

Universidad Nacional de San Martín  
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

# GENÉTICA GENERAL

## GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

1º CUATRIMESTRE 2010



**DOCENTES:** Dr. Carlos Buscaglia  
Lic. María Paula Zappia  
Lic. María Ziliani  
Lic. Cintia Sánchez

**AUTOR:** Lic. María Paula Zappia

## ÍNDICE

- Objetivos generales
- Programa de prácticas
- Régimen de aprobación de la materia
- Práctica 1. Introducción a la biología y a la genética de *Drosophila*. Reconocimiento de mutantes morfológicas e identificación de características sexuales.
- Práctica 2. Mapeos mediante cruzamientos genéticamente controlados en la mosca de la fruta.
- Práctica 3. Búsqueda de información sobre genes y mapeo citogenético mediante herramientas bioinformáticas utilizando FLYBASE.
- Práctica 4. Análisis de la progenie de los cruzamientos. Discusión de los resultados.
- Bibliografía
- Agradecimientos

## OBJETIVOS GENERALES

El programa de prácticas, de los seminarios y problemas del curso de Genética, pretende conseguir los siguientes objetivos:

- 1) Reforzar parte del cuerpo de conocimientos teóricos que han adquirido en la asignatura.
- 2) Familiarizar al alumno con algunas de las técnicas y metodologías utilizadas en la experimentación genética aplicando conceptos básicos de genética en un modelo biológico de fácil manipuleo y mantenimiento como *Drosophila*.
- 3) Analizar y mapear mutaciones aplicando los principios de herencia genética de los marcadores fenotípicos

## PROGRAMA DE PRÁCTICAS

Se llevará a cabo 1 bloque de prácticas centrados en algunos de los aspectos básicos de la Genética Mendeliana. Este bloque se desarrollará en un total de cuatro clases, de unas 4 horas cada una. En la primera de ellas, se familiarizarán con uno de los organismos más utilizados tradicionalmente en Genética, la especie *Drosophila*

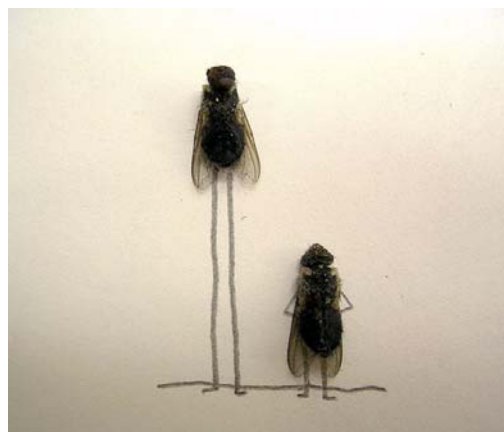
*melanogaster*, observando una variedad de fenotipos de mutaciones morfológicas y analizando el tipo de mutación del cual se trata según el genotipo que presenta. En la siguiente clase, realizarán cruzamientos controlados con moscas provenientes de líneas que poseen un elemento P insertado al azar en algún lugar del genoma. Estas moscas fueron generadas en el marco de un rastreo genético (a partir de una colección de mutantes insercionales) y el objetivo es establecer un mapeo cromosómico para cada una de estas líneas. A continuación se determinará el mapa genético entre dos genes ligados en el mismo cromosoma en base al análisis de la frecuencia de individuos recombinantes para estos genes con el objetivo de estimar la distancia genética entre estos dos marcadores. Por último, se buscará información sobre las mutaciones analizadas en la base de datos de *Drosophila* (flybase) y se utilizarán las herramientas bioinformáticas para contrastar los resultados observados. Estas prácticas, en su conjunto, son el reflejo en el laboratorio de las clases teóricas de Genética Mendeliana y constituyen una introducción insustituible a los procedimientos de estudio de la Genética clásica.

### RÉGIMEN DE APROBACIÓN DE LOS TP

Como ya se mencionó, la materia consta de clases teóricas, de laboratorio y de discusión de problemas y seminario. Las clases de laboratorio y problemas/seminarios son obligatorias. Durante el cuatrimestre los alumnos serán evaluados en: (1) 2 parciales integradores que incluirán conceptos vistos en las clases teóricas, prácticas, de seminarios y problemas, (2) Un parcialito antes de cada práctico y (3) Un informe final del TP donde se explique el trabajo realizado y los resultados obtenidos con el fin de integrar todos los prácticos y demostrar comprensión de la estrategia global. El mismo deberá tener formato de manuscrito científico (Título, Resumen, Introducción, Métodos, Resultados y Discusión) y no deberá exceder de 10 páginas tamaño A4 escritas con letra Times New Roman 12 pts a simple espacio.

Condiciones para aprobar los trabajos prácticos:

- Haber asistido al 80% de las clases de seminarios y laboratorios. Dos asistencias computadas como TARDE equivalen a un AUSENTE.
- Aprobar el informe final de laboratorio con nota  $\geq 5$ . De ser desaprobado este informe podrá ser presentado por segunda vez.
- Aprobación del 66% de los parcialitos. Estos parcialitos no pueden ser recuperados.



**PRÁCTICA 1.****INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA Y A LA GENÉTICA DE DROSOPHILA.****Objetivo**

El objetivo principal de esta primera práctica es el de familiarizarse con el modelo *Drosophila melanogaster*. Los conocimientos adquiridos en esta práctica son fundamentales para el desarrollo del resto de las prácticas donde se utiliza este modelo biológico. Los objetivos específicos son:

- Conocer el ciclo de vida y la morfología de las diferentes fases del desarrollo de *Drosophila*.
- Identificar los marcadores fenotípicos que presenta el adulto y analizar el correspondiente genotipo para deducir el tipo de mutación.
- Distinguir las diferencias morfológicas entre el macho y la hembra.

**Introducción**

En esta práctica se utilizarán individuos que pertenecen a la especie *Drosophila melanogaster*, y se estudiará el ciclo de vida, las características del dimorfismo sexual, la genética y los fenotipos/genotipos de diferentes mutantes.

*Drosophila melanogaster*, conocida vulgarmente como la mosca del vinagre o de la fruta, es un excelente material de laboratorio y, por ello, ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la Genética. Entre las múltiples ventajas que ofrece, destacan su mantenimiento sencillo y económico, que permite conservar un gran número de líneas interesantes por sus características genéticas de una forma rutinaria, la capacidad de producir, en un espacio reducido, un número de descendientes muy elevado en una sola generación y la gran variedad de mutantes fenotípicos que se conocen.

Los científicos estudian modelos biológicos simples con el objetivo de comprender los principios que se pueden aplicar a sistemas más complejos. Muchas de las investigaciones están basadas en el estudio de los genes homólogos de *Drosophila*, es decir genes con estructura y función similares a otros animales, incluyendo los vertebrados. Esta universalidad permite comprender la complejidad de los sistemas biológicos.

Brevemente, algunas de las ventajas de *D. melanogaster* como organismo modelo son:

- Método sencillo y poco costoso de crianza.

