada por líneas horizontales flanqueadas por círculos.

(b) Determinación del número de copias de los genes de la familia HSP70 en las tres especies estudiadas. Se indica como marcador de pesos moleculares el de los fragmentos de λ -*Hind*III, expresados en kb.

(c) Organización de dichas copias en los respectivos genomas.

(d) y (e) Caracterización del elemento z de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Mediante puntas de flecha se señalan los fragmentos *Xho*I y *Xba*I-*Sal*I de 2 y 2.2kb, respectivamente.

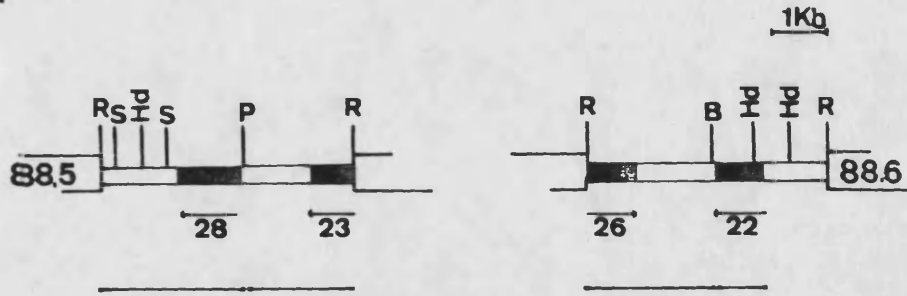
Figura 31.- Caracterización molecular de la familia HSP de las proteínas de pequeño tamaño, en *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G) y *D. madeirensis* (M).

(a) Mapa de restricción de los clones 88.5 y 88.6, portadores de los genes HSPS28-23 y HSPS26-22, respectivamente, de *D. melanogaster* (Corces et al., 1980). B: *Bam*HI, S: *Sal*I, *Hind*III: H, P: *Pst*I y R: *Eco*RI. Las sondas utilizadas en las experiencias de hibridación se indican por líneas horizontales flanqueadas por círculos.

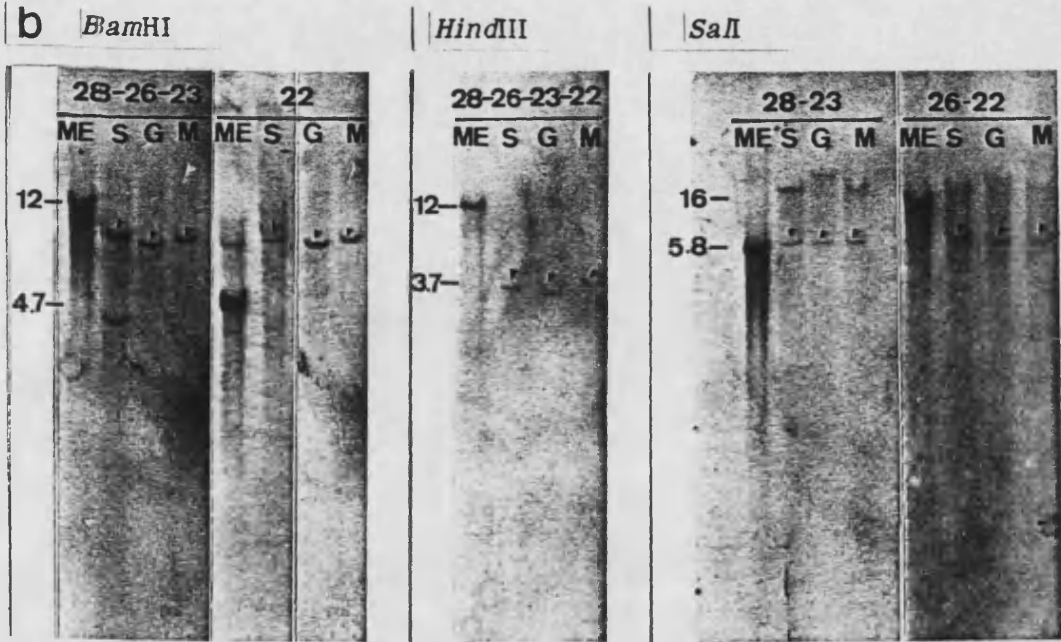
(b) Resultados obtenidos de las digestiones *Bam*HI, *Hind*III y *Sal*I. Para cada uno de estos enzimas se obtienen los mismos patrones de hibridación, en las tres especies, independientemente de la sonda utilizada.

(c) Resultados obtenidos de las digestiones *Pst*I y *Eco*RI. Los patrones de hibridación dependen de la sonda utilizada.

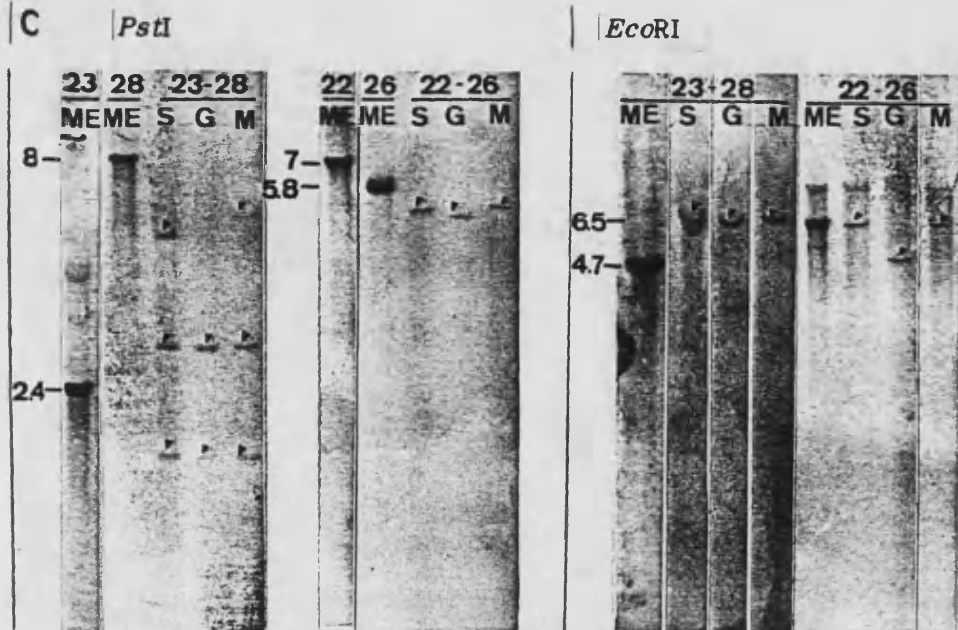
a



b



c



2.6. Identificación del locus hsrw: efecto de la benzamida y del paracetamol en el patrón de "puffs".

En todas las especies de *Drosophila* estudiadas hasta el momento, se ha observado que del conjunto de "puffs" de choque térmico, uno de ellos muestra una serie de características fenotípicas que le diferencian del resto de "puffs"-temperatura. Se trata del locus hsrw (locus que codifica para un RNA de choque térmico denominado RNA omega) (Bendena *et al.*, 1989), siendo designado en cada especie por el nombre de la banda(s) cromosómica(s) donde se localiza.

La primera característica observada, respecto de este locus, fue su inducción selectiva e independiente del resto de "puffs"-temperatura, por diversos agentes que tienen en común, inhibir, de forma general, la transcripción en los cromosomas. Estos estudios empiezan con los trabajos de Lakhotia y Mukherjee (1970) cuando observaron, en *D. melanogaster*, la activación de un "puff" específico de choque térmico (93D) por efecto de la benzamida.

Con objeto de identificar el locus hsrw en las especies del grupo *obscura* que estudiamos (*D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*), se realizaron experiencias autorradiográficas en los cromosomas politénicos de dichas especies, en condiciones inducidas por benzamida (BM) ó paracetamol (PT). Se eligió la benzamida por ser uno de los agentes más estudiados y el paracetamol por su disponibilidad. Ambos agentes presentan un singular efecto en *D. melanogaster* (Lakhotia, 1987).

De entre los diferentes tratamientos descritos en el punto 3.3 de material y métodos, se obtuvieron los mejores resultados cuando las glándulas salivares tratadas con BM ó PT fueron incubadas con el isótopo radiactivo en presencia de los agentes inductores. La menor respuesta mostrada por las glándulas tratadas con BM ó PT, pero incubadas, durante los marcajes, en suero Ringer carente de tales agentes, puede explicarse por una rápida recuperación de las glándulas durante el periodo de incubación. Tales efectos de recuperación fueron ya descritos en *D. melanogaster* por Lakhotia y Mukherjee (1980).

Los tratamientos con BM fueron mucho más enérgicos que los tratamientos con PT. En líneas generales, para cada agente, se observó, respecto de los controles, lo siguiente (figuras 32 y 33):

- Una reducción generalizada de la síntesis de RNA en los cromosomas.
- La incorporación de ^3H -uridina en los nucleolos no se vió afectada por los tratamientos.
- La superactivación de un único "puff", el 85AB, en las tres especies del grupo *obscura*. Además ningún otro "puff" inducido por el choque térmico, mostró marca autorradiográfica tras los tratamientos con BM ó PT.

La localización del "puff" 85AB en el cromosoma O de *D. guanche* difiere respecto de *D. subobscura* y *D. madeirensis*, por una inversión paracéntrica característica de la primera especie (figura 21).

Al igual que en el choque térmico, algunos autorradiogramas muestran también la no regresión de los "puffs"-desarrollo característicos del estadio en el cual se aplicaron los tratamientos, sin presentar incorporación de ³H-uridina (figura 32b).

Es importante señalar, que esta respuesta a la acción de la benzamida ó el paracetamol no es totalmente homogénea. Es decir, en algunas glándulas el "puff" 85AB muestra una menor activación, así como, se observa que el grado de represión de la síntesis de RNA en los cromosomas, varía entre el 50% y prácticamente el 100% en las diferentes glándulas (figura 32c). Presumiblemente, tales variaciones detectadas en algunas glándulas, puedan atribuirse a variaciones en las condiciones experimentales, como a variaciones de las condiciones de desarrollo propias de cada glándula.

Una vez se ha identificado funcionalmente el locus *hsrw* en las especies estudiadas, nos planteamos determinar su grado de homología respecto al gen equivalente de *D. melanogaster*. Para ello se recurrió a la metodología que nos facilita la Biología molecular, empleando técnicas de hibridación con sondas específicas. A partir del clón p5A, portador de un fragmento de 5kb procedente del "puff"-benzamida 93D de *D. melanogaster* (Ryseck et al., 1985), nos construimos nuestras propias sondas, teniendo en cuenta la organización de dicho locus. Básicamente consiste en una secuencia única de 2kb (dos exones y un intrón central de 700pb), seguida de repeticiones directas de 280pb, que se extienden a lo largo de 10-12kb. Estas unidades repetidas son ricas en sitios de restricción para las enzimas *AsuI* y *TaqI* y parecen ser exclusivas de este locus (Walldorf et al., 1984). Las mayores homologías encontradas en el locus *hsrw*, entre las diversas especies analizadas, corresponden a una corta región del intrón (Pardue et al., 1990). El clón p5A incluye ambos exones con el intrón y parte de la región repetitiva.

En la figura 34a se especifica qué fragmentos del clón p5A, fueron utilizados como sondas en nuestras experiencias de hibridación:

- el clón entero (s1);
- un fragmento *ClaI* de 1 kb que contiene el intrón y parte del exón 1 (s2);
- y un fragmento *AvaII* de 3,6kb procedente de la región repetitiva (s3).

Las tres sondas fueron marcadas radiactivamente para experiencias de hibridación *in situ*, en los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. Las sondas s2 y s3 se marcaron con digoxigenina, para la detección de secuencias relacionadas con el intrón y región repetitiva del locus hsrw de *D. melanogaster*, en el DNA genómico de las especies del grupo *obscura*. Los lavados fueron en todos los casos de estringencia moderada (punto 3.12 y 3.13 de material y métodos). Los DNAs genómicos se digirieron con *Pst*I, cuando la sonda empleada fue s2, porque hay un único sitio *Pst*I en el intrón de *D. melanogaster* y *Taq*I cuando la sonda fue s3, debido a la riqueza en sitios específicos para esta enzima en la región repetitiva del locus hsrw en esta especie.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- En las experiencias de hibridación *in situ*, sólo obtuvimos marcas autorradiográficas en los controles (*D. melanogaster*), en el "puff" 93D, para las tres sondas empleadas. (figura 34b).
- Iguales resultados se obtuvieron, cuando se empleó la sonda s3 en las hibridaciones sobre filtros de nylon (figura 34d). Puede observarse, en *D. melanogaster*, una fuerte señal a la altura correspondiente a las unidades *Taq*I características del locus hsrw de esta especie.
- Con la sonda s2 se detectaron, en los "Southern blots", fuertes señales en *D. melanogaster* y débiles marcas en todas las especies del grupo *obscura* (figura 34c). De acuerdo con Garbe *et al* (1989), en *D. melanogaster*, se esperaba detectar a los híbridos en una sola banda de aproximadamente 3,4 kb. La presencia de una banda extra más pesada, se explica por una digestión parcial del DNA genómico de dicha carrera. A pesar de que los resultados obtenidos con esta sonda, no fueron del todo satisfactorios por la cantidad de ruido de fondo presente en todos los filtros, se puede apreciar una débil señal en *D. subosbcura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, concretamente en las bandas de 3,6kb, 0,84kb y 4,5kb respectivamente. Para las tres especies, se obtiene, pues, señal en una sola banda *Pst*I como ocurre en *D. melanogaster*.

Los resultados de todas estas experiencias, nos indican una mayor conservación del locus hsrw en la región correspondiente al intrón, entre las especies analizadas, a pesar de que, los niveles de hibridación detectados, para esta región, sugieren una baja homología entre las especies del grupo *obscura* y *D. melanogaster*. Por la naturaleza de los datos, no podemos determinar si las débiles señales se deben a la presencia de cortas regiones (40-60pb) con fuerte homología ó a secuencias algo mayores, pero de baja identidad.

Aunque las hibridaciones *in situ* no nos han facilitado la información relativa a la localización de secuencias homólogas al locus *hsrw* de *D. melanogaster*, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, los "Southern blots" han mostrado una única banda de hibridación *Pst*I para cada especie, como se esperaría de la existencia de un sólo locus *hsrw* por genoma haploide. La evidencia experimental, que hemos presentado en la primera parte de este apartado, respecto a la inducción selectiva por benzamida y paracetamol del "puff" 85AB, lo convierte en el candidato seguro del locus *hsrw* en las tres especies del grupo *obscura*.

2.7. Determinación de la ordenación génica del cromosoma O de *D. guanche*.

Es interesante señalar, cómo los resultados obtenidos del estudio de la actividad génica en condiciones inducidas, en las tres especies del grupo *obscura*, han contribuido en definir mejor la ordenación génica del cromosoma O de *D. guanche*. Con respecto a la ordenación estándar de este cromosoma, *D. guanche* presenta una inversión específica, solapada con la O_3 , cuyos puntos de inversión han sido ampliamente discutidos. Krimbas y Loukas (1984), y Felger (1985) propusieron respectivamente los siguientes puntos de rotura: 84D/85A-94E y 84D/85A-93C/D. Del análisis comparativo entre los patrones de bandas del cromosoma O de *D. subobscura* y *D. guanche*, consideramos, en un principio, a 84D/85A-93D/94A como límites de dicha inversión (Moltó et al., 1987). Siguiendo esta ordenación, la región 94A no se detectaba en forma de "puff" en *D. guanche* (figura 35a).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos un nuevo punto de rotura para el límite distal de la inversión específica de *D. guanche* (94A/B) (figura 35b). Se trata de un pequeño cambio respecto al patrón de bandas del cromosoma, difícil de determinar a microscopía óptica por tratarse de una región clara de interbanda. Sin embargo, esta pequeña modificación supone un gran cambio desde el punto de vista funcional y genético. Según la nueva hipótesis, los loci 85AB y 94A se situarían uno al lado del otro, apareciendo como un único "puff" tras choque térmico. Como se ve en la figura 22, en *D. guanche*, el gen HSP70 se localiza en la parte distal de este gran "puff" (locus 94A), mientras que la región proximal constituye el locus 85AB, que como sabemos se trata del "puff" inducido selectivamente por benzamida y paracetamol, en las tres especies del grupo *obscura*.

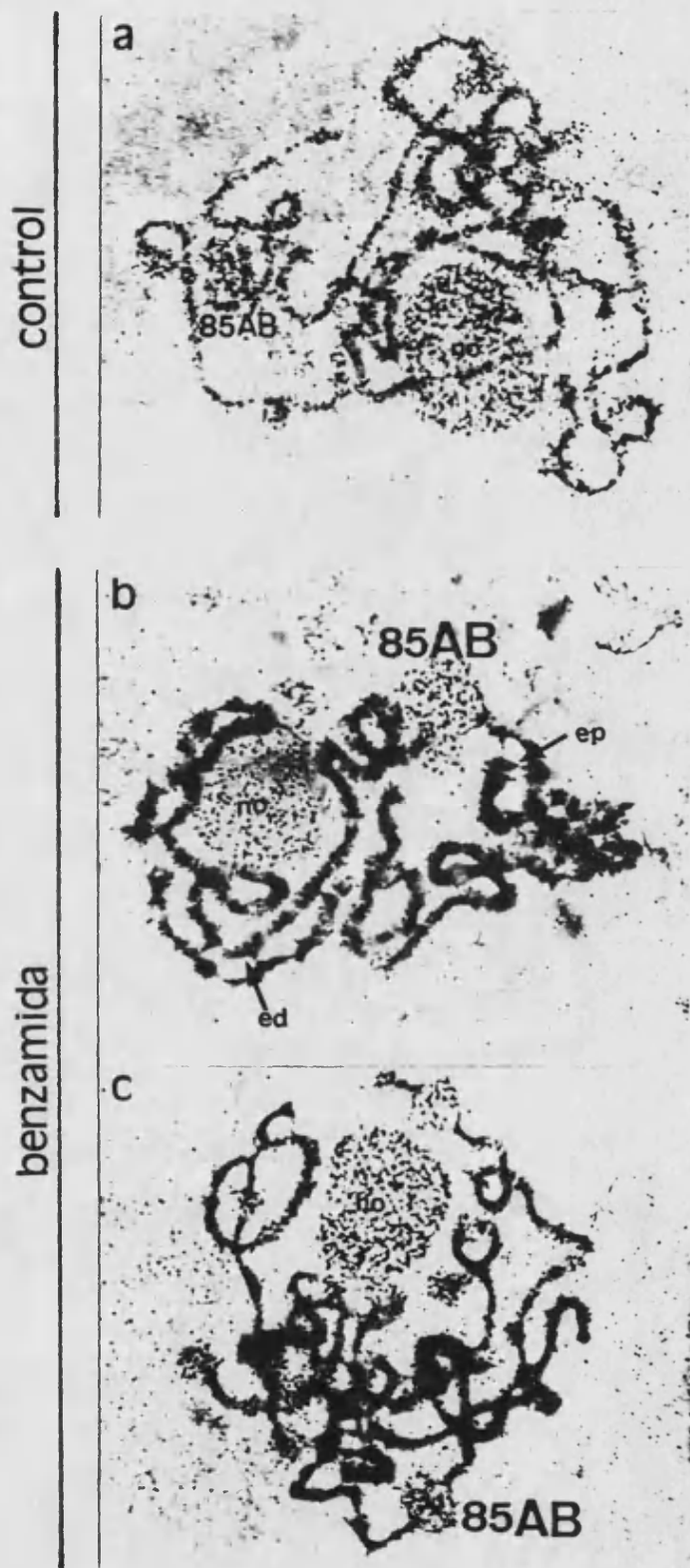


Figura 32.- Autorradiogramas correspondientes a condiciones control (a) y de tratamiento con benzamida (b y c) en *D. madeirensis*. Puede observarse la superactivación del "puff" 85AB por efecto de la benzamida. Este locus se localiza más cerca del extremo proximal (ep) que del extremo distal (ed) del cromosoma O, en esta especie. (no: nucleolo).

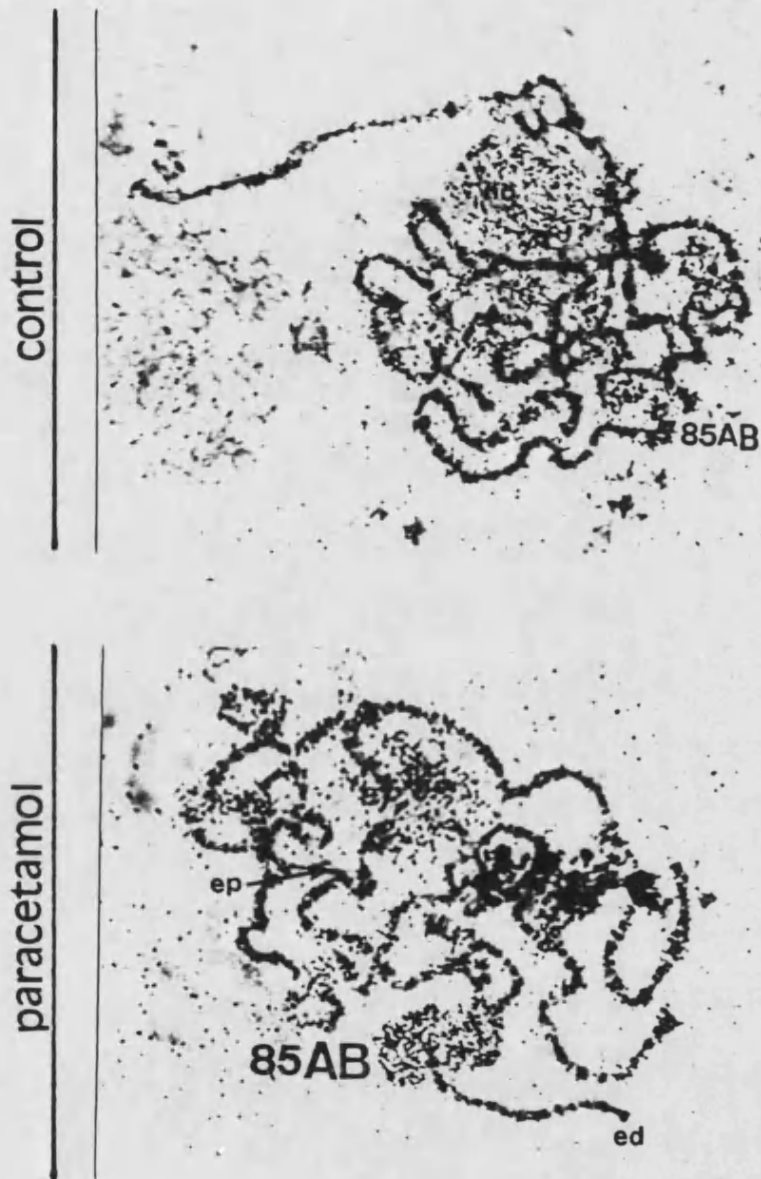


Figura 33.- Autorradiogramas correspondientes a condiciones control y de tratamiento con paracetamol en *D. guanche*. Puede observarse la superactivación del "puff" 85AB por efecto de dicho agente. Este locus se localiza más cerca del extremo distal (ed) que del extremo proximal (ep) del cromosoma O, en esta especie. (no: nucleolo).

Figura 34.- Identificación de secuencias relacionadas con las del locus hsrw de *D. melanogaster*, en las tres especies estudiadas.

(a) Mapa de restricción del clón p5A, portador de la mayor parte de la unidad de transcripción del gen hsrw de *D. melanogaster* (Ryseck et al., 1985). C: *Cla*I y A: *Ava*II. El sitio *Ava*II de la región distal se localiza en el vector de clonación (pUC18), a 1.8kb del punto de inserción de la secuencia. S1, S2 y S3 representan a las sondas utilizadas en las experiencias de hibridación.

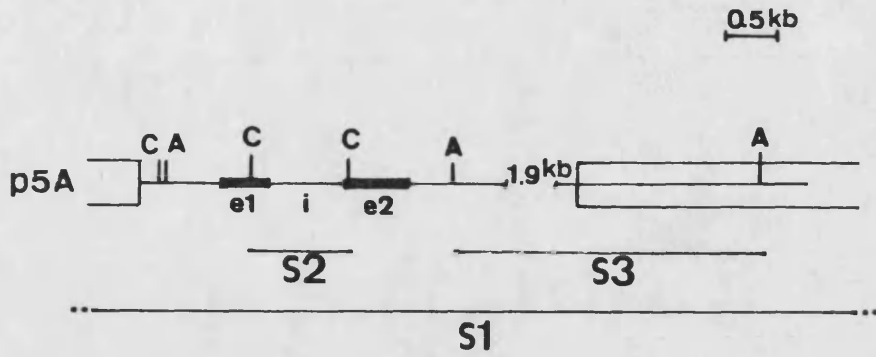
(b) Autorradiogramas obtenidos de las hibridaciones *in situ* en los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* (control) y en una de las especies estudiadas, *D. subobscura*. La sonda empleada fue para este ejemplo la S1.

(c) Resultados obtenidos de las digestiones *Pst*I. La sonda utilizada es la S2.

(d) Resultados obtenidos de las digestiones *Taq*I. La sonda empleada es la S3.

Fig 341

a



b



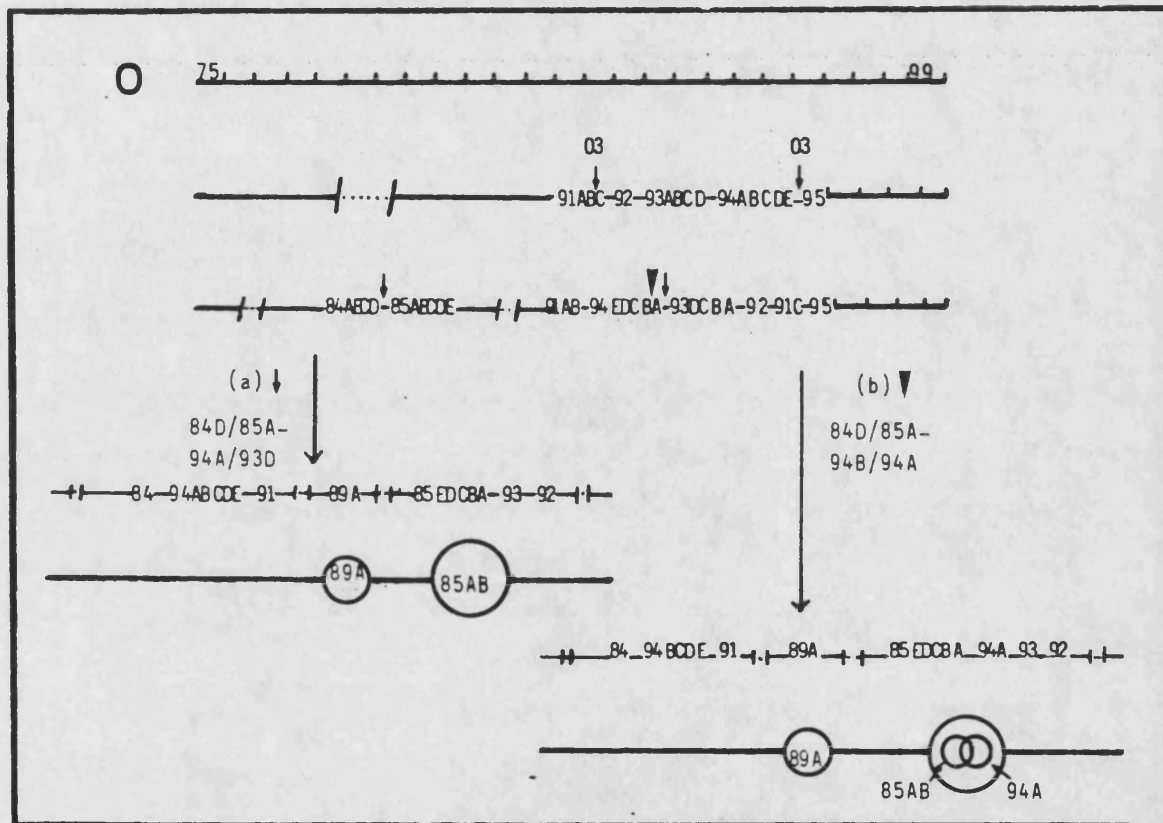


Figura 35.- Ordenación génica del cromosoma O de *D. guanche*.

(a) Secuencia de bandas propuesta por Moltó *et al.* (1987).

(b) Proponemos un pequeño cambio en el límite distal de la inversión específica de *D. guanche*, con un nuevo punto de rotura (94A/B), a raíz de los resultados obtenidos en este trabajo.

DISCUSSION

1. "PUFFS" DESARROLLO.

D. subobscura, *D. guanche* y *D. madeirensis*, son especies filogenéticamente relacionadas, pertenecientes al subgrupo *obscura* del género *Drosophila*. Sus cromosomas politénicos muestran una fuerte similitud estructural en sus patrones de bandas, lo que nos ha facilitado el estudio comparativo entre los modelos temporales de actividad génica, mediante el análisis de "puffs".

De los 186 loci que forman el conjunto de "puffs" observados entre las tres especies, 166 son activos en *D. subobscura*, 146 en *D. guanche* y 145 en *D. madeirensis*. Se han identificado 71 "puffs" no descritos en, al menos, algún miembro de la triada. No obstante, aunque tales "puffs" representan una muestra importante respecto al número de loci, no lo son respecto de la actividad génica total. La mayoría de ellos son ocasionales, es decir, con frecuencias de aparición inferior al 25%, ó muestran frecuencias moderadas-bajas.

Teniendo en cuenta a los "puffs" que forman el patrón característico de cada especie, es decir aquellos con frecuencia de aparición entre el 75% y 100%, observamos que el 31,25% son característicos de las tres especies, el 21,25% lo son de dos y el 47,5% de solamente una especie. Probablemente el número de "puffs" comunes a las tres especies habría sido mayor si hubiéramos elegido aquellos con frecuencias inferiores al 75%. Sin embargo, creemos que un criterio más amplio no hubiera modificado sustancialmente este número, ya que se han analizado 12 estadios de desarrollo, eligiendo aquellos "puffs" con un porcentaje de preparaciones (+) y (+/-) igual o superior al 75% en, al menos, uno de los estadios.

Como norma general, los "puffs" que son característicos de dos especies presentan actividades medias en la tercera especie, mientras que se observa una mayor heterogeneidad en aquellos loci que sólo son característicos de una especie. Esta heterogeneidad se traduce en que pueden presentar una actividad moderada en una de las dos especies restantes, mientras en la otra puede tener un comportamiento ocasional ó incluso no ser activos.

Las variaciones observadas entre *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, son mayores que las encontradas por Ashburner (1969a,b,c) entre las especies gemelas *D. melanogaster* y *D. simulans*. En los trabajos posteriores del grupo de Ashburner, se ha insistido siempre, en la similitud mostrada por los modelos de "puffs" entre especies relacionadas. Posiblemente se deba a que tales autores buscaban la similitud inherente a los distintos

comportamientos. De hecho cuando comparan los patrones de "puffs" entre especies pertenecientes a distintos complejos, *D. melanogaster* y *D. yakuba* (Ashburner y Lemeunier, 1972), concluyen que la secuencia básica de los cambios en la actividad de muchos "puffs", es muy semejante entre las dos especies, a pesar de que este estudio se limita a un sólo cromosoma. Incluso en *D. takahashii*, especie aún más alejada de *D. melanogaster*, Ashburner reconoció las características de los modelos de "puffing" de dicha especie (citado en Ashburner y Berendes, 1978).

En otro extremo se sitúan los trabajos de Scouras y Kastritsis (1984) con *D. melanogaster* y *D. auraria*, ambas pertenecientes a distintos subgrupos del grupo *melanogaster*. Dichos autores sólo pudieron establecer con seguridad algunas homologías entre las regiones activas de uno de los cromosomas.

El estudio comparativo de los patrones de "puffs" en el "cluster" *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, nos ha permitido, además de confirmar las conclusiones de Ashburner respecto de una secuencia básica en la expresión de muchos genes en las especies filogenéticamente relacionadas, estudiar la variabilidad subyacente a dicha similitud en el comportamiento. Si hubiéramos partido de especies más distantes, cuyos cromosomas mostrasen mayor diferenciación, caso de *D. melanogaster* y *D. auraria*, no se hubieran podido abordar, a la vez, ambos hechos.

Las diferencias en las actividades de los "puffs" individuales entre las tres especies han sido, fundamentalmente, de cuatro tipos: cuantitativas, cualitativas, en el tiempo de aparición de los "puffs" y por efecto de las inversiones.

A la hora de interpretar las diferencias en el tiempo de aparición de los "puffs" hay que ser muy cautos, por dos razones principalmente:

- (1) La edad cronológica de los individuos no siempre coincide con la edad de desarrollo de los mismos.
- (2) Las tres especies no muestran un desarrollo prepupal de idéntica duración, por lo que los estadios respectivos no son equivalentes entre sí.

Uno de los problemas más importantes en los estudios comparativos entre distintas especies, e incluso entre cepas de la misma especie, es la sincronización de los cultivos. Con ella se pretende obtener individuos cuyo estado de desarrollo sea lo más homogéneo posible. El problema es tal que, incluso bajo condiciones óptimas de cultivo, puede haber diferencias de unos individuos a otros, siendo la edad cronológica un pobre indicador del estado de desarrollo de los mismos. El diseño experimental realizado trataba,

precisamente, de controlar al máximo esta variabilidad, de forma que todos los estadios, excepto el tercero, están sincronizados, en las tres especies, respecto de un carácter morfológico concreto, la salida de los espiráculos anteriores.

Mientras *D. guanche* y *D. madeirensis* presentan desarrollos prepupales de duración similar, siendo el estadio de prepupa 24h el último analizado, en *D. subobscura*, los patrones de "puffs" se han podido estudiar hasta el estadio de prepupa 20h. Este hecho dificulta, por otro lado, los estudios comparativos entre las especies, ya que los respectivos estadios de desarrollo no son equivalentes entre sí. Los mismos acontecimientos biológicos deben darse en tiempos diferentes, en las distintas especies. Esta es la razón por la cual, en cada especie, hemos agrupado los 12 estadios analizados en 5 intervalos de desarrollo (tercer estadio larvario tardío, inicios de la prepupación, prepupa temprana, prepupa media y prepupa tardía), que intentan representar los acontecimientos más sobresalientes del desarrollo en *Drosophila*.