- Ciclo de vida corto (10 a 14 días dependiendo de la temperatura).
- Muy prolífica (cada hembra puede generar de 300 a 500 individuos).
- Genoma secuenciado y anotado.
- Gran cantidad de mutaciones espontáneas o inducidas que han permitido hacer un mapa genético y citológico completo.
- Presencia de cromosomas politénicos en las glándulas salivales de las larvas de tercer estadio
- Color transparente de la larva, por lo que es de gran utilidad para inmunohistoquímica.
- Organismo eucariota, con sistema nervioso relativamente complejo.
- Pequeño tamaño del genoma, con reducido número de cromosomas ( $n=4$ ,  $2n=8$ ) con un par sexual XY en el macho y XX en la hembra y 3 pares de autosomas (el cromosoma 4 es muy pequeño con muy pocos genes funcionales).

Se puede considerar a *Drosophila* como cosmopolita, aunque es más abundante en las estaciones cálidas en sitios donde se fermentan frutas como los plátanos, las uvas, etc., por lo que es común encontrarla en los mercados y alrededor de los depósitos de basura en las casas. Con el objeto de utilizar *Drosophila* en forma adecuada para los estudios en laboratorio, es preciso conocer los diversos estados de su desarrollo y diferenciar los sexos con toda claridad.

Las larvas de *Drosophila*, como las de otros dípteros, tienen en sus glándulas salivares cromosomas politénicos. Estos cromosomas gigantes permiten realizar estudios citogenéticos muy precisos. Los cromosomas politénicos poseen miles de copias de cada cromosomas alineados entre si. Las alternadas áreas de bandeos oscuros y claros contienen concentraciones variables de ADN y proteína en la cromatina. Estos pueden ser observados a muy bajo aumento, con una magnificación del 450x en el microscopio. Las glándulas salivales son importantes para las moscas en la producción del material con el cual hacen la pupa. A cada banda del cromosoma politénico se le asignó un número para construir un mapa citogenético.

### **El ciclo de vida de *Drosophila***

Las moscas *Drosophila* son dípteros holometábolos que durante su desarrollo pasan por las fases de huevo, larva, pupa y, finalmente, insecto adulto (Figura 1). La duración de su ciclo de vida depende de varios factores ambientales, tales como la temperatura

y la humedad. A una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 60%, el ciclo de *D. melanogaster* desde huevo a adulto es de unos 10 días, mientras que a 20°C son necesarios 15 días para ello. La tabla 1 muestra una cronología aproximada del desarrollo de *D. melanogaster* que nos servirá para entender la planificación de nuestros experimentos con esta especie.

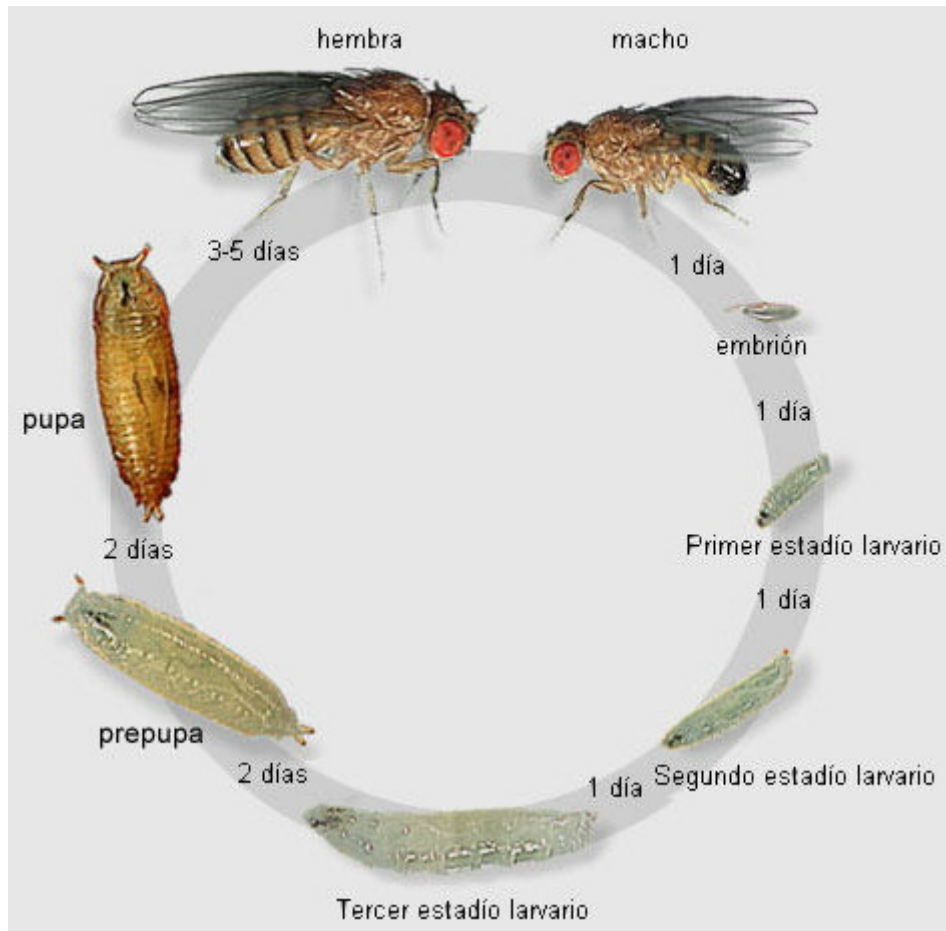


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El cortejo constituye un ritual en el cual el macho presenta un comportamiento estereotipado realizando una serie de círculos alrededor de la hembra. El apareamiento consiste en la deposición del esperma en el receptáculo seminal y el posterior almacenamiento en la espermateca a nivel del útero de la hembra. Los huevos son fertilizados dentro del útero y a continuación son depositados (u ovoposición). Al cabo de unas horas, se desarrolla la embriogénesis en la que tiene lugar una gran proliferación y reorganización celular, del huevo eclosiona una larva pequeña y blanca, muy activa y voraz. El crecimiento rápido de la larva le produce dos mudas sucesivas, al final de las cuales se obtienen las llamadas larvas de tercer estadio. Estas larvas pierden movilidad de forma progresiva y, finalmente, se fijan al

sustrato y comienzan a transformarse en insectos adultos: es la pupación. Las pupas se distinguen porque la cubierta externa de la larva se va endureciendo y oscureciendo progresivamente, hasta adquirir una tonalidad amarillenta o anaranjada. Una vez que ha terminado la metamorfosis que consiste en la degradación y reabsorción de los tejidos de la larva y la producción de nuevos órganos a partir de unas agrupaciones celulares larvarias llamadas discos imaginales, el insecto adulto rompe la cubierta de la pupa y emerge. Inmediatamente después de la emergencia, los insectos adultos se reconocen fácilmente porque no están completamente pigmentados. Se ven pálidos e hinchados y sus alas aún no se han desplegado. Cuando se realizan cruzamientos de moscas con genotipos diferentes, es crucial usar hembras vírgenes para poder predecir y controlar el genotipo de la progenie. Es importante reconocer moscas recién eclosionadas ya que esto garantiza que sean vírgenes.

Horas	Días	Estadio del desarrollo
0	0	fecundación: embrión
22	1	eclosión: primer estadio larvario
47	2	primera muda: segundo estadio
70	3	segunda muda: tercer estadio
118	5	Formación del <i>puparium</i>
119	5	<i>puparium</i> amarillo
120	5	<i>puparium</i> pigmentado
122	5	muda prepupal
130	5,5	formación de la cabeza, alas y patas
167	7	pigmentación de los ojos
184	7,5	pigmentación de las quetas
214	9	emergencia: adulto con alas plegadas

Tabla 1. Cronología del desarrollo de *D. melanogaster* a 25 °C

#### Características del insecto adulto. Identificación de los sexos.

Para poder realizar los cruzamientos en condiciones controladas se deben reconocer inequívocamente los sexos y conocer el tiempo a partir del cual los individuos emergidos son capaces de aparearse. Los adultos pueden aparearse a las pocas horas de la eclosión y las hembras comienzan a poner huevos poco después. La capacidad reproductora se conserva a lo largo de toda la vida, si bien la tasa de

ovoposición desciende a partir del décimo día. La longevidad depende en gran parte de la disponibilidad de alimento y de la temperatura, y pueden llegar a alcanzar hasta los tres meses de vida.

Se pueden señalar diferentes características morfológicas que permiten distinguir fácilmente los machos de las hembras de la especie *D. melanogaster* (aunque algunas de estas características no son comunes a todas las especies del género). El sexo de los adultos es más fácil de distinguir en esta especie (Figura 2).

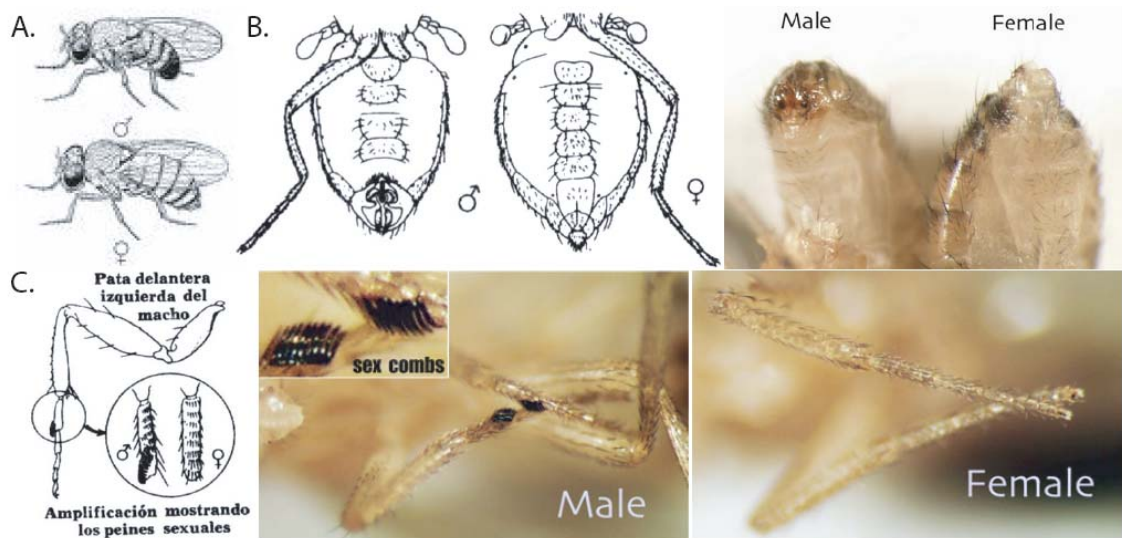


Figura2. Dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster*. A) Visión dorsal de los insectos adultos de ambos sexos. B) Visión ventral de las estructuras de las placas genitales del macho y de la hembra adultos. C) Detalle de la pata anterior de los adultos. Los machos presentan el peine sexual (sex combs).

Para distinguir los dos sexos hay que tener en cuenta diferentes características. En primer lugar, en los machos se observa el peine sexual que consiste en diez cerdas gruesas en la superficie de una de las partes de las patas anteriores (Figura 2). En segundo lugar, la pigmentación de la zona dorsal del extremo del abdomen es diferente en machos y hembras: en los machos forma una mancha negra continua sobre los segmentos terminales del abdomen (de ahí le viene el nombre de "melanogaster": extremo del abdomen oscuro). Además, el abdomen de los machos es redondeado y presenta sólo 5 segmentos, mientras que el de las hembras es más puntiagudo y presenta 7 segmentos. Finalmente, los machos son algo más pequeños. Empleando la lupa, se observan otras características: si apretamos los individuos sobre su dorso, aparecen los aparatos genitales. En las hembras podemos ver una



placa genital de color claro, mientras que los machos tienen una estructura oscura llamada arco genital (Figura 2).

Después de haber practicado la identificación de los sexos en los individuos adultos, el reconocimiento es muy fácil y se puede realizar a simple vista. Sólo en caso de duda es necesario utilizar la lupa (por ejemplo, los individuos que acaban de emerger pueden ser más difíciles de reconocer).

### **Manipulación de los adultos**

Para sexar los individuos, evaluar los marcadores genéticos que presentan y realizar los cruzamientos es necesario anestesiarse a las moscas para poder observarlas cuidadosamente, y para ello se emplean vapores de éter. Como esta sustancia es muy inflamable, se debe tener la precaución de no usarla cuando se tiene alguna flama cerca o existe poca ventilación en el laboratorio.

El "eterizador" se hace usando un frasco igual a los de cultivo; un buen "eterizador" debe cerrarse con un tapón de algodón y gasa al que se le agregan unas gotas de éter. Los vapores de éter anestesian a las moscas, pero el contacto con el éter líquido las mata. Para hacerlo funcionar, se coloca el eterizador sobre el frasco de cultivo, en unos cuantos segundos se inmovilizan las moscas, que en esta forma pueden ser examinadas, sacándolas del frasco y colocándolas en la caja de Petri ó cartulina blanca para observarlas bajo lupa. Debe tenerse cuidado de no sobrepasar la exposición al éter, porque al hacerlo mueren las moscas y extienden las alas verticalmente hacia el dorso. Para manipularlas sin dañarlas, se emplean los pinceles y las agujas de disección; si durante la observación las moscas comienzan a despertar, se debe volver a exponerlas al anestésico una segunda vez. Debe tener precaución con este procedimiento ya que el uso del éter en gran cantidad mata a las moscas.

Al terminar las observaciones se colocarán las moscas en sus viales. Tenga cuidado en que las moscas anestesiadas no se peguen a la comida del vial. Mantenga el vial horizontal hasta que se despierten. Las moscas que hayan muerto se deberán descartar en una botella con alcohol al 70%.

Los adultos se mantienen en viales ó botellas con comida para que depositen sus huevos. Luego el vial es mantenido durante todo el desarrollo hasta que emergen los adultos de las pupas y el ciclo vuelve a empezar.