La expresión, en el tiempo, de cada "puff" se ha estudiado teniendo en cuenta su frecuencia de aparición en tales intervalos, distinguiéndose 8 modelos básicos de formación de "puffs": "Puffs" activos en el tercer estadio larvario tardío; en el inicio de la prepupación; en prepupa temprana; en prepupa media; en prepupa tardía; en el inicio y fin de la prepupación; durante la prepupa y durante todo el desarrollo.

Del conjunto de "puffs" que forman el patrón característico de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, el 40% muestran una expresión temporal idéntica en las tres especies, es decir tienen idénticos modelos de formación. La mayoría de estos loci son característicos de las tres especies. El resto discrepa en su expresión, mostrando verdaderas diferencias en el tiempo de su desarrollo. Krasney *et al.* (1990) explican este tipo de diferencias por la presencia de elementos específicos en los promotores génicos de cada especie.

Las diferencias de tipo cuantitativo incluyen las variaciones observadas en el tamaño y frecuencia de aparición de "puffs" individuales. Ambos hechos están interrelacionados, puesto que dicha frecuencia se ha estimado a partir del grado de desarrollo de los "puffs". En líneas generales, *D. subobscura*, muestra "puffs" de mayor tamaño que *D. guanche* y *D. madeirensis*, de ahí que sea considerada más activa para la mayoría de los loci. No obstante, aquellos "puffs" que forman el patrón característico común a las tres especies, constituyen respecto de los demás, los "puffs" de mayor tamaño y por tanto los más activos en cada una de las especies. Estos datos son confirmados por los resultados de los

autorradiogramas, aunque éstos se han obtenido solamente del tercer estadio larvario tardío y de prepupa 0h.

Ashburner (1969c) había observado que ciertos "puffs" mostraban tamaños máximos característicos para cada especie ó cepa. Este autor consideró que tal variación podía ser explicada por la propia naturaleza de los cromosomas politénicos. Es decir, en las distintas cepas ó especies, intervendrían un número diferente de cromátidas en la formación de un mismo "puff", probablemente debido a diferencias en el control del número de fibras de DNA que son transcritas en un momento dado.

El distinto grado de politenia de los cromosomas puede, también, afectar al tamaño de "puffs" concretos. La mayor politenización y compactación de los cromosomas podría impedir, desde un punto de vista puramente físico, la formación de un "puff". En este sentido si que tenemos constancia de que los cromosomas de *D. guanche* y *D. madeirensis* son más grandes y compactos que los de *D. subobscura*, resultado de un mayor número de ciclos de replicación. Por tanto, en aquellas especies se darían un mayor número de descondensaciones locales suaves, más difíciles de detectar al M.O. Estas conclusiones van en contra de la propia metodología empleada para estimar la expresión génica, sin embargo, habría que confirmar tal hipótesis, por ejemplo mediante estudios autorradiográficos más exhaustivos que los que se presentan en este trabajo. De todas formas, el hecho de que no encontremos tales diferencias en los "puffs" característicos comunes a las tres especies, nos hace pensar en otras posibles causas que expliquen la variabilidad interespecífica en el tamaño de ciertos "puffs". Más adelante volveremos a insistir en este punto desde otra perspectiva.

Las diferencias cualitativas más importantes detectadas entre las tres especies, hacen referencia a aquellos "puffs" no descritos en alguna de ellas. La mayoría de estos "puffs" contribuyen poco a la actividad génica total de la especie en la que se han identificado, puesto que son de tipo ocasional ó con frecuencias bajas. Solamente destacaremos 7 loci que forman parte del patrón característico de alguna especie: 35E, 49A, 97AB, 35C (característicos de *D. subobscura*); 84A, 85E, 88D y 35C (característicos de *D. guanche*).

No conocemos las causas de estas variaciones. Algunos autores (Ashburner 1969b, 1972) han encontrado que las mutaciones del tipo de pequeñas deleciones, no detectables citológicamente, son responsables del diferente comportamiento de ciertos "puffs" en especies gemelas.

Por último, consideraremos el efecto de las inversiones en la expresión de determinados "puffs". En *D. subobscura*, gracias al extraordinario polimorfismo de inversiones en sus cromosomas, se han podido observar cambios significativos en la actividad de ciertos loci, cuya localización en el cromosoma ha sido alterada por una inversión (de Frutos et al., 1987b; Latorre et al., 1988a; Cuenca et al., 1990). Tales efectos se han podido demostrar en los "puffs" 61AC y 67AB en el cromosoma E. Ambos casos se han englobado dentro del fenómeno conocido por efecto de posición, que se define como un cambio en la actividad de un gen que se sitúa cerca de un punto de rotura de una reordenación cromosómica.

Los cambios en las actividades de los "puffs" 61AC y 67AB en *D. subobscura*, parecen depender de la presencia o ausencia de la inversión E_{12} en el cromosoma E. Los dos loci están localizados en los límites de dicha inversión. Ambos son activos en los primeros estadios de desarrollo, pero mientras el 61AC prácticamente desaparece en los estadios posteriores, en las cepas con la inversión E_{12} , el 67AB aumenta considerablemente. Lo contrario ocurre en aquellas cepas no portadoras de dicha inversión.

La cepa de *D. subobscura* que hemos considerado en nuestro estudio comparativo (Ra121) lleva la inversión E_{12} , mientras las de *D. guanche* y *D. madeirensis* carecen de ella y se comportan como las de *D. subobscura* de idéntica constitución. Por tanto, las diferencias encontradas en los "puffs" 61AC y 67AB de *D. guanche* y *D. madeirensis* respecto de *D. subobscura*, se deben al efecto de las inversiones sobre la expresión de genes concretos, más que a diferencias interespecíficas.

Algunas veces las inversiones pueden poner de manifiesto la existencia de dos loci activos dentro la misma región cromosómica. Tal es el caso de los "puffs" 12AC/12D en la región 12 del cromosoma A y de los "puffs" 66AB/66CD en la zona 66 del cromosoma E.

Cuando ambas regiones mantienen la ordenación estándar, se detecta, respectivamente, un sólo "puff" que afecta a toda la zona. Esto puede observarse en las cepas estudiadas de *D. guanche* y *D. madeirensis* para la región 12 y en *D. subobscura* y *D. madeirensis* para la región 66. En la ordenación A_2 (presente en la cepa Ra121 de *D. subobscura*) la región 12 queda separada, como consecuencia de la inversión A_2 , en las regiones 12AC y 12D. Ambas forman "puff", mostrando actividades no coordinadas. En *D. madeirensis*, hemos podido diferenciar, en algunos estadios, entre las actividades de ambos loci, a pesar de que presenta la ordenación estándar. Este hecho confirma el que ambas regiones representan loci activos independientes. Algo similar ocurre cuando la sección 66 queda dividida, en *D. guanche*, en las subsecciones 66AB y 66CD, por efecto de una de las inversiones específicas del cromosoma E de esta especie (puntos de rotura: 59D-66C/D).

La expresión aparentemente coordinada de todos estos loci en aquellos casos donde se mantienen juntos (en ordenación estándar), podría explicarse por un efecto de descondensación pasiva.

En conclusión, la variabilidad detectada entre las tres especies corresponde a diferencias en el tamaño, frecuencia y tiempo de aparición de los "puffs", así como a la presencia/ausencia de ciertas regiones activas. Esta variabilidad podría reflejar diferencias específicas del desarrollo, de la misma forma que se distinguen "puffs" específicos de determinados tejidos en un mismo organismo, de acuerdo con su funcionalidad. En cambio, los "puffs" que constituyen el patrón característico común a las tres especies, con idénticos modelos de expresión, representarían a genes muy conservados, portadores de la información necesaria para los productos "esenciales" en los procesos correspondientes a los momentos específicos del desarrollo. Serían aquellos genes responsables de la secuencia básica, que Ashburner observó en los patrones temporales de "puffs" de las especies relacionadas.

Una vez discutidas las variaciones detectadas entre las tres especies a nivel de "puffs" individuales, nos pareció interesante comparar las actividades globales tomando a la especie como un todo, y también particularizar a nivel de cromosoma. Los índices de actividad media que hemos empleado, constituyen una aproximación cuantitativa a este objetivo.

Los resultados obtenidos de tales índices son muy interesantes. Se observa que las especies endémicas *D. guanche* y *D. madeirensis*, muestran actividades génicas totales muy por debajo de *D. subobscura*. Concretamente esta especie es el doble de activa que las otras dos, las cuales presentan actividades muy similares. La misma situación se observa para la mayoría de los cromosomas, algunos de ellos con diferencias de actividad muy acusadas, como es el cromosoma A de *D. madeirensis* y el O de *D. guanche* y *D. madeirensis*. Los perfiles de actividad génica durante el desarrollo, considerando tanto a cada especie, como a cada uno de los cromosomas, coinciden en la menor actividad de estas especies respecto de *D. subobscura*.

En la bibliografía se citan algunos estudios sobre el descenso de la actividad génica debido a la consanguinidad de los individuos. De Frutos y col. (de Frutos y Latorre, 1982a; de Frutos et al., 1984) observaron en una cepa altamente consanguínea de *D. subobscura* (K228), una depresión general de la actividad de los "puffs". Curiosamente las mayores diferencias se debían a los "puffs" ocasionales y de actividades medias, mientras que no estaban afectados aquellos que forman el patrón característico de la

especie (de Frutos y Latorre 1982b; Pascual et al., 1985 y Latorre et al., 1988a). La mayoría de ellos, también, los hemos observado como característicos de *D. guanche* y *D. madeirensis*, comunes a los de *D. subobscura*.

A estos loci debieron referirse Belyaeva y Zhimulev (1974) cuando indicaron que la consanguinidad no afectó al tamaño de los "puffs" del cromosoma X de *D. melanogaster*, en réplica a las investigaciones de Lychev (1965) sobre el descenso general de la actividad de los "puffs" en líneas consanguíneas de esta especie.

Si consideramos los perfiles de actividad génica de *D. guanche* y *D. madeirensis* durante el desarrollo, observamos ciertas características, también presentes en la cepa K228 de *D. subobscura*. En la mayoría de las especies de *Drosophila* estudiadas, entre ellas *D. subobscura* (para el resto de cepas analizadas), se han identificado dos períodos de máxima actividad durante el desarrollo, controlados por la ecdisona. Tales picos corresponden a los momentos que preceden a la formación de la prepupa y de la pupa, respectivamente. En *D. guanche* sólo apreciamos el primero de ellos, manteniéndose la actividad después, con suaves oscilaciones. Para *D. madeirensis* el patrón es aún más homogéneo, no distinguiéndose ningún cambio brusco en los perfiles de actividad. Tal comportamiento es propio de la cepa consanguínea de *D. subobscura*. Al analizar los cromosomas individualmente, se observa que el cromosoma O es, en los tres casos, el más afectado, presentando mayores diferencias respecto a las otras cepas de *D. subobscura*.

La baja actividad mostrada por *D. guanche* y *D. madeirensis*, podría explicarse si consideramos cierto grado de consanguinidad en las poblaciones de estas especies. A favor de dicha hipótesis hay varios argumentos. Uno de ellos es el efecto de la consanguinidad en los parámetros de eficacia biológica, tales como la fertilidad de las hembras y la mortalidad y viabilidad de los individuos. De Frutos et al (1984), comprobaron la menor fertilidad y viabilidad de la cepa K228 frente a la cepa estándar H271 de *D. subobscura*.

En nuestro caso, no hemos realizado ningún análisis exhaustivo sobre tales parámetros en *D. guanche* y *D. madeirensis*, pero la experiencia adquirida durante su cultivo y manipulación, es suficiente para constatar la menor producción de huevos por las hembras y la mayor mortalidad de los adultos, ambos caracteres más acusados en *D. madeirensis*.

Otro de los efectos importantes de la consanguinidad es aumentar la frecuencia de genotipos homocigotos en las poblaciones. Tales efectos fueron detectados por González et al (1983) en *D. guanche* y *D. madeirensis* para ciertos loci enzimáticos. También se ha observado, en trece cepas distintas de *D. guanche*, una notable homogeneidad en los patrones de restricción del DNA mitocondrial (González et

al., 1990), el cual constituye un buen indicador de la existencia de cuellos de botella en las poblaciones. Para Batchmann et al. (1989) la presencia, sólo en *D. guanche*, de un DNA satélite específico, es consecuencia del aislamiento y consanguinidad a la que está sometida esta especie.

Todos estos argumentos tienen una base común: las dos especies ocupan, en la Naturaleza, nichos ecológicos muy restringidos. Son endémicas de las islas de Tenerife y Gran Canaria del archipiélago canario y Madeira, respectivamente. Están asociadas a los últimos bosques de Lauráceas, que persisten en esta zona geográfica, donde sus poblaciones muestran tamaños no muy grandes, de ahí la dificultad en su captura. En este contexto no es de extrañar una mayor probabilidad de apareamiento entre parientes, que en aquellas poblaciones menos restringidas, donde teóricamente el apareamiento es al azar. Ambas especies han sido consideradas reliquias actuales de formas ancestrales primitivas.

Sin embargo, en contra de que las poblaciones de *D. guanche* y *D. madeirensis* sufren cierto grado de consanguinidad, están los resultados obtenidos por Cabrera et al., (1983), respecto a que ambas especies tienen niveles de variación molecular similares a las de distribución más amplia, como *D. subobscura*. Por su parte, estas conclusiones contradicen los presupuestos generales de Prakash (1977) sobre la fuerte correlación existente entre la frecuencia de loci polimórficos y el área de distribución de la especie.

El demostrar la hipótesis de partida, y en caso de ser cierta, determinar qué grado de consanguinidad presentan las poblaciones de *D. guanche* y *D. madeirensis*, es algo que queda fuera de los objetivos de este trabajo. Si la consanguinidad está, realmente, afectando a estas especies, entonces la variabilidad detectada entre sus patrones de "puffs" y aquellos de *D. subobscura*, podría deberse al aumento en la frecuencia de ciertos genes con efecto negativo sobre el control de la expresión génica, de forma que redujeran la actividad de "puffs" específicos ó incluso determinaran su completa inactivación. Tales "puffs" podrían estar directamente relacionados con los parámetros de eficacia biológica ó con ciertos sistemas enzimáticos. Al menos, se conoce que para la Alcohol deshidrogenasa, *D. guanche* y *D. madeirensis* muestran actividades más bajas que *D. subobscura* (Hernández et al., 1988).

Ya hemos comentado anteriormente que *D. madeirensis* presenta una actividad génica global muy similar, sin grandes cambios a lo largo de todo el desarrollo. Este patrón contrasta fuertemente con lo encontrado en la mayoría de especies de *Drosophila*, en las cuales se detecta un pico de máxima actividad durante el inicio de la prepupación. Las mayores variaciones presentadas por las distintas especies se deben al momento exacto en que se da dicho pico. Para

unas es justo antes de la salida de los espiráculos, al final del tercer estadio (Ashburner, 1969a), en otras es justo antes ó durante la formación de la prepupa (Berendes, 1965), en *D. subobscura* y *D. guanche* se da en prepupa ½h y prepupa 0h, respectivamente. En *D. madeirensis* no hemos detectado un pico de tales características, más bien observamos tres suaves máximos durante la prepupa, muy acusados en el cromosoma U.

Al menos en otra especie de la radiación *Sophophora*, *D. gibberosa*, la mayor expresión de los "puffs" se da durante los estadios de prepupa (Roberts y MacPhail, 1985). Esta actividad está asociada con una gran síntesis proteica durante dicho periodo, probablemente para satisfacer las necesidades de otros tejidos durante la metamorfosis. Por otro lado, la baja actividad mostrada por esta especie en los estadios larvarios se debe a una pobre producción de proteínas salivares, de ahí que *D. gibberosa* pupa en la base de los frascos de cultivo. Tal característica también la hemos observado en *D. madeirensis*, pudiendo, a priori, correlacionar este comportamiento con una menor síntesis de proteínas glue, que explicaría la baja actividad en el tercer estadio larvario en esta especie.

Solamente el cromosoma A (cromosoma sexual) de *D. madeirensis* muestra su mayor grado de expresión en tercer estadio larvario, característica que comparte con *D. subobscura* y *D. guanche*. Ashburner (1969a) analiza los modelos de formación de "puffs" en el cromosoma X de *D. melanogaster*, encontrando un pico de actividad momentos antes de la formación de la prepupa, cuando se ha dado un incremento en el título de ecdisona. Si las especies del grupo *obscura* se comportan como *D. melanogaster* en su respuesta a la hormona, algunos de los "puffs" tempranos inducidos por la ecdisona tienen muchas posibilidades de encontrarse en el cromosoma A. Sería muy interesante estudiar los "puffs" tempranos de *D. madeirensis* para comprender el distinto comportamiento mostrado por esta especie en los inicios de la prepupación.

El análisis de las actividades de los "puff" entre especies relacionadas nos permite, por otra parte, cuantificar, mediante el cálculo de coeficientes de distancia, el grado de parentesco o de diferenciación entre las especies. Los índices de distancia biológica han sido ampliamente utilizados con tal fin por la Genética de Poblaciones y Evolutiva.

Para el caso de los "puffs" podemos hablar de caracteres cualitativos con dos estados discretos alternativos: la frecuencia relativa de aparición de un "puff" individual y su frecuencia relativa de ausencia. Puede considerarse análogo al caso de un gen con dos alelos, donde la presencia de un alelo equivale a la presencia del

"puff" y la ausencia de ese alelo (presencia del alelo alternativo) a la ausencia de dicho "puff".