La comida de *Drosophila* se prepara con:

polenta 66.5 g

levadura 20 g

nipagen 6.5 ml de solución 185 g en 1000 ml EtOH 100%

ac. Propiónico 4 ml

agar: 10 g

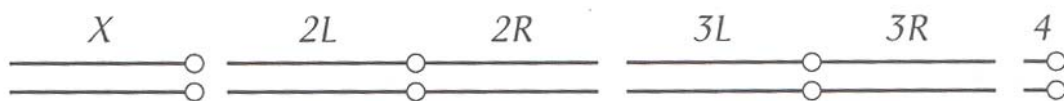
sacarosa: 40 g

Esto es para 1 litro de comida

### Dotación cromosómica

*D. melanogaster* tiene cuatro pares de cromosomas homólogos ( $2n = 8$ ): un par de heterocromosomas o cromosomas sexuales (XX en las hembras y XY en los machos) y tres pares de autosomas (II, III y IV; figura 3). El cromosoma IV es muy pequeño ("dot" o cromosoma puntiforme). Todo el genoma de *Drosophila* se divide en unidades físicas (visualizadas en los cromosomas politénicos mencionados anteriormente). El cromosoma X contiene las unidades 1-20. El cromosoma II se divide en el lado izquierdo y el derecho, siendo 2L con unidades 21-40 y 2R de 41-60. El cromosoma III tiene las unidades 61-80 en el lado 3L, y 81-100 en el 3R. El cromosoma IV es muy chico y solo contiene pocos genes y posee las unidades 101-104. Cada región numerada se divide en 5 subregiones denominadas A, B, C, D y E, y a su vez cada una de estas se divide en bandas numeradas (la cantidad depende de la topografía de la región en cuestión) El patrón de bandeo de los cromosomas politénicos tiene alta resolución. Prontamente, estos cromosomas permitieron correlacionar la posición de los genes en el mapa cromosómico con las características físicas del cromosoma y así determinar la localización de puntos de quiebre en los rearrreglos cromosómico. En el área molecular, mediante técnicas de hibridaciones *in situ*, los cromosomas politénicos permitieron mapear la localización física dentro del cromosoma en cuestión de las secuencias de ADN clonadas.

#### Female



#### Male

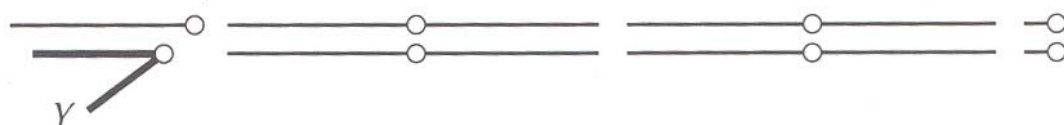


Figura 3: *Drosophila* posee cuatro pares de cromosomas, representados con líneas para los brazos y con círculos para los centrómeros. "L" se refiere al brazo izquierdo

del cromosoma y "R" al derecho. Los cromosomas X y 4 tienen diminutos brazos derecho. El cromosoma 4 es solo 1/5 en largo con respecto al X, 2L, 2R, 3L y 3R.

### Mutantes fenotípicos

En *D. melanogaster* se dispone de distintos tipos de mutantes fenotípicos que pueden tener afectados la morfología del ala, el color del cuerpo, el tamaño, forma o color de los ojos o de las quetas, etc. En estas prácticas se utilizarán mutantes de identificación sencilla.

### Desarrollo de la Práctica 1

- a) Los docentes entregarán a los alumnos el material que será examinado bajo la lupa para lograr el reconocimiento del sexo en las moscas adultas de *D. melanogaster*. En la tabla 2 se detallan las características distintivas de ambos sexos.

Características	HEMBRA	MACHO
Terminación del abdomen	Alargada	Redondeada
Número de segmentos abdominales	Siete	Cinco
Setas en metatarso del primer par de patas (peine sexual)	Ausentes	Presentes
Coloración último segmento abdominal	semejante a los demás	más oscuros

Tabla 2: Comparación de las características morfológicas sexuales

Observar las moscas al microscopio, al voltearlas, comparar por su lado ventral los genitales externos y clasificarlas según el sexo.

- b) Los docentes entregarán distintos tipos de mutantes de *D. melanogaster* para su reconocimiento bajo lupa.

Observar:

- el color y la forma de los ojos
- el color del cuerpo
- la estructura de las alas
- la estructura de las quetas dorsales

Comparar las distintas líneas de moscas mutantes con la línea *wild type*

Deducir de qué mutación se trata para cada caso basándose en el listado de mutantes detallado a continuación

### **Tipos de mutantes**

Las mutaciones que pueden encontrarse en *D. melanogaster* están ordenadas por grupos de acuerdo a las características fenotípicas que afectan.

#### 1- setas, cerdas o quetas

**forked**: setas acortadas, nudosas, bifurcadas o retorcidas.

**shaven**: setas afeitadas.

**singed**: todas las setas muy rizadas, u onduladas como chamuscadas.

**spineless**: setas débiles.

**Stubble**: setas disminuidas y en forma de maza.

#### 2- color del cuerpo

**black**: cuerpo, tarso de las patas y venas de las alas de color negro.

**ebony**: cuerpo de color negro brillante. Es el tipo oscuro que se ha descrito.

**sable**: cuerpo marrón oscuro.

**tan**: cuerpo tostado.

**yellow**: cuerpo de color amarillo, pelos y setas con las puntas amarillas. Las partes bucales de las larvas varían de amarillo a pardo.

#### 3- antenas

**Aristapedia**: desarrollo de patas en lugar de antenas.

#### 4- color de los ojos

**brown**: ojos oscuros de color vino que se tornan a púrpura con la edad. Además los testículos del adulto son incoloros y los tubos de Malpighi amarillentos en las larvas.

**purple**: ojos color rubí que se oscurece con la edad hasta llegar a un púrpura rubí.

**sepia**: ojos color marrón-rojizo en el imago, luego se oscurece a sepia y finalmente se vuelve negro en el adulto.

**white**: la característica fundamental es la presencia de ojos blancos, pero presentan además ocelos, tubos de Malpighi y cubierta testicular no coloreada. Tiene varios alelos: white apricot, white eosine, etc.

#### 5- forma de los ojos

**Bar**: mutación debida a una duplicación. Produce reducción del tamaño del ojo que toma forma de barra vertical en las hembras homocigotas y en los machos. En las hembras heterocigotas es arriñonado.

**eyeless**: tamaño del ojo variable desde sin ojos hasta casi tipo salvaje, generalmente reducidos a la mitad. Influenciado por la temperatura.

**Lobe:** ojos lobulados.

**Star:** ojos de forma estrellada.

#### 6- tamaño de las alas

**apterous:** sin alas.

**miniature:** alas pequeñas que no sobresalen del abdomen.

**vestigial:** alas uniformemente reducidas a pequeñas escamas en la región basal, muestran nervaduras pero carecen del área marginal. Balancines también reducidos.