Los resultados obtenidos de los distintos índices de distancia aplicados y muy especialmente los de la D_k^2 (coeficiente que puede ser contrastado estadísticamente), coinciden respecto al siguiente orden filogenético: *D. guanche*(G)-*D. madeirensis*(M) < *D. subobscura*(S)-*D. madeirensis* < *D. subobscura*-*D. guanche*. Esta relación se cumple, tanto al considerar la especie como un todo, como para cada uno de los cromosomas, a excepción del A, y es el resultado esperado de acuerdo con los índices de actividad media calculados previamente.

En todos los casos las diferencias entre G y M han sido significativas sólo cuando se han considerado los "puffs" seleccionados, es decir, aquellos con una frecuencia media de aparición igual o mayor al 5% en, al menos, una especie. Ello es debido a la actividad más baja de ambas especies respecto de S. Al eliminar el ruido de fondo provocado por los loci de muy baja frecuencia, las diferencias en actividad entre G y M se hacen significativas, correspondiendo a las diferencias cuantitativas existentes entre los "puffs" de actividades medias y elevadas.

Los cromosomas que contribuyen menos a la distancia entre las tres especies son el J y el A, por tener un menor número de loci activos. Para este último cromosoma, las especies más próximas son S y G, a pesar de la gran diferenciación estructural de dicho cromosoma en ambos casos. La muy baja actividad del cromosoma A de M explica estos resultados.

Los estudios filogenéticos de los años 80 incluyen ya a *D. guanche* y *D. madeirensis* y se basaron fundamentalmente en el polimorfismo alélico para cierto número de enzimas y proteínas detectadas electroforéticamente. Los dendrogramas, así obtenidos, están de acuerdo con la estrecha relación de G y M con S, formando las tres un grupo bien diferenciado del resto de las especies Paleárticas del subgrupo *obscura*. Sin embargo, a pesar de que tales dendrogramas utilizan el mismo tipo de datos, el mismo coeficiente de distancia (coeficiente estándar de Nei) y parten de los mismos presupuestos sobre cómo se dieron los cambios evolutivos (constantes/variables), difieren en cual es el par de especies de la triada más próximas filogenéticamente.

En un primer estudio, Cabrera *et al.* (1983) encontraron el mismo orden filogenético que se ha obtenido en este trabajo, pero la distancia genética entre G y M era sólo ligeramente inferior a la que S presenta con cada una de ellas. Para la distancia de Nei, así como para la D_k^2 , hemos obtenido que la distancia G-M es aproximadamente la mitad de las S-G y S-M.

En contra de estos resultados, Loukas *et al.* (1984) y Larruga y Pinsker (1984), sugirieron la existencia de una estrecha relación entre S y M, mostrando ambas mayores

distancias, de magnitud similar, con G. Recientemente, Cariou et al. (1988), utilizando distintos coeficientes de distancia así como distintos algoritmos para dibujar los árboles filogenéticos, han encontrado, que en todos los casos, G y M constituyen el par de especies más próximas. Tales trabajos difieren, sin embargo de los de Cabrera et al (1983), así como de los nuestros, en que la distancia S-G es menor que la S-M. Estos autores han sugerido que las discrepancias entre los distintos trabajos sobre polimorfismo aloenzimático, pueden ser debidas al uso de diferentes loci enzimáticos, a la utilización de técnicas electroforéticas con distintos grados de discriminación, o incluso, a una posible ambigüedad inherente a la divergencia relativa entre las tres especies.

El resto de los estudios llevados a cabo, desde otras perspectivas, para el esclarecimiento de las contradicciones presentadas por los trabajos bioquímicos, coinciden unánimemente en que S y M son las especies menos diferenciadas. Así lo constatan Krimbas y Loukas (1984) y Felger y Pinsker (1987) al analizar las ordenaciones génicas de los cromosomas politénicos de las tres especies. Los mismos resultados obtuvieron Loukas et al. (1986) cuando comparan los patrones de hibridación obtenidos a partir de los DNAs genómicos de cada especie, hibridados con las sondas portadoras de los genes HSP82, corion-S16, alcohol deshidrogenasa y xantin-deshidrogenasa. S y M muestran, también, mayores similitudes respecto a los patrones de restricción del DNA mitocondrial, que G y M y éstas que S y G (González et al., 1990).

Al menos los resultados de las experiencias sobre obtención de híbridos en los cruzamientos entre las tres especies, están de acuerdo con todos los trabajos aquí discutidos, en que M presenta una posición central, compartiendo, por un lado, características con S y por otro con G.

El avance experimentado actualmente por las técnicas moleculares en los estudios a nivel de DNA, podrá resolver la ambigüedad existente entre las relaciones filogenéticas de las especies relacionadas. Los primeros trabajos en este campo (Loukas et al., 1986; González et al., 1990) apuntan a que *D. subobscura* y *D. madeirensis* comparten un mayor número de características entre si, que cada una de ellas con *D. guanche*. Probablemente, los resultados obtenidos en este trabajo, respecto a que las especies insulares son las más cercanas dentro de la triada *D. subobscura*-*D. guanche*-*D. madeirensis*, estén indicándonos semejanzas, más bien, de tipo ecológico que de tipo genómico. Ambas especies muestran actividades muy por debajo de *D. subobscura*, debido, quizás, a la propia dinámica de sus poblaciones. De hecho, la distancia que hemos obtenido para el par G-M es del orden de las que presentan entre sí, las cepas de *D. subobscura* de

Ribarroja y Palma de Mallorca, para las cuales, Latorre et al. (1988a), observaron un fuerte efecto geográfico.

2. "PUFFS" Y GENES DE CHOQUE TERMICO.

Clásicamente se conoce que la respuesta al choque térmico, en *Drosophila*, se caracteriza por la inducción de un número reducido de "puffs" en sus cromosomas politénicos, que no son activos antes de aplicar los tratamientos térmicos, y la regresión de la mayoría de los "puffs" desarrollo que son activos en el momento de iniciar tales tratamientos. Además, los mismos loci se activan en las distintas cepas de una especie ó en las especies filogenéticamente relacionadas. El grupo de Ashburner (Ashburner, 1970, 1972; Ashburner y Lemeunier, 1972) comprobó la invariabilidad en la respuesta al choque térmico en las cepas Oregón R, vg6 y l(2)gl de *D.melanogaster* y su especie gemela *D. simulans*, así como en otras especies filogenéticamente relacionadas con *D. melanogaster*. Berendes (1965) observó dicha invariabilidad al estudiar siete especies del grupo *repleta*, *D. hydei*, *D. neohydei*, *D. eohydei*, *D. nigrohydei*, *D. bifurca*, *D. repleta* y *D. mercatorum*. Según Pascual et al. (1987), ni la distinta procedencia geográfica, ni las distintas ordenaciones cromosómicas en varias cepas de *D. subobscura*, afectan a la respuesta frente al estrés térmico. En todas ellas observaron la inducción de los mismos "puffs", incluso en la cepa de laboratorio K228, altamente consanguínea, caracterizada por su baja actividad génica durante el desarrollo.

Los resultados obtenidos en *D. subobscura* (cepa H271), *D. guanche* (cepa TF2) y *D. madeirensis* (cepa Md1), están de acuerdo con este patrón general. Los tratamientos térmicos a 31°, 34° y 37°C, durante 30 minutos, sobre individuos cultivados a 19°C, provocan, en las tres especies, un fuerte descenso de la actividad génica, consecuencia de la regresión de la mayoría de los "puffs" desarrollo característicos del estadio analizado, y la inducción de los mismos "puffs", como era de esperar en especies tan relacionadas filogenéticamente. Estos "puffs" son los siguientes y los hemos nombrado como "puffs"-temperatura: 2C, 15DE, 16B (cromosoma A), 18C, 27A, 31C/D (cromosoma J), 85AB, 89A y 94A (cromosoma O).

En las tres especies no solamente se expresan tras los tratamientos térmicos, los mismos loci sino que además, la actividad media correspondiente a tales "puffs" es de la misma magnitud en los tres casos, a pesar de que *D. guanche* y *D. madeirensis* son especies mucho menos activas que *D. subobscura*. Esta situación fue observada por Pascual et al. (1987) al comparar la respuesta en la cepa K228 con el resto

de cepas de *D. subobscura*. Si la consanguinidad está afectando de alguna manera a *D. guanche* y *D. madeirensis*, al menos los genes de choque térmico escapan a su acción y pueden expresarse en niveles suficientes para asegurar la supervivencia de los individuos en las condiciones de estrés.

Mediante la aplicación de técnicas autorradiográficas, hemos monitorizado la actividad transcripcional de los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* durante los tratamientos térmicos. Los resultados obtenidos han confirmado la fuerte inhibición general sufrida por los "puffs" desarrollo, sin embargo, se ha delimitado con mayor precisión el conjunto de "puffs" que hemos considerado, en un principio, como los "puffs" temperatura. Aunque generalmente se admite una estrecha correlación entre la formación de un "puff" y la síntesis de RNAm en dicho loci, no siempre se cumple este presupuesto y hay que ser muy cautos a la hora de las interpretaciones.

Entre los 9 "puffs" que experimentan un fuerte incremento en su frecuencia de aparición tras los tratamientos térmicos, respecto de los controles, el 2C, 15DE, 16B y 31C/D no mostraron señal autorradiográfica en las condiciones inducidas. El locus 16B es el único de todos que presenta, además, una frecuencia moderada en el estadio de desarrollo en el que se aplicaron los tratamientos, de ahí que detectemos RNAm en tales casos. La aparente contradicción que plantea este locus puede salvarse si suponemos que no alberga ningún gen de choque térmico. Realmente se trataría de un "puff" de desarrollo cuya presencia en condiciones inducidas se debe a la incapacidad de regresar por verse afectada la síntesis proteica durante el estrés. Se sabe que la regresión de los "puffs" requiere de síntesis previa de proteínas. De esta manera se explican las observaciones de Pascual et al., (1987), de que el "puff" 16B es inducido por los tratamientos térmicos, en distintas cepas de *D. subobscura*, únicamente en aquellos estadios del desarrollo en que también es activo en condiciones normales. El aumento que hemos observado en su frecuencia, en la cepa H271, al aumentar la temperatura de tratamiento, es difícil de explicar, aunque podría atribuirse a una falta de sincronización de los individuos. Bastarían variaciones de unos pocos minutos para detectar cambios importantes en su frecuencia, al tratarse de una región de actividad creciente en el inicio de la prepupación y en pupa temprana.

Desde esta nueva perspectiva puede entenderse la presencia de ciertos "puffs" desarrollo tras los tratamientos térmicos. Todos estos "puffs" se caracterizan por ser muy activos en el momento en que aplicamos los tratamientos. Su presencia, en las condiciones inducidas, no indica que también lo sean en tales casos, por lo menos cuando el estrés es más efectivo. En algunos

autorradiogramas se detectan marcas en los "puffs" desarrollo, pero la respuesta es menos limpia en estos casos.

En conclusión, hay que tener en cuenta en que situación experimental nos encontremos, para interpretar correctamente el significado de la presencia de un "puff".

Los "puffs" 2C, 15DE y 31C/D constituyen un caso distinto del anterior. Estos loci no muestran tampoco señales autorradiográficas tras los tratamientos térmicos, pero su frecuencia de aparición es muy alta respecto de los controles, donde prácticamente no aparecen. Probablemente el método autorradiográfico sea poco sensible para detectar niveles bajos de RNAm. De hecho en *D. madeirensis*, hemos observado marca en el locus 2C, aunque mucho más débil que la que presentan el resto de los "puffs" de choque térmico. También se han localizado híbridos RNA:DNA en los "puffs" 2C y 31C/D, en *D. subobscura* (Arbona y de Frutos, 1991), por lo que no descartamos que sean verdaderos "puffs" temperatura.

En todos los autorradiogramas limpios de ruido de fondo, los marcajes fuertes se obtuvieron, siempre, en los loci 18C, 27A, y en el anillo de Balbiani (cromosoma J) y en los loci 85AB, 89A y 94A (cromosoma O). En sentido estricto, no podemos considerar, tanto al "puff" 85AB como al anillo de Balbiani, regiones inducidas selectivamente por la temperatura. Ambos son también activos en condiciones normales. Es de destacar, por otra parte, la baja inducibilidad, que observó Pascual (1986), en el "puff" 85AB de *D. subobscura*, en los tratamientos efectuados en sistemas *in vitro*. Sin embargo, los loci 18C, 27A, 89A y 94A son los únicos que muestran fuertes marcajes autorradiográficos, solamente, en las condiciones inducidas, en las tres especies que estudiamos. Son los "puffs", según Pascual et al., (1987) más conservativos entre las distintas cepas de *D. subobscura*, no dependiendo tampoco del momento del desarrollo en el cual se aplicaron los tratamientos, ni de las condiciones experimentales empleadas (*in vivo/in vitro*). Son los "puffs" que codifican para las proteínas de choque térmico mayoritarias, tanto en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, como hemos demostrado con las experiencias de hibridación *in situ*.

Con la misma rapidez que se ha observado la inducción preferencial de un número reducido de "puffs", tras los tratamientos térmicos, hemos detectado fuertes variaciones en los patrones de proteínas, en las tres especies analizadas. Se observa una disminución general de la síntesis de las proteínas de desarrollo y la inducción extraordinaria de seis proteínas nuevas. Teniendo en cuenta su movilidad electroforética con respecto a las hsp's de *D. melanogaster*, así como el error cometido en el cálculo de

sus pesos moleculares, hemos denominado a estas proteínas como hsp82, hsp70, hsp69, hsp41, hsp32 y hsp25.

Las proteínas de choque de peso molecular alto, como la hsp82 y la hsp70, son las más conservadas dentro del género *Drosophila*. Concretamente la hsp70 es, en todos los casos, el producto más abundante del estrés térmico. Mientras en *D. melanogaster* se ha identificado, además, una proteína de 68kd, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, en vez de tal representante, hemos podido determinar una proteína que migra muy próxima a la hsp70, denominada hsp69, de acuerdo con su peso molecular aparente.

Respecto de las hsps de PM bajo, se observa una mayor heterogeneidad entre las distintas especies, referente al tamaño y número de proteínas observadas en cada caso. En *D. melanogaster* y especies relacionadas se conocen cuatro proteínas de esta familia (Lewis et al., 1975), entre cuatro y seis en las especies del grupo *virilis* (Sinibaldi y Storti, 1982), dos en *D. pseudoobscura* (Blackman y Meselson, 1986) y también hemos identificado dos en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*. En estas tres especies hemos detectado, incluso, ciertas variaciones en el tamaño de tales proteínas. Al ser de poca magnitud, nos hemos referido a ellas como hsp32 y hsp25 en los tres casos. Variaciones de este tipo también fueron observadas por Lewis et al. (1975) entre las proteínas de bajo peso molecular de las especies gemelas *D. melanogaster* y *D. simulans*.

La menor conservación de las proteínas de esta familia dentro del género *Drosophila*, se refleja, también, en los resultados obtenidos de las experiencias de hibridación a las que nos referiremos seguidamente.

Finalmente, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, hemos detectado la presencia de una proteína de tamaño medio, denominada hsp41. Aunque una proteína de peso molecular equivalente no sea citada en *D. melanogaster*, fue, sin embargo, observada por Tissières et al. (1974) y, posteriormente, considerada como hsp34 por Tanguay (1985). En todas las especies del grupo *virilis*, se hace referencia, igualmente, a una proteína de PM intermedio, hsp38 (Sinibaldi y Storti, 1982).

Muchas proteínas de desarrollo, con pesos moleculares medios, como la actina, son también inducidas por el choque térmico, de ahí que puedan ser confundidas con hsps. Sin embargo, en mamíferos y aves se han identificado proteínas con tamaños dentro de este rango, que aunque son expresadas constitutivamente, tienen un papel muy importante durante el estrés térmico (Ohtsuka et al., 1990).

Clásicamente se han agrupado, en *Drosophila*, a las proteínas y/o genes de choque térmico en tres familias principales, HSP82, HSP70 Y HSPs que codifican para las proteínas de bajo peso molecular. Esta clasificación se realiza de acuerdo con la homología estructural de los miembros integrantes de cada familia.

Dada la naturaleza conservativa de estas familias hemos utilizado, como sondas, los HSPs de *D. melanogaster* con el objetivo de localizar tales genes en las especies del grupo *obscura*. De los resultados obtenidos de las experiencias de hibridación *in situ*, hemos deducido que el "puff" 18C, del cromosoma J, codifica para la proteína hsp82 identificada en los geles de poliacrilamida en estas especies; los loci 89A y 94A, del cromosoma O, contienen a los genes de la familia HSP70, responsables de la síntesis de las proteínas de 70 y 69kd., y en el "puff" 27A, del cromosoma J, se reúnen los HSPs que codifican para las proteínas de pequeño tamaño, es decir las hsp32 y hsp25.

Se observa, pues, que de los siete "puffs" inducidos estrictamente por la temperatura, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, cuatro de ellos contienen a los genes responsables de la síntesis de las hsp's mayoritarias. Se trata de aquellos "puffs" que mostraban fuertes marcajes autorradiográficos únicamente en las condiciones inducidas.

Al caracterizar molecularmente cada una de estas familias, en las tres especies, hemos observado el patrón general de diversificación que los HSPs presentan en otras especies de *Drosophila*. Es decir, mientras la familia HSP82 está formada por un gen de copia única, las familias HSP70 y HSPs de pequeño tamaño constituyen complejos génicos. Al menos hemos identificado cuatro copias y dos genes distintos, respectivamente.

Sin embargo, por la naturaleza de los datos obtenidos en este estudio, no hemos podido determinar con exactitud sus estructuras, como mucho inferir su posible organización en base al conocimiento disponible, sobre esta familia multigénica, en otras especies de *Drosophila*.

Dada la gran conservación del gen HSP82 en especies evolutivamente alejadas (Blackman y Melselson, 1986) suponemos que en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, muestra, también, una estructura similar. En aquellas especies, la unidad de transcripción del gen consta de dos exones de tamaño diferente, de 136 a 150 pb (exón I) y de 2.6 a 2.8kb (exón II) y un intrón central de 0.9 a 1.1kb, conteniendo el exón II la región codificadora. Partiendo de este presupuesto es de destacar la gran conservación, también en las especies aquí analizadas, de los sitios de reconocimiento para los enzimas *SalI* y *XbaI*, aproximadamente a la mitad del exón II y en el intrón, respectivamente. A pesar de la divergencia que observaron Blackman y Melselson (1986) entre los intrones del gen HSP82 en distintas especies, estos mantienen dos regiones homólogas, una de las cuales contiene varias dianas de reconocimiento para el

enzima *Xba*I. El significado de tales secuencias es todavía desconocido. En *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, es posible también la presencia de varios sitios *Xba*I en esta zona, como se deduce de los "Southern blots".

Para los sitios de restricción que hemos detectado a lo largo del gen HSP82 en estas especies, hay al menos ocho cambios respecto de *D. melanogaster*. Dos de ellos suponen ganancia de nuevas dianas *Sal*I y *Hae*II y el resto representan pérdidas en sitios de reconocimiento para las enzimas *Hae*II, *Pst*I y *Pvu*II. Aquellos cambios que afectan a la secuencia codificadora (exón II), seguramente se deberán a sustituciones nucleótídicas silenciosas ó sinónimas, es decir cambios que afectan a la tercera base del codón, de forma que puede cambiar la diana enzimática, pero no el aminoácido correspondiente. De hecho se calcula una homología del 90% a nivel de DNA y del 97-99%, a nivel de proteína, entre las secuencias codificadoras de los HSP82 de distintas especies de *Drosophila* (Blackman y Melsen, 1986). Las mayores diferencias se localizarían en el intrón y en el exón I, no traducido, es decir en aquellas regiones que escapan a la acción de la selección.

La familia HSP70 constituye un sistema génico de mayor complejidad que el anterior, formada por un conjunto de genes muy relacionados entre sí. Su organización ha sido estudiada con detalle sólo en *D. melanogaster*, donde se han distinguido principalmente los genes HSP70 y HSP68. El primero de ellos aparece en copias múltiples en los loci 87A y 87C, mientras el gen HSP68 se localiza como copia única en el locus 95D.

En *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, esta familia también se caracteriza por ser un complejo génico, pero a diferencia de *D. melanogaster*, sus representantes han divergido menos. De acuerdo con los patrones de proteínas de choque, hemos podido distinguir, para las especies del grupo *obscura*, entre los genes HSP70 y HSP69, responsables de la síntesis de las proteínas de choque de 70 y 69kd, respectivamente. Ambos genes muestran mayores homologías entre ellos que los HSP70 y HSP68 de *D. melanogaster*. Su localización en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, es en los "puffs" 89A y 94A, siendo el primero equivalente al locus 95D de *D. melanogaster* y el 94A a los loci 87A/C de esta especie. A priori, podemos pensar que el gen HSP69 se localizaría en el "puff" 89A y el gen HSP70 en el 94A. No obstante, no disponemos de evidencias experimentales que confirmen estos hechos. Una forma de abordarlo sería obteniendo la información de cada "puff" separadamente, bien mediante la construcción de mapas de deficiencias en cualquiera de las especies del grupo *obscura*, bien mediante la microclonación de las bandas cromosómicas implicadas en cada "puff", u obteniendo clones específicos por el método del "transposon-tagging".

La primera dificultad que se nos presenta al caracterizar molecularmente los genes de esta familia en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, es la imposibilidad de discriminar entre sus secuencias, debido a su gran homología. De ahí que sea más correcto hablar genéricamente de miembros de la familia HSP70, sin hacer distinción entre sus posibles componentes. De todas formas, las diferencias entre dichos representantes no deben ser muy acusadas, pudiéndose considerar, desde la perspectiva de este trabajo, la presencia de un solo tipo de gen. Partiendo de esta premisa, hemos podido identificar, al menos, cuatro copias de este gen, para cada una de las tres especies. La mayoría de ellas conservan un fragmento *XhoI* de 2kb incluido dentro de otro *XbaI-SalI*, algo mayor (2.2kb), donde no se detectan dianas internas para los enzimas *BamHI*, *EcoRI* y *SalI*. Esta estructura puede representar, en las especies del grupo *obscura*, el elemento z (la mayoría de la región codificadora) característico del gen HSP70.

Tanto *D. melanogaster* como sus especies gemelas *D. simulans* y *D. mauritiana*, conservan en todas las copias del gen HSP70, los sitios *XbaI* y *SalI* en los extremos 5' y 3' del elemento z, respectivamente (Brown y Ish-Horowicz, 1981). Proponemos, pues, que probablemente el fragmento *XbaI-SalI* represente la estructura ancestral de dicho gen.

Las diferencias encontradas, entre las distintas especies, respecto a la presencia o ausencia de determinados puntos de restricción dentro del elemento z, se explicarían por sustituciones nucleotídicas silenciosas (la hsp70 es la proteína de choque más conservada de la Naturaleza). La ocurrencia de este tipo de cambios dentro de una copia concreta, puede extenderse a otras copias del mismo locus por un mecanismo de conversión intra-locus y a otras copias de otro locus por mecanismos inter-loci, postulados por Brown y Ish-Horowicz (1981). Ambos mecanismos actúan como sistemas correctores para mantener la homología entre las diferentes copias del gen HSP70, en cada especie, siendo, hoy por hoy, *D. melanogaster* la mejor conocida.

Se ha propuesto que la organización ancestral del gen HSP70 presenta dos copias adyacentes con polaridad opuesta (Brown y Ish-Horowicz, 1981). Esta disposición se ha observado en el locus 87A de *D. melanogaster* y en los loci 87A, 87C de varias especies del grupo *melanogaster*. De las digestiones *SacI* puede deducirse fácilmente tal organización, puesto que el enzima corta específicamente, en todas estas especies, en el extremo 3' del gen. Si tal especificidad se mantiene en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, los resultados obtenidos de estas digestiones, nos indican que la organización propuesta para el gen HSP70, aparecería después de la separación de los grupos *melanogaster* y *obscura*, afectando únicamente al primero de ellos. En principio, *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, no parecen mostrar dicha organización.

Respecto de la organización cromosómica de los genes de la familia HSP70, la información de que disponemos en *Drosophila* es, además de poco abundante, un tanto confusa. Mientras para Pierce y Lucchesi (1980), el locus HSP70 está duplicado en *D. pseudoobscura* al igual que en *D. melanogaster*, Peters et al (1980) considera que en *D. hydei* el locus 2-32A es equivalente a los loci 87A/87C (HSP70) de *D. melanogaster* y el locus 2-36A es similar al 95D (HSP68) de dicha especie. La organización mostrada por *D. hydei* es equivalente a la que hemos obtenido en este trabajo para *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*.

La contradicción surge al considerar la filogenia de estas especies (figura 36). *D. pseudoobscura* pertenece al grupo *obscura* del subgénero *Sophophora* al igual que *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, en cambio *D. hydei* es una especie del grupo *repleta* del subgénero *Drosophila*. De acuerdo con Throckmorton (1985), la radiación *Sophophora* originó tres linajes principales, *willistoni-saltans*, *obscura* y *melanogaster*. Posteriormente se dio la radiación *Drosophila* de la que surge el grupo *virilis-repleta*. Considerando tales hechos, la duplicación que dió paso al origen de los HSP70 y HSP68 como genes independientes, a partir de un ancestro común, tuvo que ocurrir antes ó durante la radiación *Sophophora*. Por el contrario la duplicación del locus HSP70 fue posterior, después de la separación de los grupos *obscura* y *melanogaster*.

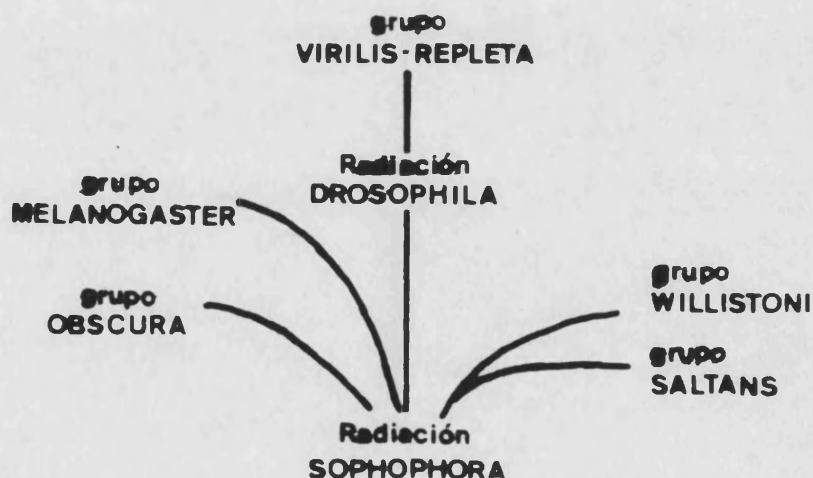


Figura 36.- Principales radiaciones en *Drosophila*.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que el locus HSP70 no está duplicado en las especies del grupo *obscura*. Probablemente en *D. pseudoobscura*, ocurra lo mismo que en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, donde los genes de esta familia han divergido menos, mostrando hibridación cruzada con los HSP70 y HSP68 de *D. melanogaster*.

La mayor complejidad del locus HSP70 en *D. melanogaster*, respecto a las especies del grupo *obscura*, se pone de manifiesto, además de su mayor diversificación al estar duplicado, por la presencia en el locus 87C de secuencias repetidas $\alpha\beta$ entre las copias del gen HSP70 (Ish-Horowicz y Pinchin, 1980). Tales secuencias se hallan bajo el control de los promotores de choque térmico y transcriben para un RNAm poliadenilado, cuya función se desconoce. No hemos detectado en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, secuencias relacionadas con las $\alpha\beta$ de *D. melanogaster*. El hecho de que se hayan detectado elementos α y elementos β en la heterocromatina centrómerica de *D. simulans*, nos indica que tales secuencias son propias de las especies del grupo *melanogaster*.

Los resultados obtenidos, en las tres especies estudiadas, respecto a la familia formada por los HSPs que codifican para las proteínas de pequeño tamaño, están de acuerdo con la tesis de que esta familia es la más heterogénea y menos conservada del estrés térmico. Frente a las cuatro proteínas de *D. melanogaster* (hsp28-26, hsp23-22), en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* hemos detectado sólo dos (hsp32 y hsp25) de tamaños diferentes a las de aquella especie. Frente a los cuatro genes de *D. melanogaster* (HSP28, HSP26, HSP23, HSP22), las especies del grupo *obscura* tienen, al menos, dos (HSP32, HSP25), cuyas homólogas con los anteriores son menores respecto a las que muestran, entre *D. melanogaster* y las especies del grupo *obscura*, los HSPs de las otras familias génicas.

De los dos genes identificados en estas especies, uno de ellos parece tener mayores semejanzas con los HSP28 y HSP23 que con los HSP26 y HSP22 de *D. melanogaster*. Para el otro gen la relación de similitud es la contraria. Asumiendo que los HSPs de esta familia han derivado de un único gen ancestral, tuvo que darse una duplicación de dicho gen antes de la radiación *Sophophora*, de la cual han derivado los grupos *melanogaster* y *obscura*. Las formas primitivas de esta radiación dispondrían de dos genes, A y B, de esta familia, de los cuales derivarían los HSP32 y HSP25 en las especies del grupo *obscura*. Posteriormente y previa a la diversificación de las especies del linaje *melanogaster*, se produciría una nueva duplicación. Podemos suponer que del gen A derivaran los HSPs 28 y 23 y del gen B los HSPs 26 y 22 de *D. melanogaster*, de acuerdo con su organización en el genoma de esta especie. De esta forma podría explicarse la

relación de similitud que hemos observado entre los HSPs de las especies del grupo *obscura* y los HSPs28,23/HSPs26,22 de *D. melanogaster*.

Frente a la gran conservación mostrada, entre las distintas especies, por los HSPs que codifican para las proteínas de choque mayoritarias, hay un gen de choque térmico que contrasta por su rápida evolución. Se trata del locus *hsrw* de *Drosophila*, un locus cuyo producto parece actuar primariamente como RNA (Bendena et al. 1989).

A pesar de la divergencia nucleotídica observada para este gen, mantiene, en todas las especies, una estructura típica con una región única seguida de una larga secuencia de unidades repetitivas agrupadas. Las mayores homologías se localizan en una corta región del intrón en la secuencia única, implicada en el procesado del RNA, mientras las unidades repetitivas difieren en tamaño y secuencia entre las especies (Pardue et al., 1990).

Los resultados obtenidos en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, se explican fácilmente al tener en cuenta las características tan particulares de este gen. De todas las experiencias de hibridación realizadas, sólo hemos obtenido señales en los "Southern blots" y cuando la sonda empleada correspondía a la región del intrón del gen de *D. melanogaster*. La débil intensidad de los híbridos obtenidos nos indicaba la muy baja similitud entre las tres especies del grupo *obscura* y *D. melanogaster*.

La mayor conservación del intrón está relacionada, según Garbe et al. (1989) con la regulación del procesado de los RNAs, más bien que ser un requisito necesario para el procesado durante el choque térmico. La baja conservación mostrada por el intrón del gen HSP82 en distintas especies, descarta la segunda hipótesis. Se ha visto, en algunos casos, que los cambios en el procesado del RNA modulan la expresión de los genes. Para Bendena et al. (1989), cambios en el procesado del locus *hsrw* explicaría la presencia de los tres RNAs característicos de dicho locus.

Las hibridaciones *in situ* fueron negativas para todas las sondas empleadas (el clon entero, intrón, región repetitiva), dada la complementariedad que se requiere, en tales condiciones, para la hibridación cruzada entre las secuencias nucleotídicas.

No es de extrañar que todas las experiencias llevadas a cabo para determinar la presencia, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, de secuencias relacionadas con las unidades repetitivas de *D. melanogaster*, no fueran fructuosas. Parece ser que tales repeticiones se comportan como el DNA satélite, es decir, muy homogéneo dentro de una especie, pero con una alta tasa de divergencia entre las distintas especies.

Como se deduce de los análisis citogenéticos llevados a cabo en *Drosophila*, el locus hsrw mantiene sus características fenotípicas en las distintas especies, a pesar de su rápida evolución dentro del género. Entre ellas destacar su inducción selectiva por agentes como la benzamida, vitamina B₆, colchicina, paracetamol, etc (ver revisión de Lakhotia, 1987). En *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, el "puff" 85AB responde a tales tratamientos. Creemos que este dato es suficiente para considerar a dicho "puff" como el locus hsrw de las especies del grupo *obscura*, aunque de las experiencias de hibridación *in situ* no hayamos podido obtener información al respecto. Sin embargo, los resultados de los "Southern blots" están de acuerdo con la presencia, en cada especie, de un gen equivalente por genoma haploide. Otras pruebas, aunque menos directas, estarían a favor de tales afirmaciones, como el tratarse de una región activa tanto durante el desarrollo como en las condiciones inducidas por el choque térmico y por los tratamientos antes mencionados, y mantenerse en los elementos cromosómicos homólogos en las distintas especies, como veremos a continuación.

Los estudios moleculares del locus hsrw se han centrado en un número reducido de especies de *Drosophila*, relativamente distantes desde el punto de vista filogenético. La secuenciación de dicho gen en especies más próximas se convierte en un objetivo fascinante para comprender mejor la dinámica evolutiva de este locus. Pocas son las especies en las que se ha caracterizado, con cierto detalle, su respuesta frente al choque térmico, por lo que *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* se convierten en candidatos idóneos para tal objetivo.

Al estudiar la organización que presentan los genes de choque térmico en el genoma de *Drosophila*, se observa, entre las distintas especies, el mantenimiento de los mismos loci génicos en los grupos de ligamiento homólogos, tal como ocurre para los genes de copia única (figura 37) (Schedl et al, 1978; Holmgren et al, 1979; Sondermeijer y Lubsen, 1979; Corces et al, 1980; Peters et al, 1980; Pierce y Lucchesi, 1980). Para Muller (Muller 1940, citado en Clayton y Guest, 1986) el cariotipo haploide ancestral del género *Drosophila* consistía en cinco cromosomas alargados y uno puntual, a los que denominó elementos A, B, C, D, E y F, respectivamente. A partir del mismo y, mediante reordenaciones cromosómicas, se habría alcanzado la actual diversidad cariotípica del género *Drosophila*.