#### 7- forma de las alas

**Curly:** mutación asociada con una inversión. Produce alas fuertemente curvadas hacia arriba y lados.

**curved:** alas divergentes y curvadas hacia abajo.

**dumpy:** alas truncadas y reducidas a dos tercios de su longitud.

**scalloped:** alas festoneadas.

#### 8- venación de las alas

**crossveinless:** no hay venas transversales o solamente se observan trazas.

**incomplete:** alas con nervadura radial incompleta. (autosómico).

#### 9- inclinación de las alas

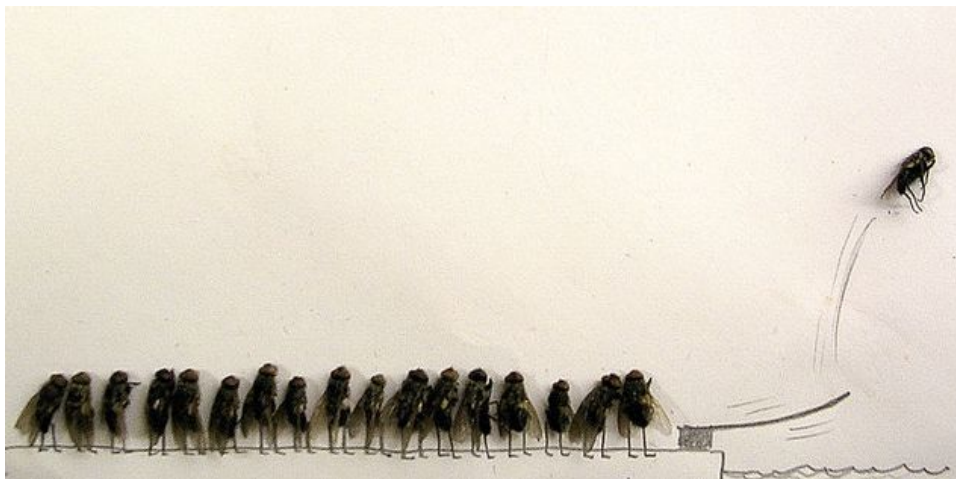
**Dichaete:** mutación asociada a una inversión. Produce la separación de las alas en ángulo de 45° del eje del cuerpo y de 30° hacia arriba.

Se buscará información (secuencia, tipo de mutación, banda, cromosoma, referencias) en flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) sobre el gen responsable de cada uno de los fenotipos mutantes observados, aprendiendo a utilizar la base de datos del genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster* (práctica 3).

Muchos genes solo presentan el fenotipo cuando ambos genes de los cromosomas homólogos están afectados. Esto son las mutaciones recesivas. Las mutaciones dominantes se indican con Mayúscula y las recesivas con minúsculas. Un ejemplo de mutaciones recesivas letales es: wingless (wg), localizado en el cromosoma 2, posición 30.0. Ejemplos de mutaciones dominantes son: Curly Wings (Cy), localizado en el cromosoma 2, posición 6.1; Stubble Bristles (Sb), localizado en el cromosoma 3, posición 58,2. Algunas mutaciones no letales recesivas son: purple eye (pr), cromosoma 2, posición 54,5; ebony body (eb), cromosoma 3, posición 70,7.

Las mutaciones ligadas al sexo están localizadas en el cromosoma X (ó 1). Como ejemplo, white eyes (w) en la posición 1.5; miniature wings (m) en posición 36,1.

- c) Los docentes informarán acerca de los genotipos de las moscas en observación. En base a estos datos y la observación del fenotipo, determinar de qué tipo de mutación se trata (dominante/recesiva).



**Práctico 2.****MAPEOS MEDIANTE CRUZAMIENTOS GENÉTICAMENTE CONTROLADOS EN LA MOSCA DE LA FRUTA****Objetivo**

El objetivo de esta práctica es que el alumno se familiarice con los principios de herencia genética llevando a cabo experimentos genéticos. En este caso se llevarán a cabo cruzamientos controlados de *Drosophila* empleando moscas con genotipos conocidos tal que pueda predecir los genotipos de la progenie. Para realizar este análisis deberá basarse en los principios de Mendel de segregación de alelos.

Esta práctica consta de dos secciones y cada una tiene un objetivo específico:

- A) Deducir el cromosoma en el cual está insertado el elemento P en una línea de la colección de mutantes insercionales en base a la evaluación de la segregación de marcadores ligados a cada uno de los cromosomas con respecto al marcador del transposón
- B) Establecer la distancia genética entre dos marcadores del mismo cromosoma en base a la frecuencia de recombinantes observada en la progenie. Comprender el razonamiento lógico de cómo se construye un mapa genético.

**Introducción**

La posición relativa de muchos genes en los cromosomas de *Drosophila* han sido identificados y mapeados basándose en la frecuencia de recombinación con los genes vecinos. Esto se denomina ligamiento ó mapa genético. El mapa genético se establece definiendo el orden y las distancias relativas entre genes situados en un mismo cromosoma basándose en la frecuencia de crossing-over entre los genes de cromátidas hermanas (tabla 3).

Cromosoma 1	Cromosoma 2	Cromosoma 3	Cromosoma 4
1.5—white eyes, w	0.0— aristaless antennae, al	19.2—javelin bristles, jv	—grooveless scutellum, gvl
3.0—facet eyes, fa	1.3—Star eyes, S*	26.0—sepia eyes, se	—bent wings, bt
5.5—echinus eyes, ec	4.0—held-out wings, ho	26.5—hairy body, h	2.0—eyeless, ey
7.5—ruby eyes, rb	6.1—Curly wings, Cy*	35.5—eye gone, eyg	
13.7—crossveinless wings, cv	13.0—dumpy wings, dp	41.0—Dichaete wings/bristles, D*	
20.0—cut wings, ct	16.5—clot eyes, cl	44.0—scarlet eyes, st	
21.0—singed bristles,	21.9—spade wings,	47.5—Antennapedia,	

sn	spd	Antp*
27.5—tan body, t	31.0—dachs tarsi, d	48.0—pink eyes, p
33.0—vermillion eyes, v	41.5—daughterless, da	50.0—curled wings, cu
36.1—miniature wings, m	48.5—black body, b	58.2—Stubble bristles, Sb*
43.0—sable body, s	51.2—reduced bristles, rd	58.5—spineless, ss
44.0—garnet eyes, g	54.5—purple eyes, pr	58.7—bithorax body, bx
51.5—scalloped wings, sd	55.9—light eyes, lt	62.0—stripe body, sr
56.7—forked bristles, f	57.5—cinnabar eyes, c	63.1—glass eyes, gl
57.0—Bar eyes, B	67.0—vestigial wings, vg	66.2—Delta veins, DI
59.5—fused veins, fu	72.0—Lobe eyes, L	69.5—Hairless, H
62.5—carnation eyes, car	75.5—Curved wings, C	70.7—ebony body, e
66.0—bobbed bristles, bb	91.5—smooth abdomen, sm	74.7—cardinal eyes, cd
	104.5—brown eyes, bw	88.0—mahogany eyes, mah
	107.0—speck body, sp	106.2—Minute bristles, M

*Tabla 3: Mapa genético abreviado de Drosophila melanogaster, presentando alguno de los genes que han sido mapeados hasta la fecha. Las mutaciones dominantes se escriben en mayúscula, y las letales están marcadas con \*. La unidad de distancia en un mapa genético es denominada unidad de mapa (um), siendo 1um equivalente a 1% de recombinación.*

### **Mapeo genético**

Durante la meiosis, cada par de cromosoma homólogo se junta formando una tétrada (dos pares de cromátidas hermanas). Durante la profase I, los cromosomas homólogos se entrecruzan y se enrollan. Las cromátidas no hermanas pueden intercambiar fragmentos de material genético. Es el denominado proceso de recombinación ó crossing-over. En *Drosophila*, el crossing-over ocurre solamente en las hembras.

El mapeo de posiciones relativas, establece el orden de los genes ligados en un determinado cromosoma. Esto se construye basándose en la frecuencia de crossing-over entre pares de genes. Cuanto más cercanos están dos genes uno del otro, es menos probable que ocurran eventos de recombinación entre estos dos.