Aplicando la nomenclatura de Muller a los cromosomas politénicos de *D. subobscura*, *D. guanche*, y *D. madeirensis*, los genes HSP82 y aquellos que codifican para las proteínas de bajo peso molecular se localizan, igualmente, en el elemento D (cromosoma J) y los representantes de la familia

HSP70 en el elemento E (cromosoma O). Podemos, pues, asumir que los HSPs se han mantenido en los elementos D y E durante la evolución de las especies, a pesar de la gran diferenciación estructural sufrida por los cromosomas. Ello es debido a que las reordenaciones cromosómicas más comunes en *Drosophila*, tales como fusiones céntricas e inversiones paracéntricas, no afectan la identidad de dichos elementos.

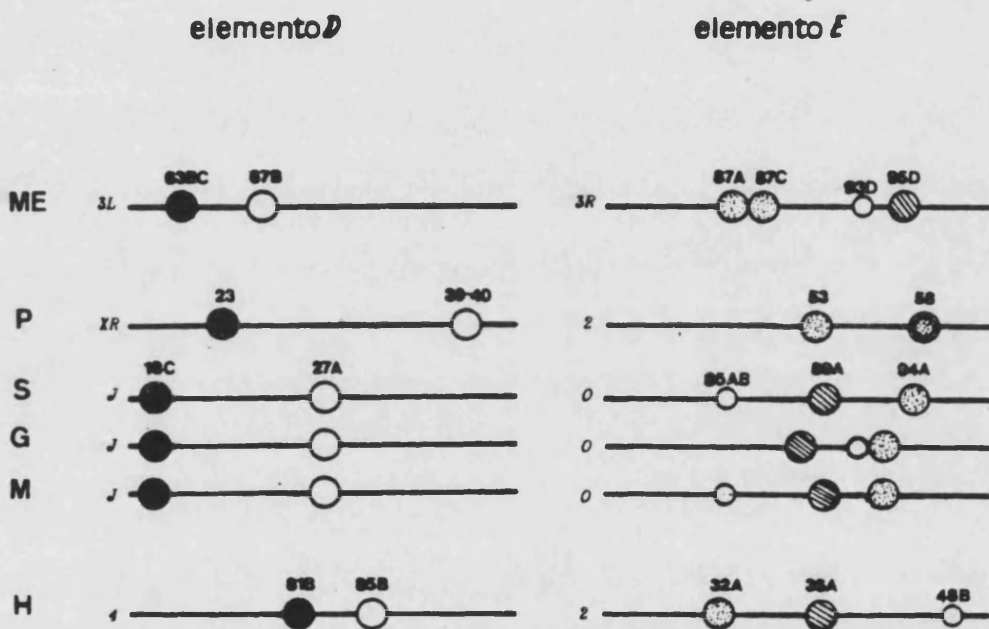


Figura 37.- Localización de los genes de choque térmico en distintas especies de *Drosophila*, *D. melanogaster* (ME), *D. pseudoobscura* (P), *D. subobscura* (S), *D. guanche* (G), *D. madeirensis* (M) y *D. hydei* (H). Los loci HSP82, HSP70, HSP68 y HSPs de las proteínas de bajo P.M., vienen representados, respectivamente, por círculos en negro, punteados, rayados y en blanco. Los círculos de menor tamaño indican la localización del gen *hsrw*. Puede observarse que los distintos miembros de la familia HSP se distribuyen en los cromosomas homólogos, en las diferentes especies, correspondiéndose con los elementos D y E de Muller.

Este comportamiento es comparable al de otras familias génicas, como los genes de la actina y tubulina (Loukas y Kafatos, 1986) y de la esterasa (Collet et al, 1990). Justo lo contrario ocurre para los elementos transponibles que presentan variaciones en número y posición dentro de la misma especie. Estos elementos transpasan los límites de los primitivos grupos de ligamiento, y se integran arbitrariamente en diferentes lugares del genoma. Una tercera clase de genes está representada por los del RNAr 5S y de las histonas, que muestran movilidad moderada, detectable solamente en la escala temporal de la evolución interespecífica (Felger y Pinsker, 1987). Para los genes que codifican los RNAt se observa un comportamiento más heterogéneo, mientras unos se mantienen en los mismos elementos, otros no cumplen dicho patrón (Tonzetich et al, 1990).

Brock y Roberts (1983) han propuesto la intervención de elementos transponibles en el mecanismo de dispersión de los genes en cromosomas no homólogos. De hecho se han detectado cortas secuencias de los genes ARNt en los transposones de *Drosophila*, así como la inserción de un elemento transponible en uno de los genes de las histonas.

Resumiendo, podemos decir que los genes de choque térmico se han mantenido en los elementos cromosómicos D y E, durante la evolución del género *Drosophila* (figura 38). Antes ó durante la radiación *Sophophora*, el primero de ellos presentaría, al menos, un locus con una copia del gen HSP82 y otro con dos genes para las proteínas de pequeño tamaño. El elemento E sería portador de dos loci para el complejo HSP70 y otro para el gen hsrw. Para explicar la organización actual de esta familia, habrán tenido que operar mayores cambios evolutivos, principalmente duplicaciones, en el grupo *melanogaster* que en el grupo *obscura*.

A lo largo de este trabajo ha sido nuestra intención destacar la importancia que tienen los "puffs" de los cromosomas politénicos. Ellos revelan, a groso modo, los acontecimientos esenciales del metabolismo celular. Los "puffs" de choque térmico así como la reciente identificación del locus hsrw de *Drosophila*, son un claro ejemplo del papel que han desempeñado en la apertura del estudio sobre la respuesta de los organismos frente al estrés ambiental. Aún existen unos pocos "puffs" temperatura por estudiar, que tal vez nos proporcionen evidencias experimentales de otras funciones celulares todavía no conocidas.

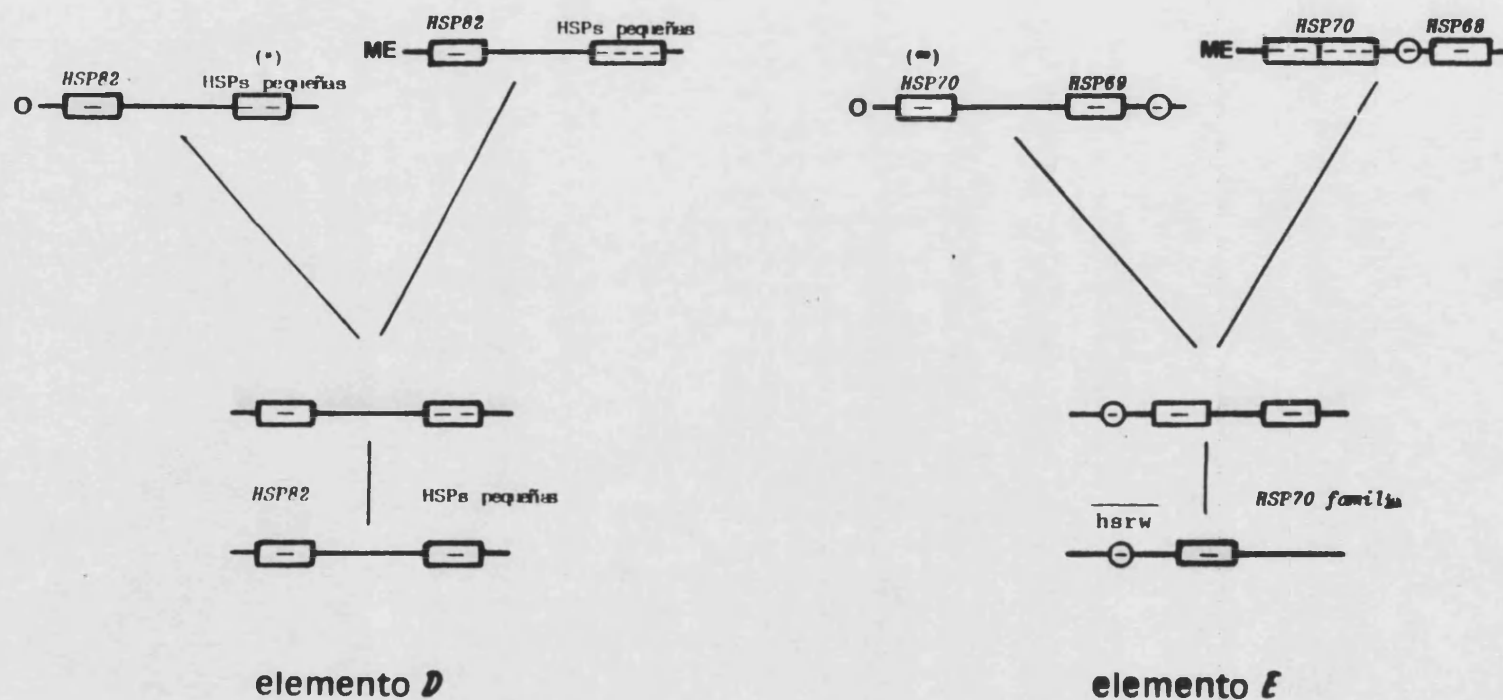


Figura 38.- Representación esquemática de la evolución de los genes de choque térmico en *Drosophila* (O: especies del grupo *obscura*; ME: especies del grupo *melanogaster*). Mediante rectángulos y círculos se representan los loci cromosómicos y por guiones el número de copias o genes de cada familia. (*) En las especies del grupo *obscura* hay, al menos, dos miembros de la familia HSP de las proteínas de pequeño tamaño (HSP32 y HSP25). (**) No sabemos cual es el número exacto de copias diferentes dentro de la familia HSP70, en las especies estudiadas. Hemos identificado, al menos, cuatro copias en total.



CONCLUSIONES

1.- *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis* son especies filogenéticamente muy relacionadas tal y como lo demuestran los patrones de formación de "puffs", tanto en condiciones no inducidas (durante el desarrollo) como en condiciones inducidas (choque térmico).

2.- De los 186 loci que forman el conjunto de los "puffs" desarrollo observados entre las tres especies, 166 son activos en *D. subobscura*, 146 en *D. guanche* y 145 en *D. madeirensis*. Se han identificado 71 "puffs" no descritos en, al menos, algún miembro de la triada. No obstante, aunque tales "puffs" representan una muestra importante respecto al número de loci, no lo son respecto de la actividad génica total.

3.- Existen 25 "puffs" que constituyen lo que hemos denominado el patrón característico común a las tres especies. Son los "puffs" de mayor tamaño y muestran modelos de actividad temporal similares, en las tres especies. Forman la secuencia básica en los cambios de expresión de los patrones de "puffs" de las especies filogenéticamente relacionadas.

4.- Los índices de actividad media coinciden en que *D. guanche* y *D. madeirensis* muestran actividades medias, similares, muy por de bajo de *D. subobscura*. En *D. madeirensis*, el perfil de actividad media durante el desarrollo, contrasta fuertemente con el patrón general de *Drosophila*.

5.- Los resultados obtenidos de los coeficientes de distancia biológica nos han permitido establecer el siguiente orden filogenético: *D. guanche*(G)-*D. madeirensis*(M) < *D. subobscura*(S)- *D. madeirensis* < *D. subobscura*-*D. guanche*, siendo la distancia G-M, aproximadamente, la mitad de la S-G y S-M. Sugerimos que esta relación de distancia, es debida, más bien, a las diferencias ecológicas entre las especies que a las diferencias existentes entre sus genomas.

6.- El choque térmico provoca, en las tres especies, la inducción específica de los mismos loci, tal y como era de esperar en especies filogenéticamente relacionadas. Constituyen un total de 7 "puffs", de acuerdo con los resultados de los autorradiogramas, que hemos denominado "puffs"-temperatura y son: 2C, 15DE, 18C, 27A 31C/D, 89A y 94A.

7.- Hemos caracterizado seis proteínas de choque térmico de pesos moleculares aparentes de 78800, 71000, 69650, 41060, 32000-32500 y 25400-26170 daltons, dependiendo de la especie, en los dos últimos casos. De acuerdo con su movilidad electroforética respecto a las proteínas de choque de *D. melanogaster*, las hemos denominado como hsp82, hsp70, hsp69, hsp41, hsp32 y hsp25.

8.- De las experiencias de hibridación *in situ*, hemos deducido que en el "puff" 18C se localiza el gen HSP82 responsable de la síntesis de la proteína hsp82; los loci 89A y 94A contienen a los genes HSP69 y HSP70 que codifican para las proteínas de 69 y 70kd, respectivamente; y en el "puff" 27A se reúnen los HSPs de las proteínas de bajo peso molecular, hsp32 y hsp25. Se trata de los "puffs" que muestran los mayores marcajes autorradiográficos del total de "puffs"-temperatura.

9.- Los genes de choque térmico, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, muestran el mismo patrón de diversificación característico de otras especies de *Drosophila*. Mientras la familia HSP82 está formada por un gen de copia única, las familias HSP70 y HSPs para las proteínas de pequeño tamaño constituyen complejos génicos. Dentro de la familia HSP70 hemos distinguido entre los genes HSP70 y HSP69, los cuales muestran mayores homologías entre sí, que los representantes de esta familia en *D. melanogaster*.

10.- Los HSPs que codifican para las proteínas de bajo peso molecular constituyen la familia más heterogénea y menos conservada del estrés térmico. Frente a los cuatro genes de *D. melanogaster* (HSP28, HSP26, HSP23 y HSP22), las especies del grupo *obscura* tienen, al menos, dos (HSP32 y HSP25), cuyas homologías con los anteriores son menores respecto a las que muestran, entre *D. melanogaster* y estas especies, los HSPs de las otras familias génicas.

De los dos genes identificados en las especies del grupo *obscura*, uno de ellos muestra mayores semejanzas con los HSP28 y HSP23 que con los HSP26 y HSP22 de *D. melanogaster*. Para el otro gen la relación de similitud es la contraria.

11.- De acuerdo con los resultados de los análisis de restricción, en el gen HSP82 de las tres especies estudiadas, se han producido, respecto de *D. melanogaster*, al menos ocho cambios, dos de ellos suponen ganancia en nuevos sitios de restricción para los enzimas *SalI* y *HaeII* y el resto constituyen pérdidas en dianas *HaeII*, *PstI* y *PvuII*. Y para la mayoría de las copias de la familia HSP70, hemos observado un fragmento *XbaI-SalI*, cuya conservación en otras especies del género, indicaría la posible estructura ancestral del elemento z característico del gen HSP70.

12.- La menor complejidad del locus HSP70 en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, respecto a *D. melanogaster*, se pone de manifiesto, por una parte, por su menor diversificación al no estar duplicado y por otra, por la ausencia de secuencias relacionadas con las $\alpha\beta$ de dicha especie.

13.- Tras los tratamientos con benzamida y paracetamol se ha observado, en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*, la inducción preferencial de un único "puff", el 85AB. Consideramos que tal "puff" constituye el locus *hsrw* característico de *Drosophila*, mostrando, igualmente, una mayor similitud en la región del intrón.

14.- A lo largo de la evolución del género *Drosophila*, los genes de choque térmico se han mantenido en los elementos cromosómicos homólogos, a pesar de la gran diferenciación estructural sufrida por los cromosomas de las distintas especies. El gen HSP82, y los HSPs que codifican para las proteínas de pequeño tamaño se ubican en el elemento D (cromosoma J en *D. subobscura*, *D. guanche* y *D. madeirensis*), mientras el complejo HSP70 y el locus *hsrw* en el elemento E (cromosoma O, en las tres especies estudiadas).

BIBLIOGRAFIA

- Akam M.E., D.B. Roberts, G.P. Richards and M. Ashburner (1978). *Drosophila*: The genetics of two major larval proteins. Cell 13:215-225.
- Alcover A., M. Izquierdo, D. Stollar, Y. Kitagawa, M. Miranda and C. Alonso. (1982). In situ immunofluorescent visualization of chromosomal transcripts in polytene chromosomes. Chromosoma 87:263-277.
- Arbona M and R. de Frutos (1991). Stress response in *Drosophila subobscura*. VI. DNA:RNA hybrids and heat shock (enviado).
- Ashburner M. (1967). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 21:398-428.
- Ashburner M. (1969a). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. II. The X-chromosome puffing patterns of *D. melanogaster* and *D. simulans*. Chromosoma 27:47-63.
- Ashburner M. (1969b). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. III. A comparison of the autosomal puffing patterns of the sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. Chromosoma 27:64-85.
- Ashburner M. (1969c). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. IV. Variability of puffing patterns. Chromosoma 27:156-177.
- Ashburner M. (1969d). On the problem of the genetic similarity between sibling species: puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. Amer. Nat. 103:189-191.
- Ashburner M. (1970). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. Chromosoma 31:356-376.
- Ashburner M. (1972). Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. In "Results and Problems in Cell Differentiation", pp:101-151, Vol. 4 de "Developmental studies on Giant Chromosomes". Editado por W. Beermann. Springer-Verlag, Berlin.
- Ashburner M. (1980). Some aspects of the structure and function of the polytene chromosomes of the Diptera. In "Insect Cytogenetics" pp:65-81. Editado por R.L. Blackman, G.H. Hewith and M. Ashburner. Academic Press, New York.
- Ashburner M. (1989). *Drosophila*. A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashburner M. (1990). Puffs, Genes, and Hormones Revisited. Cell 61:1-3.
- Ashburner M. and H.D. Berendes (1978). Puffing of polytene chromosomes. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*" Vol 2b, pp:315-395. Editado por M. Ashburner and T.R.F. Wright. Academic Press, New York.

- Ashburner M., C. Chihara, P. Meltzer and G. Richards (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38:655-662.
- Ashburner M. and F. Lemeunier (1972). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VII. Homology of puffing patterns on chromosome arm 3L in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila yakuba*, with notes on puffing in *Drosophila teissieri*. Chromosoma 38:283-295.
- Atherton D. and J. Gall (1972). Salivary gland squashes for in situ nucleic acid hybridization studies. D.I.S. 49:131-133.
- Bächli G. (1989). Taxonomy and Geographic distribution of the *Drosophila obscura* group species. Second Congress European Society For Evolutionary Biology, pp:10.
- Bachmann L., M. Raab, and D. Sperlich (1989). Satellite DNA and speciation: A species specific satellite DNA of *Drosophila guanche*. Z. zool. Syst. Evolut.-forsch 27: 84-93.
- Balbani E.G. (1881). Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. Zool. Anz. 99:637-641.
- Bardwell J.C.A. and E.A. Craig (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *E. coli* Heat-inducible *dnaK*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:848-852.
- Beckenbach A.T. and A. Prevosti (1986). Colonization of North America by the European species, *Drosophila subobscura* and *D. ambigua*. The American Midland Naturalist 115:10-18.
- Becker, H.J. (1959). Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, *giant* und *lethal-giant-larvae*. Chromosoma 10:654-678.
- Beermann W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chomosoma 5:139-198.
- Beermann W. (1956). Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21:217-232
- Beermann W. (1961). Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsen-mutation. Chromosoma 12:1-25.
- Beermann W. (1972). Chromomeres and Genes. In "Developmental Studies on Giant Chromosomes", pp:1-34 de "Results and Problems in Cell Differentiation" vol.4. Editado por W. Beermann, J. Reinert y H. Ursprung. Springer-Verlag. New York.
- Belyaeva E.S. and Zhimulev I.F. (1974). Variation in the size of puffs in *Drosophila melanogaster*. Genetika 10:74-80.

- Belyaeva E.S. and Zhimulev I.F. (1976). RNA synthesis in the *Drosophila melanogaster* puffs. Cell Differentiation 4:415-427.
- Bendena W.G., J.C. Garbe, K.L. Traverse, S.C. Lakhotia and M.L. Pardue (1989). Multiple inducers of the *Drosophila* heat shock locus 93D (hsr-omega): inducer-specific patterns of the three transcripts. J. Cell. Biol. 108:2017-2028.
- Berendes H.D. (1965a). Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. Chromosoma 17:35-77.
- Berendes H.D. (1965b). Gene homologies in different species of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. I. Gene activity after temperature shocks. Genen Phaenen 10:32-41.
- Bienz M. (1985). Transient and developmental activation of heat-shock genes. Trends Biochem. Sci. 10:157-161.
- Bienz M and H.R.B. Pelham (1987). Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. Adv. Genet. 24:31-72.
- Blackman R. and M. Meselson (1986). Interspecific Nucleotide Sequence Comparisons Used to Identify Regulatory and Structural Features of the *Drosophila hsp82* Gene. J. Mol. Biol. 188:499-515.
- Bonner W.M. and R.A. Laskey (1974). A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels. Eur. J. Biochem 46:83-88.
- Bonner J.J. and M.L. Pardue (1976). The effect of heat shock on RNA synthesis in *Drosophila* tissues. Cell 8:43-50.
- Bonner J.J. and M.L. Pardue (1977). Polytene chromosome puffing and in situ hybridization measure different aspects of RNA metabolism. Cell 12:227-234.
- Breuer M.E. and C. Pavan (1955). Behaviour of polytene chromosomes of *Rh. angelae* at different stages of larval development. Chromosoma 7:371-386.
- Brcic D., A. Prevosti, M. Budnik and J. Ocaña (1981). Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile I. First population and cytogenetic studies. Genetica 56:3-9.
- Brock H.W. and D. B. Roberts (1983). Location of the *LSP-1* Genes in *Drosophila* Species by *in situ* Hybridization. Genetics 103:75-92.
- Brown A.J.L. and D. Ish-Horowicz (1981). Evolution of the 87A and 87C heat-shock loci in *Drosophila*. Nature 290:677-682.
- Burtis K.C., C.S. Thummel, C.W. Jones, F.D. Karim, and D.S. Hogness (1990). The *Drosophila* 74EF Early Puff Contains E74, a Complex Ecdysone-Inducible Gene That Encodes Two Related Proteins. Cell 61:85-99.
- Busen W., J.M. Amabis, O. Leoncini, B.D. Stollar and F.J.S. Lara (1982). Immunofluorescent characterization of DNA-RNA hybrids on polytene chromosomes of *Trichosia pubescens*. Chromosoma 87:247-262.

- Buzzati-Traverso, A.A. and R.E. Scossiroli (1955). The *obscura* group of the genus *Drosophila*. Advances in Genetics 7:47-92.
- Cabrera V.M., A.M. Gonzalez, J.M. Larruga and A. Gullón (1983). Genetic distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. Evolution 37:635-689.
- Cariou M.L., D. Lachaise, L. Tsacas, J. Sourdis, C. Krimbas and M. Ashburner (1988). New African species in the *Drosophila obscura* species group: genetic variation, differentiation and evolution. Heredity 61:73-84.
- Cavalli-Sforza L. and A.W.F. Edwards (1967). Phylogenetic analysis: models and estimator procedures. American Journal of Human Genetics 19:233-257.
- Clayton F.E. and W.C. Guest (1986). Overview of Chromosomal Evolution in the Family *Drosophilidae*. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*". Vol. 3e, pp:1-31. Edited por M. Ashburner, H.L. Carson and J.N. Thompson. Academic Press.
- Clever U. (1964). Actinomycin and puromycin: Effects on sequential gene activation by ecdysone. Science 146:794-795.
- Collet C., K.M. Nielsen, R.J. Russell, M. Karl, J.G. Oakeshott and R.C. Richmond (1990). Molecular Analysis of Duplicated Esterase Genes in *Drosophila melanogaster*. Mol. Biol. Evol. 7:9-28.
- Corces V., R. Holmgren, R. Freund, R. Morimoto and M. Meselson (1980). Four heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* coded within a 12-kilobase region in chromosome subdivision 67B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5390-5393.
- Corces V., A. Pellicer, R. Axel and M. Meselson (1981). Integration, transcription and control of a *Drosophila* heat shock gene in mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:7038-7042.
- Craig E.A. (1985). The heat shock response. CRC Critical Reviews in Biochemistry 18:239-280.
- Craig E.A., T.D. Ingolia, M.J. Slater, L.J. Manseali and J.C.A. Bardwell (1982). In "Heat shock from bacteria to man" pp:11-16. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab.
- Craig E.A. and B.J. McCarthy (1980). The *Drosophila* heat shock genes at 67B: characterization of recombinant plasmids. Nucleic Acids Research 8:4441-4457.
- Craig E.A., B.J. McCarthy and S.C. Wadsworth (1979). Sequence Organization of Two Recombinant Plasmids Containing Genes for the Major Heat Shock-Induced Protein of *D. melanogaster*. Cell 16:575-588.
- Crick, F. (1971). General model for the chromosomes of higher organism. Nature 234:25-27
- Crowley T.E., M.W. Bond and E.M. Meyerowitz (1983). The structural genes for three *Drosophila* glue proteins reside at a single polytene chromosome puff locus. Molecular and Cellular Biology 3:623-634.

- Cuenca J.B., A.O. Saura, V. Sorsa and R. de Frutos (1990). Ultrastructure of E1+2+9+12 inversion breakpoints in *Drosophila subobscura*. Biol. Cell. 70:39-51.
- Daneholt B. (1982). Structural and functional analysis of Balbiani ring genes in the salivary glands of *Chironomus tentans*. In "Insect Ultrastructure" Vol 1, pp:382-401. Editado por R.C. King and H.Akai. Plenum Press, New York.
- Díez J.L. and D. Baretino (1984). DNA-RNA hybrids and transcriptional activity in *Chironomus* polytene chromosomes. Chromosoma 90:103-110.
- Dobzhasky Th. and C. Epling (1944). Chromosomal Races in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. In "Contributions to the Genetics, Taxonomy and Ecology of *Drosophila pseudoobscura* and Its Relatives", pp:47-144. Carnegie Institution of Washington Publication 554. Washington D.C.
- Feinberg A.P. and B. Vogelstein (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. Analytical Biochemistry 132:6-13.
- Felger I. (1985). Cytologische lokalisation der histonegene dorch in situ hybridisierung an der polytän-chromosomen von vier *Drosophila*-arten. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.
- Felger I. and W. Pinsker (1987). Histone gene transposition in the phylogeny of the *Drosophila obscura* group. Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch 25:127-140.
- de Frutos R. and A. Latorre (1982a). Patterns of puffing activity in the polytene chromosomes of *Drosophila subobscura*. In "Advances in Genetics, Development and Evolution of *Drosophila*", pp:33-46. Editado por S. Lakovaara, Plenum Press, New York.
- de Frutos R. and A. Latorre (1982b). Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. I. J and U chromosomes. Genetica 58:177-188.
- de Frutos R., A. Latorre and L. Pascual (1984). Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. 3. Puffing activity depression by inbreeding. Theor Appl Genet 69:101-110.
- de Frutos R., A. Latorre and L. Pascual (1987a). Chromosomal polymorphism and gene expression in *Drosophila subobscura*. Genética Ibérica 39:307-314.
- de Frutos R., A. Latorre and L. Pascual (1987b). Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. IV. Position effect at the boundaries of the E12 inversion. Genetica 75:11-22.
- Garbe J.C., W.G. Bendena and M.L. Pardue (1989). Sequence Evolution of the *Drosophila* Heat Shock Locus hsrw. I. The Nonrepeated Portion of the Gene. Genetics 122:403-415.

- Garbe J.C. and M.L. Pardue (1986). Heat shock locus 93D of *Drosophila melanogaster*: a spliced RNA most strongly conserved in the intron sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 1812-1816.
- Glover C.V.C. (1982). Heat shocks induce rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:1781-1785.
- Goldschmidt-Clermont M. (1980). Two genes for the major heat-shock protein of *Drosophila melanogaster* arranged as an inverted repeat. Nucleic Acids Research 8:235-252.
- González A.M., V.M. Cabrera, J.M. Larruga and A. Gullón (1983). Molecular variation in insular endemic *Drosophila* species of the Macaronesian Archipelagos. Evolution 37:1128-1140.
- González A.M., M. Hernández, A. Volz, J. Pestano, J.M. Larruga, D. Sperlich and V.M. Cabrera (1990). Mitochondrial DNA Evolution in the *obscura* Species Subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Evol. 31:122-131.
- Grossbach U. (1973). Chromosome puffs and gene expression in polytene cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38:619-628.
- Henikoff S., M.A. Keene, K. Fechtler and J.W. Fristrom (1986). Gene within a gene: nested *Drosophila* genes encode unrelated proteins on opposite strands. Cell 44:33-42.
- Hernández J.J., Ll. Vilageliu and R. González-Duarte (1988). Functional and biochemical features of alcohol dehydrogenase in four species of the *obscura* group of *Drosophila*. Genetica 77:15-24.
- Hill R.J. and G.T. Rudkin (1987). Polytene Chromosomes: the Status of the Band-Interband Question. BioEssays 7:35-40.
- Hill, R.J. and B.D. Stollar (1983). Dependence of Z-DNA antibody binding to polytene chromosomes on acid fixation and DNA torsional strain. Nature 305:338-340.
- Holmgren R., V. Corces, R. Morimoto, R. Blackman and M. Meselson (1981). Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat-shock genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3775-3778.
- Holmgren R., K. Livak, R. Morimoto, R. Freund and M. Meselson (1979). Studies of Cloned Sequences from Four *Drosophila* Heat Shock Loci. Cell 18:1359-1370.
- Hovemann B. U. Walldorf and R.P. Ryseck (1986). Heat shock locus 93D of *D. melanogaster*: an RNA with limited coding capacity accumulates precursor transcripts after heat shock. Mol. Gen. Genet. 204:334-340.
- Ireland R.C. and E.M. Berger (1982). Synthesis of low molecular weight heat shock peptides stimulated by ecdysterone in a cultured *Drosophila* cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:855-859.

- Ireland R.C., E.M. Berger, K. Sirotkin, M.A. Yund, D. Osterbur and J. Fristrom (1982). Ecdysterone induces the transcription of four het-shock genes in *Drosophila* S3 cells and imaginal discs. Dev. Biol. 93:498-507.
- Ish-Horowicz D. and S.M. Pinchin (1980). Genomic Organization of the 87A7 and 87C1 Heat-induced loci of *Drosophila melanogaster*. J.Mol. Biol. 142:231-245.
- Ish-Horowicz D., S.M. Pinchin, P. Schedl, S. Artavanis-Tsakonas and M-E. Mirault. (1979). Genetic and Molecular Analysis of the 87A7 and 87C1 Heat-Inducible Loci of *D. melanogaster*. Cell 18:1351-1358.
- Jamrich M., A.L. Greenleaf and E.K.F. Bautz (1977). Localization of RNA polymerase in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2079-2083.
- Junakovick N., R. Caneva and P. Ballario (1984). Genomic distribution of copia-like elements in laboratory stocks of *D. melanogaster*. Chromosoma 90:378-382.
- Karch F., I. Török and A. Tissières (1981). Extensive regions of homology in front of the two hsp70 heat shock variant genes in *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 148:219-230.
- Kiknadze I. (1966). The structural and cytochemical characteristics of chromosome puffs. Symposium on the Mutational Process: genetic variations in somatic cells. pp:177-181, Prague.
- Koltzoff N. (1934). The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila*. Science 80:312-313.
- Korge G. (1975). Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:4550-4554.
- Krasney P.A., C. Carr and D.R. Cavener (1990). Evolution of the Glucose Dehydrogenase Gene in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 7:155-177.
- Kress H. (1972). Das Puffmuster der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis* seine Veränderungen in der Normal entwicklung und nach Injektion von Ecdyson. S.B. Bayer Akad. Wiss., Math. Nature Kl.:129-149.
- Krimbas C.B. and M. Loukas (1984). Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters in *Drosophila subobscura* and two closely related species. Heredity 53:469-482.
- Kunze-Mühl E. and E. Müller (1958). Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und die natürlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. Chromosoma 9:559-570.
- Kurczynsky T.W. (1970). Generalized distance and variables. Biometrics 26:525-534.
- Laemmler U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227:689-685.
- Laird C.D. (1980). Structural paradox of polytene chromosomes. Cell 22:869-874.

- Lakhotia S.C. (1987). The 93D heat shock locus in *Drosophila*: a review. J. Genet. 66:139-157.
- Lakhotia S.C. and A.S. Mukherjee (1970). Activation of a specific puff by benzamide in *D. melanogaster*. D.I.S. 45:108
- Lakhotia S.C. and T. Mukherjee (1980). Specific Activation of Puff 93D of *Drosophila melanogaster* by Benzamide and the Effect of Benzamide Treatment on the Heat Shock Induced Puffing Activity. Chromosoma 81:125-136.
- Lakovaara S. and L. Keranen (1980). Phylogeny of the *Drosophila obscura* group. Genetika 12:157-172.
- Lakovaara S., A. Saura (1982). Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*", vol 3b, pp:1-59. Editado por M. Ashburner, H.L. Carson and J.N.T. Thompson. Academic Press.
- Lakovaara S., A. Saura and C.F. Falk (1972). Genetic distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. Evolution 26:177-184.
- Larruga J.M. and W. Pinsker (1984). The importance of geographic isolation, structural rearrangement and speciation for the genetic divergence of chromosome O in *Drosophila subobscura*, *Drosophila guanche* and *Drosophila madeirensis*. Z. zool. Syst. Evolut.-forsch 22:103-113.
- Latorre A. (1980). Desarrollo larvario y formación de "puffs" en cromosomas politénicos de *Drosophila subobscura*. Tesina de Licenciatura. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Latorre A., A. Moya and R. de Frutos (1988a). Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. IV. Effect of inversions on gene expression. Evolution 42:1298-1308.
- Latorre A., E. Barrio, A. Moya and F.J. Ayala (1988b). Mitochondrial DNA Evolution in the *Drosophila obscura* Group. Mol. Biol. Evol. 5:717-728.
- Lefevre G.Jr. (1974). The relationship between genes and polytene chromosome bands. Annu. Rev. Genet. 8:51-62.
- Lefevre G.Jr. (1976). A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of the *Drosophila melanogaster* salivary glands. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*" Vol.1a, pp:32-66. Editado por M. Ashburner y E. Novitski. Academic Press, London.
- Lewis M., P.J. Helmsing y M. Ashburner (1975). Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glans of *Drosophila*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 72:3604-3608.
- Lindquist S. (1986). The heat-shock response. Ann. Rev. Biochem. 55:1151-1191.
- Lindquist S. (1987). Translational Regulation in the Heat-Shock Response of *Drosophila* Cells. In "Translational Regulation of Gene Expression" pp:187-207. Editado por Joseph Ilan. Plenum Publishing Corporation.