Inversamente, cuanto mayor es la distancia entre dos genes, la probabilidad de que ocurra crossing-over entre estos dos marcadores es mayor. La probabilidad de recombinación puede expresarse como distancia ó valor (% de crossing-over entre dos puntos del cromosoma). Una unidad de mapa (um) es la distancia entre dos genes ligados en el espacio donde ocurren eventos de recombinación con una frecuencia de 1%, ó es la distancia entre dos genes para los cuales se obtuvo un 1 recombinante en meiosis de 100 casos analizados. Una unidad de mapa es también denominado centimorgan cM en honor a Thomas Hunt Morgan. La posición en el mapa en la cual se localiza el gen es también llamada *locus*.

En el cromosoma X de *Drosophila*, por ejemplo, el locus de *cross-veinless wings* (cv) es 13,7. El locus de *cut wings* (ct) es 20,0 (tabla 3); entonces la distancia entre cv y ct es 6,3 um. Si la frecuencia de recombinación entre cv y ct es 6,3; y la de ct y *vermillion eyes* (v) es 13, entonces el orden en el cromosoma podría ser cv-ct-v ó ct-cv-v. Para determinar cual de estas dos posibilidades es la correcta, hay que medir la frecuencia de recombinación entre cv y v. Si cv y v recombinan con una frecuencia de 19,3, entonces se deduce que ct se localiza entre estos dos marcadores (tabla 3).

#### **Cromosomas balanceadores:**

Los cromosomas balanceadores consisten en una herramienta ampliamente usada en el seguimiento de mutaciones y en el mapeo cromosómico en *Drosophila*. Son cromosomas especiales que contienen múltiples rearrreglos cromosómicos, comunmente inversiones inducidas por radiación. Esta propiedad los hace incapaces de aparearse y recombinar con el correspondiente homólogo normal durante la profase meiótica. Los cromosomas balanceadores poseen mutaciones dominantes como marcadores que facilitan su reconocimiento. Generalmente estos marcadores son recesivos letales. Estas dos propiedades, la supresión de la recombinación entre cromosomas homólogos y la presencia/ausencia del marcador, son una gran ventaja en el momento de analizar la segregación de los cromosomas y la deducción de los genotipos de la progenie. Una de las grandes aplicaciones que presentan los balanceadores es la de simplificar el planteo del esquema de los cruzamientos. Esto se explica por la herencia de estos cromosomas que puede ser fácilmente rastreada ya que bloquea eficientemente toda recombinación con el cromosoma homólogo correspondiente, y análogamente también se puede rastrear en la progenie de manera inequívoca el cromosoma homólogo. Entonces si la progenie no posee el marcador del cromosoma balanceador, se concluye que heredó el homólogo. Este es un principio importante en el esquema de los cruzamientos genéticos de *Drosophila*.

La mayoría de los balanceadores que existen corresponden a los cromosomas X, 2 y 3. No son necesarios para el cromosoma 4 ya que no existe intercambio de material genético en ese cromosoma (crossing over).

#### Marcadores genéticos

Las mutaciones marcadoras son claves para descifrar genotipos. Generalmente se usan para marcar cromosomas que se siguen de manera específica, pero también para marcar cromosomas que se quieren perder. Existe una amplia variedad de mutaciones que afectan, por ejemplo, el color del ojo, las formas del ojo, del ala, de las quetas, la pigmentación de la cutícula. Estos permiten etiquetar los cromosomas. En el momento de usar los marcadores de estos balanceadores, por ejemplo durante la elección de los balanceadores para un cruzamiento determinado, se debe tener en cuenta la penetrancia (la probabilidad que una mosca mutante presente el fenotipo correspondiente) y la expresividad (cuanto abarca del rango del fenotipo en cuestión) de estos marcadores para disminuir la probabilidad de cometer errores en la deducción de los genotipos. Además si se usan varios marcadores, hay que considerar la interacción entre estos, es decir el fenotipo que presente cuando los dos están presentes y afectan el mismo rasgo (por ejemplo, el color de ojos ó la forma de las quetas).

#### Elemento P

Los transposones son elementos genéticos capaces de movilizarse de un lugar a otro del genoma de un organismo. La mayoría de los organismos, desde bacteria a humanos, poseen transposones. La mayoría de los transposones cargan un gen que codifica para la enzima transposasa que cataliza la escisión y la reinserción del transposón dentro del genoma. Si bien a muchos transposones les falta el gen de la transposasa, pueden usar la enzima producida por otro transposón para poder transponer. En condiciones en las cuales no hay una fuente externa de transposasa, el transposón permanece fijo en su sitio y es genéticamente estable. Mediante la adición y remoción de una transposasa, es posible controlar exactamente los eventos de transposición.

El genoma de *Drosophila* contiene varias familias de elementos transponibles. Los elementos P son uno de los primeros transposones descubiertos en *Drosophila* y los más estudiados. Son relativamente nuevos en la escala evolutiva de *Drosophila*, y se piensa que estos fueron adquiridos por transferencia horizontal hace menos de 200 años. Se ha desarrollado una amplia gama de aplicaciones técnicas empleando al elemento P como herramienta genética en la manipulación del genoma de *Drosophila*.

La estructura del elemento P se presenta en la figura 4. En cada extremo del elemento P se sitúan repeticiones invertidas que son necesarias para la transposición. El elemento P ha sido modificado genéticamente removiendo el gen de la transposasa y reemplazándolo por una copia *wild-type* del gen *white+*. Esto constituye un marcador del elemento P, es decir que la presencia del elemento P se denota por el color de ojos rojos. Cabe aclarar que el transposón que se insertó en una mosca con un background genético *white* (mutante de ojos blancos). El color rojo conferido por el marcador *white+* del elemento P, en la mayoría de los casos es mas claro que el *wild-type* (que posee un color rojo furioso mientras que el marcador del P tiene un color que varía en la gama de naranja debido a que no posee el gen completo de *white*, si no que se clonó una mini-versión correspondiente solamente a la secuencia codificante. El color de ojo conferido por el *mini-white* (marcador del P) puede variar en su tonalidad entre el amarillo y el rojo dependiendo del lugar en el cual se insertó el elemento P dentro del genoma (presencia de regiones regulatorias de la expresión génica).

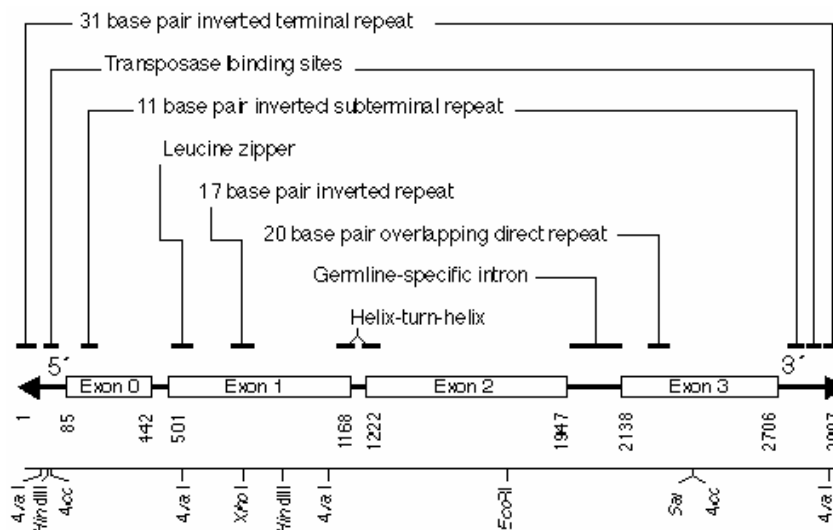


Figura 4: Anatomía del elemento P (modificación de Lindsley and Zimm 1992) con algunas características y mapa de restricción.