- Lindquist S and E.A. Craig. (1988). The Heat-Shock Proteins. Annu. Rev. Genet. 22:631-677.
- Lis J., W. Neckameyer, M-E. Mirault, S. Artavanis-Tsakonas, P. Lall, G. Martin and P. Schedl. (1981). DNA Sequences Flanking the Starts of the *hsp 70* and $\alpha\beta$ Heat Shock Genes are Homologous. Developmental Biology 83:291-300.
- Loukas M., C. Delidakis and F.C. Kafatos (1986). Genomic Blot Hybridization as a Tool of Phylogenetic Analysis: Evolutionary Divergence in the Genus *Drosophila*. J. Mol. Evol. 24:174-188.
- Loukas M.L. and F.C. Kafatos (1986). The actin loci in the genus *Drosophila*: establishment of chromosomal homologies among distantly related species by *in situ* hybridization. Chromosoma 94:297-308.
- Loukas M.L. and F.C. Kafatos (1988). Chromosomal locations of the actin genes are conserved between the *melanogaster* and *obscura* groups. Genetica 76:33-41.
- Loukas M., C.B. Krimbas and Y. Vergini (1984). Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. Phylogeny of ten species based on electrophoretic data. Heredity 53:483-493.
- Lychev V.A. (1965). A study of chromosomal activity during continuous inbreeding in *Drosophila*. Tsitologiya 7:325-333.
- Mainx F., T. Koske and E. Smital (1953). Untersuchungen über die chromosomale struktur europäischer Vertreter der *Drosophila obscura* gruppe. Zeit. Ind. Abst. Vererb. 85:354-372.
- Malacrida A., G. Gosperi, G.F. Biscaldi and R. Milaiu (1985). Significato funzionale di blocchi di geni concatenati in *Musca domestica* e altri ditteri. Atti. 2nd Congr. Naz. Soc. Ital. Ecol., S.I.T.E. 5:307-310.
- Maniatis T., E.F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Manousis T. and C.B. Kastritsis (1987). Possible correlation of polypeptides and Balbiani rings in the salivary glands of *Drosophila auraria* Peng. Genetica 74:31-40.
- Marinkovic D, F.J. Ayala and M. Andjelkovic (1978). Genetic polymorphism and phylogeny of *Drosophila subobscura*. Evolution 32:164-173.
- McKenzie S.L. and M. Meselson (1977). Translation in Vitro of *Drosophila* Heat-shock Messages. J.Mol. Biol. 117:279-283.
- Mechelke F. (1953). Reversible Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomes von *Acricotopus lucidus*. Chromosoma 5:511-543.
- Mirault M.E., M. Goldschmidt-Clermont, S. Artavanis-Tsakonas and P. Schedl (1979). Organization of the multiple genes for the 70.000-dalton heat-shock protein in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5254-5258.

- Mirault M.E., R. Southgate and E. Delwart (1982). Regulation of heat-shock genes: A DNA sequence upstream of *Drosophila* hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. EMBO J: 1:1279-1285.
- Moltó M.D. (1986). Estudio de la afinidad genética entre *Drosophila guanche* y *Drosophila subobscura*, mediante el análisis de "puffs". Tesina de Licenciatura. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Moltó M.D., R. de Frutos and M.J. Martínez-Sebastián (1987). The banding pattern of polytene chromosomes of *Drosophila guanche* compared with that of *D. subobscura*. Genetica 75:55-70.
- Moltó M.D., R. de Frutos and M.J. Martínez-Sebastián (1988). Gene activity of polytene chromosomes in *Drosophila* species of the *obscura* group. Chromosoma 96:382-390.
- Monclús M. (1976). Distribución y ecología de Drosophilidos en España.II. Especies de *Drosophila* de las Islas Canarias, con la descripción de una nueva especie. Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.) 74:197-213.
- Monclús M. (1984). Drosophilidae of Madeira, with the description of *Drosophila madeirensis* n. sp. Sonderdruck aus Z. F. Zool. System. u. Evol. 22:94-103.
- Moore S.K., Ch. Kozak, E.A. Robinson, S.L. Ullrich and E. Appella (1987). Cloning and nucleotide sequence of the murine hsp84 cDNA and chromosome assignment of related sequences. Gene 56:29-40.
- Mott M.R., E.J. Burnett and R.J. Hill (1980). Ultrastructure of polytene chromosomes of *Drosophila* isolated by microdissection. J. Cell. Sci. 45:15-30.
- Nagao R.T., J.A. Kimpel and J.L. Key (1990). Molecular and Cellular Biology of the Heat-Shock Response. In "Genomic Responses to Environmental Stress" pp: 235-266. Editado por John G. Scandalios. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Academic Press, Inc.
- Nagao R.T., J.A. Kimpel, E. Vierling and J.L. Key (1986). The heat shock response: A comparative analysis. Oxford Surv. Plan. Mol. Cell. Biol. 3:384-438.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations. Amer. Nat. 106:283-292.
- Neidhardt F.C., R.A. VanBogelen and V. Vaughn (1984). The Genetics and Regulation of Heat-Shock Proteins. Ann. Rev. Genet. 18:295-329.
- Nordheim A., M.L. Pardue, E.M. Lafer, A. Moller, B.D. Stollar and A. Rich (1981). Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes. Nature 294:417-422.
- Nover L. (1984). "Heat shock Response of Eukaryotic Cells". Editado por L. Nover. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Nover L., K.D. Scharf and D. Neumann (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. Mol. Cell Biol. 9:1298-1308.

- Ohtsuka K., A. Masuda, A. Nakai and K. Nagata (1990). A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 166:642-647.
- Painter T.S. (1933). A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. Science 78:585-586.
- Painter T.S. (1934a). A new method for the study of chromosome maps in *D. melanogaster*. Genetics 19:175-188.
- Painter T.S. (1934b). Salivary chromosomes and the attack on the gene. J. Hered. 25:465-476.
- Papaceit M. (1988). Estudio de las diferencias genéticas entre *Drosophila subobscura* Collins y *Drosophila madeirensis* Monclús. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona.
- Papaceit M and A. Prevosti (1989). Differences in chromosome A arrangement between *Drosophila madeirensis* and *Drosophila subobscura*. Experientia 45: 310-312.
- Pardue M.L. (1986). In situ hybridization to DNA of chromosomes and nuclei. In "Drosophila, a practical approach", pp:111-137. Editado por D.B. Roberts. IRL Press. Oxford, Washington DC.
- Pardue M.L., W.G. Bendena, M.E. Fini, J.C. Garbe, N.C. Hogan and K. L. Traverse (1990). HSR-omega, A Novel Gene Encoded by a *Drosophila* Heat Shock Puff. Biol Bull. 179:77-86.
- Pardue M.L., S.D. Gerbi, R.A. Eckhardt and J.G. Gall (1970). Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of *Diptera*. Chromosoma 29:268-290.
- Pardue M.L., L.H. Kedes, E.S. Weinberg and M.L. Birnstiel (1977). Localization of sequences coding for histone messenger RNA in the chromosomes of *D. melanogaster*. Chromosoma 63:135-151.
- Parker C.S. and J. Topol (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. Cell 37:273-283.
- Pascual L. (1983). Modelos de formación de "puffs" en distintos momentos de pupación en los cromosomas politénicos de *Drosophila subobscura* Coll. Tesina de Licenciatura. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Pascual L. (1986). Efecto de la temperatura sobre la expresión génica en los cromosomas politénicos de *Drosophila subobscura*. Tesis doctoral. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Pascual L. and R. de Frutos (1986). Stress response in *Drosophila subobscura*. I. Puff activity after heat shocks. Biology of the Cell 57:127-134.
- Pascual L. and R. de Frutos (1988). Stress response in *Drosophila subobscura*. IV. Differential gene activity induced by heat shock. Chromosoma 97:164-170.

- Pascual L., A. Latorre and R. de Frutos (1985). Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. II. Puffing patterns at the prepupa stage. Genetica 66:123-138.
- Pascual L. A. Latorre and R. de Frutos (1987). Stress response in *Drosophila subobscura*. III. Variability of heat shock puffs. Biology of the Cell 61:15-21.
- Paul J. (1972). General theory of chromosome structure and gene activation in eukaryotes. Nature 238:444-446.
- Pauli D., A. Spierer and A. Tissières (1986). Several hundred base pairs upstream of *Drosophila hsp23* and 26 genes are required for their heat induction in transformed flies. EMBO J. 5:755-761.
- Pauli D. and A. Tissières (1990). Developmental Expression of the Heat Shock Genes in *Drosophila melanogaster*. In "Stress Proteins in Biology and Medicine" pp:361-377. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pelham H. (1985). Activation of heat shock genes in eukaryotes. Trends Genet. 1:31-35.
- Pelham H.R.B. (1986). Speculations on the function of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 46:959-961.
- Pelham H.R.B. (1988). Evidence that luminal RE proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. EMBO J. 7:913-918.
- Pelham H.R.B. and M. Bienz. (1982). A synthetic heat shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. EMBO J. 1:1473-1477.
- Pelling C. (1959). Chromosomal synthesis of ribonucleic acids as shown by incorporation of uridine labeled with tritium. Nature 184:655-656.
- Pelling C. (1964). Ribonukleinsäure Synthese der Riesenchromosomen Autoradiographische Untersuchungen an *Ch. tentans*, Chromosoma 15:71-122.
- Peters F.P.A.M.N., N.H. Lubsen and P.J.A. Sondermeijer (1980). Rapid sequence divergence in a heat shock locus of *Drosophila*. Chromosoma 81:271-280.
- Pierce D.A. and J.C. Lucchesi (1980). Dosage compensation of X-linked heat shock puffs in *Drosophila pseudoobscura*. Chromosoma 76:245-254.
- Prakash S. (1977). Genetic divergence in closely related sibling species *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* and *D. miranda*. Evolution 31:14-23.
- Prevosti A. (1974). La distancia genética entre poblaciones. Miscellanea Alcobé. Barcelona.
- Prevosti A. (1976). Cariotipo of *Drosophila guanche* Monclús y *Dettopsomyia nigrovittata* Malloch. Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.) 74:215-217.
- Prevosti A., J. Ocaña and G. Alonso (1975). Distances between populations of *D. subobscura* based on chromosome arrangements frequencies. Theor Appl. Genet. 45:231-241.

- Ritossa F.M. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 18:571-573.
- Ritossa F.M. (1964). Experiential activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. Exp. Cell. Res. 35:601-607.
- Roberts P.A. and L.A. MacPhail (1985). Structure and activity of salivary gland chromosomes of *Drosophila gibberosa*. Chromosoma 92:55-68.
- Rudkin G.T. (1964). The proteins of polytene chromosomes. The nucleohistones pp:184-192.
- Rudkin G.T. (1965). The relative mutabilities of DNA in regions of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics 52:665-681.
- Rudkin G.T. (1972). Replication in Polytene Chromosomes. In "Developmental studies on Giant Chromosomes" pp: 59-85 de "Results and Problems in Differentiation" vol.4. Editado por W. Beermann. Springer, Berlin.
- Rudkin G.T. and B.D. Stollar (1977). Naturally occurring DNA/RNA hybrids. I. Normal patterns in polytene chromosomes. Mol. Human Cytogenetics 257-267.
- Ryseck R-P., U. Walldorf and B. Hovemann (1985). Two major RNA products are transcribed from heat-shock locus 93D of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 93:17-20.
- Schedl P., S. Artavanis-Tsakonas, R. Steward and W.J. Gehring (1978). Two Hybrid Plasmids with *D. melanogaster* DNA Sequences Complementary to mRNA Coding for the Major Heat Shock Protein. Cell 14:921-929.
- Schlesinger M.J. (1986). Heat shock proteins: The search for function. J. Cell Biol. 103:321-325.
- Schlesinger M.J. (1990). Heat Shock Proteins. The Journal of Biological Chemistry 265:12111-12114.
- Scouras Z.G. and C.D. Kastriasis (1984). Balbiani rings and puffs of the polytene chromosomes of *Drosophila auraria*. Chromosoma 89:96-106.
- Segraves W.A. and D.S. Hogness (1990).xxxxx Genes Dev. 4:204-219.
- Semeshin V.F., E.M. Baricheva, E.S. Belyaeva and I.F. Zhimulev (1985a). Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. II. Development of complex puffs. Chromosoma 91:210-233.
- Semeshin V.F., E.M. Baricheva, E.S. Belyaeva and I.F. Zhimulev (1985b). Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. III. Mapping of puff developing from one band. Chromosoma 91:234-250.
- Semeshin, V.F., I.V. Zhimulev and E.S. Belyaeva (1979). Electron microscope autoradiographic study on transcriptional activity of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Chromosoma 73:163-177.
- Shapira M. and E. Pinelli (1989). Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandem repeated genomic arrangement. Eur. J. Biochem. 185:231-236.

- Silva F.J. (1984). ^3H -uridine labelling patterns and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*: J and U chromosomes. Genetica 63:147-152.
- Sinibaldi R.M. and Storti R.V. (1982). One and two dimensional polyacrilamide gel analysis of the heat shock proteins of the virilis group of *Drosophila*. Biochem. Genet. 20:791-807.
- Sokal R.R. and P.H.A. Sneath (1963). Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco.
- Sondermeijer, P.J.A. and N.H. Lubsen (1979). The activity of two heat shock loci of *Drosophila hydei* in tissue cultures cells and salivary gland cells as analyzed by *in situ* hybridization of complementary DNA. Chromosoma 72:281-291.
- Sorsa V. (1988). "Polytene Chromosomes in Genetic Research" Ellis Hordwood Books in Gene Technology. New York-Chichester-Brisbane-Toronto.
- Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. J. Mol. Biol. 98:503.
- Spradling A., S. Penhan and M.L. Pardue (1975). Analysis of *D. melanogaster* by *in situ* hibridization: sequences transcribed in normal and heat shocked cultured cells. Cell 4:385-404.
- Steinemann M. (1982). Analysis of chromosomal homologies between two species of the subgenus *Sophophora*: *D. miranda* and *D. melanogaster* using cloned DNA segments. Chromosoma 87:77-88.
- Steinemann M., W.. Pinsker and D. Sperlich (1984). Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by *in situ* hybridization. Chromosoma 91:46-53.
- Stocker A.N. and C.D. Kastritsis (1972). Developmental studies in *Drosophila*. III. The puffing patterns of the salivary gland chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. Chromosoma 37:139-176.
- Sturtevant A.H. and E. Novitski (1941). The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. Genetics 26: 517-541.
- Subjeck J.R. and T.T. Shyy (1986). Stress protein systems of mammalian cells. Am J. Physiol. 250:C1-C17
- Tanguay R.M. (1985). Intracellular localization and possible functions of the heat shock proteins. In "Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress", pp 91-113.. Academic Press, London.
- Tissières A., H.K. Mitchell and U.M. Tracy. (1974). Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to Chromosome Puffs. J. Mol. Biol. 84:389-398.
- Terol J., M.P. Alonso and R. de Frutos (1991). *In situ* localization of the *Antennapedia* gene on the chromosomes of the nine species of the *obscura* group. Hereditas (en prensa).

- Throckmorton, L.H. (1985). The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In "Handbook of Genetics" pp, 421-469. Ed. King RC. Plenum Press, New York.
- Thummel C.S., K.C. Burtis and D.S. Hogness (1990). Spatial and Temporal Patterns of E74 Transcriptions During *Drosophila* Development. Cell 61:101-111.
- Tonzetich J., S. Hayashi and T.A. Grigliatti (1990). Conservatism of Sites of tRNA Loci among the Linkage Groups of Several *Drosophila* Species. J. Mol. Evol. 30:182-188.
- Wadsworth S.C., E.A. Craig and B.J. McCarthy (1980). Genes for three *Drosophila* heat-shock-induced proteins at a single locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2134-2137.
- Walldorf U., S. Richter, R.P. Ryseck, H. Steller, J.E. Edström, E.K.F. Bautz and B. Hovemann (1984). Cloning of heat-shock locus 93D from *Drosophila melanogaster*. EMBO J. 3:2499-2504.
- Wimber D.E. and D.M. Stefensen (1970). Localization of the 5S RNA genes of *Drosophila* chromosomes by RNA-DNA hybridization. Science 120:639-645.
- Withing J.H., M.D. Pliley, J.L. Farmer and D.E. Jeffrey (1989). Homologies in *D. melanogaster* and *D. virilis*. Genetics 122:99-109.
- Wu C. (1984). Activating protein factors binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin, Nature 311:81-84.
- Xiao H. and J.T. Lis (1989). Heat shock and developmental regulation of the *Drosophila melanogaster* hsp83 gene. Mol. Cell. Biol. 9:1746-1753.
- Young R.A. (1990). Stress Proteins and Immunology. Annu. Rev. Immunol. 8:401-420.
- Zhimulev I.F. and E.S. Belyaeva (1975). ³H-Uridine Labelling Patterns in the *Drosophila melanogaster* Salivary Gland Chromosomes X, 2R and 3L. Chromosoma 49:219-231.
- Zhimulev I.F., E.S. Belyaeva and V.F. Semeshin (1981). Informacional content of polytene chromosome bands and puffs. CRC Critical Reviews in Biochemistry 11:303-340.
- Zhimulev I.F., G.V. Pokholkova, A.V. Bgatov, V.F. Semeshin, G.H. Umbetova and E.S. Belyaeva (1983). Genetic interpretation of polytene chromosomes banding pattern. Molec. Biol. Rep. 9:19-23.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D.^{ña} Ma Dolores Moltó Ruiz

la calificación de APCO CUM LAUDE

Valencia, a 16 de Julio de 1991

El Secretario,

El Presidente