### Aislamiento de nuevos mutantes mediante rastreo genético de una colección de mutantes insercionales

El sulfonato de etilmetano (EMS) se emplea como mutágenos químicos para inducir mutaciones puntuales en el genoma de *Drosophila*. También se realizan radiaciones con rayos-X ó gama para inducir rearrreglos cromosómicos (translocación, deleción, transposiciones e inversiones) por roturas de cromosomas. Pero una limitación de estas técnicas consiste en la identificación mediante un método sencillo del gen mutado

en el genoma de *Drosophila* en base al fenotipo de la mutación. Esto se solucionó con el desarrollo de las herramientas genéticas basadas en el elemento P, promoviendo así la mutagénesis insercional. El principio de esta estrategia consiste en la disrupción de genes por la inserción del elemento P.

#### Colección de mutantes insercionales

En la investigación, se ha empleado como estrategia genética para generar mutantes, la diseminación de copias del elemento P por todo el genoma de *Drosophila* mediante el agregado y la remoción, genéticamente controlada, de la fuente de transposasa. El elemento P se transpone de manera no replicativa y puede insertarse en un sitio en el cual interfiera la función de algún gen. Estos casos son denominados mutantes insercionales (transposon insertion mutants). Existen varias maneras de interferir la función de gen, por ejemplo, que el elemento P esté interrumpiendo la secuencia codificante ó la secuencia regulatoria de la expresión.

Empleando la enzima transposasa de manera controlada, se generan colecciones de moscas en las cuales cada una de las líneas posee el elemento P insertado en algún lugar al azar dentro del genoma de *Drosophila*. Una vez generada la colección por transposición del P, el siguiente paso consiste en localizar cada P para poder plantear de manera correcta el esquema de los cruzamientos a seguir antes de realizar los experimentos del screen genético. Esto se realiza balanceando los cromosomas 2 y 3 de *Drosophila* y evaluando la segregación de los marcadores dominantes de los balanceadores con respecto al del elemento P (etiquetado con *white+*) en la progenie en cruzamientos genéticamente controlados. Así se deduce en qué cromosoma se localiza el elemento P.

En la práctica determinarán que cromosoma alberga el elemento P para un subgrupo de líneas de moscas de la colección de mutantes insercionales que fue generada en el laboratorio de la Dra. M Fernanda Ceriani (Fundación Instituto Leloir) y que gentilmente nos donó. Cada grupo recibirá una línea mutante insercional, recuerde anotar el número de stock, observar el color de ojos y compararlo con las líneas *wild-type* de *Drosophila*.

Nota: cabe aclarar que el elemento P de las líneas de moscas de la colección de mutantes insercionales ya no transpone porque la fuente de transposasa fue removida en el momento en que se generó cada una de las líneas.

Una gran ventaja de esta estrategia es la fácil identificación del gen interrumpido por el elemento P ya que la región quedó etiquetada por el mismo P permitiendo recuperar la secuencia de ADN ubicada a ambos lados del transposón por métodos moleculares.

### Localización del elemento P en moscas mutantes insercionales

El objetivo es localizar el elemento P para evaluar qué gen (es) está siendo alterado por la inserción del transposón. Una vez que se determinó en qué cromosoma se encuentra el P mediante cruzamientos controlados (como los que se realizarán en la práctica), se procede a continuación a mapear genéticamente la región de inserción empleando cromosomas especiales que contienen una serie de mutaciones recesivas diseminadas por todo el cromosoma (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/misc-browse/mapping.htm>). El procedimiento sigue la misma lógica que el mapeo genético por recombinación que se realizará en la práctica para calcular la distancia entre *white* y *yellow*, pero el análisis es más complejo ya que se usan varios marcadores y se calcula la distancia del P (marcado con *white*+ojos rojos) con respecto a cada marcador. En paralelo es posible determinar la posición del P en el mapa citológico de los cromosomas politénicos mediante la técnica de hibridación *in situ*. Se visualización en que banda se localiza. Finalmente, para completar este mapeo, se puede llevar a cabo un abordaje de genética molecular secuenciando las regiones de ADN localizadas en los extremos del elemento P empleando oligonucleótidos específicos del P (previamente se realiza un rescate plasmídico ó PCR inversa para recuperar las secuencias que flanquean el P). Con las secuencias obtenidas, se hace una búsqueda bioinformática para localizar el sitio exacto en el genoma de *Drosophila* donde se insertó el P. Así se identifica el gen que fue interrumpido por la inserción del P, y se determina de qué potencial mutante se trata. Aún quedaría por evaluar si la inserción del P afecta efectivamente la función del gen y si lo hace, de qué manera.

### Elemento P como herramienta molecular

Los elementos P se han empleado como poderosas herramientas de biología molecular para identificar genes de interés, clonarlos e insertándolo en el genoma como transgen. El uso de los elementos P tiene una amplia gama de aplicaciones técnicas según qué construcción genética posee. Algunas de ellas son la generación de:

- Colecciones de mutantes insercionales: cada línea afecta la función de algún gen por la inserción del P (Figura 5)
- Colecciones de 'enhancer trapping': cada línea reporta la actividad transcripcional de la región del genoma donde se insertó el P. Contiene un gen reportero como  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) ó GFP.
- Líneas transgénica: el elemento contiene el gen de interés clonado y lo sobreexpresa en determinado tejido

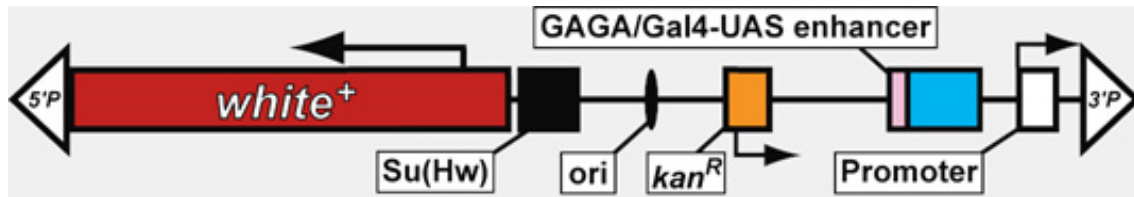


Figura 5: Las líneas que se van a observar y mapear poseen este elemento P, denominado EP, insertado en el genoma de *Drosophila*. Los extremos triangulares representan las repeticiones invertidas y también se indica el gen *white+* que confiere el color de ojos rojos como marcador del elemento P. Esta estrategia permite seguir el elemento P en la progenie, es decir seleccionar los individuos que heredaron el transposón por el fenotipo que presentan.

### Obtención de hembras vírgenes

Para poder controlar el cruzamiento y predecir los genotipos de la progenie hay que evitar que las hembras que deben utilizarse para el cruzamiento sean fecundadas por machos no deseados. Esto es importante ya que la hembra de *Drosophila* puede almacenar el esperma de una sola copula por un largo período de tiempo en la espermateca. Hay que asegurarse de coleccionar hembras vírgenes para realizar el cruzamiento de interés. Como las moscas adultas no se aparean hasta 8hs después de emergidos de la pupa, la recolección de moscas jóvenes (recién eclosionadas) garantiza que sean vírgenes. El procedimiento más común para lograrlo es eliminar con mucho cuidado los adultos presentes en la botella de cultivo cada cierto tiempo (para *D. melanogaster*, cada seis horas) de forma que podamos estar seguros de que todos los individuos nacidos en el botella después de la última eliminación sean vírgenes. Después de clasificarlos, los individuos se mantendrán separados por sexos. También es posible seleccionar individuos vírgenes si sólo se recogen aquellos que vemos que acaban de emerger y presentan las siguientes características:

- alas sin desarrollar
- cuerpo poco pigmentado e hinchado
- mancha oscura en el abdomen translúcido que revela la presencia del meconio (vestigios del intestino de larva)

Se debe tener precaución en no coleccionar junto a las hembras vírgenes, los machos recién emergidos que presentan las mismas características.

Las hembras así coleccionadas pueden ir almacenándose 3-4 días hasta tener una cantidad suficiente para el experimento. La fertilidad femenina tiene un pico entre los 4-10 días de edad.



Parentales: ♀ línea

x ♂ línea

Progenie: hembras

machos

-Observar los marcadores (color de los ojos, forma del ala, quetas en el dorso, color del cuerpo), sexar y separar los parentales a usar en el cruzamiento-#2. En base al fenotipo y determinar el genotipo.

-Realizar el cruzamiento correspondiente colocando 4-8 hembras vírgenes con unos 3-4 machos en un vial. Tener precaución al manipular las moscas (no las aplaste, ni las mate con el anestésico) ya que estas deben permanecer viables y fértiles para el cruzamiento. Es conveniente proceder rápido.

-Rotular cada vial con el cruzamiento hecho, la fecha y el grupo

-Analizar las posibles gametas generadas por cada uno de los parentales

-Establecer las posibles combinaciones de gametas y determinar los genotipos esperados y las frecuencias relativas para la progenie

**Nota:** asumir que durante la meiosis los pares de cromosomas homólogos se aparean y segregan de manera independiente. Todas las posibles combinaciones de gametas se producen con igual frecuencia durante la meiosis y además todas las posibles combinaciones de genotipos de la progenie se producen con igual frecuencia durante la fertilización. La viabilidad de todas estas combinaciones es otra cuestión, se verá cada caso en particular. Es recomendable realizar el análisis mediante un cuadro de Punnett. Es importante evaluar si todos los genotipos que se generan en la progenie son fácilmente distinguibles uno de otro fenotípicamente y sin ambigüedades, siendo esto clave para la genética de moscas.

-¿Qué es un cruzamiento de prueba?

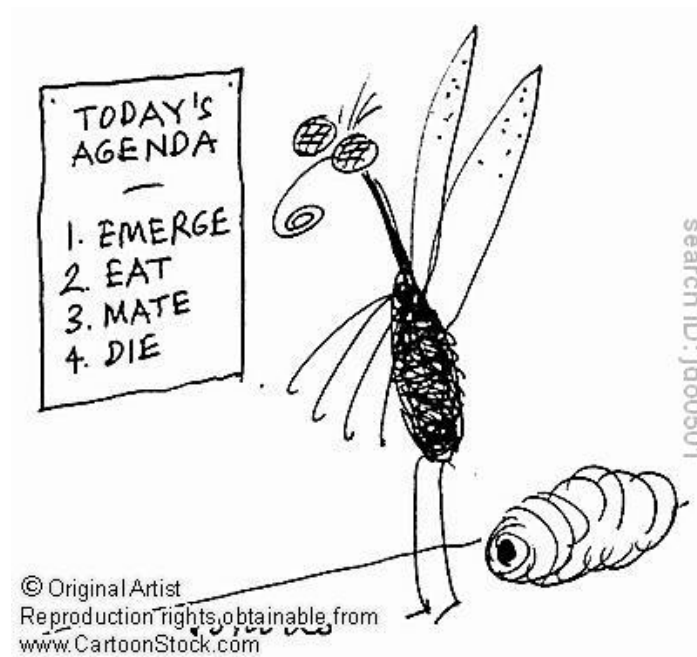
Considerar un caso diferente en el cual el objetivo sea deducir el genotipo de una mosca adulta con un fenotipo dominante. En otras palabras, si es homocigota ó heterocigota. ¿Cómo plantearía los cruzamientos para descifrar esto en base a la proporción de los fenotipos de la progenie? Plantear suponiendo que se trata de un marcador autosómico (i) y uno ligado al sexo (ii).

Se requiere de 10-14 días, dependiendo de la temperatura, para que el huevo de *Drosophila* se desarrolle hasta el adulto. Es conveniente realizar un seguimiento de los



viales y tomar notas de las observaciones hechas (estado del vial, estadio del desarrollo, etc.) durante el transcurso del desarrollo.

Se dejará que los adultos depositen los huevos por 3 días y luego se realizará un subcultivo pasando los parentales a viales nuevos para incrementar el número de la progenie. Los parentales a su vez serán eliminados del vial para que no se mezclen con la progenie y generen confusión en el desciframiento de los genotipos. Los viales serán mantenidos a 20-23°C para que el desarrollo de la progenie se lleve a cabo en 14 días (hasta la práctica 4).



**Práctica 3.****BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN SOBRE GENES DE DROSOPHILA Y MAPEO CITOGENÉTICO MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICA UTILIZANDO FLYBASE****Objetivo**

El objetivo de la práctica es en primer lugar que el alumno se familiarice con la base de datos de *Drosophila* mediante búsquedas referidas a los genes afectados en los mutantes ya observados. En segundo lugar, determinar la distancia génica entre los marcadores usados en el cruzamiento del TP2 (*yellow* y *white*) mediante un abordaje bioinformático basado en el mapeo citogenético de los cromosomas politénicos.

**Introducción**

La bioinformática permite buscar, compilar, ensamblar y analizar datos que ya se encuentran disponibles en bases de datos de manera rápida y eficiente, inclusive acceder a muchos proyectos de genoma que han sido secuenciados en los últimos años

**Base de datos de *Drosophila***

“Flybase” es una base de datos computarizada que contiene información sobre la biología molecular y genética de *Drosophila*. El sitio web es <http://flybase.org>. La información se encuentra actualizada y disponible. Comprende genes, alelos, clones genómicos, secuencias (nucleicas y proteicas), mapeo molecular, transposones, aberraciones cromosómicas, mapeo genético, etc. También incluye un directorio con investigadores, reuniones científicas, técnicas, imágenes, bibliografías, referencias y un listado de líneas stocks de moscas. Compila información de los centros de bases de datos como Berkeley Drosophila Genome Project Data (<http://fruitfly.org>), European Drosophila Genome Data (<http://www.ebi.ac.uk>), y de centros de stocks de líneas de moscas como Bloomington Drosophila Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>), Drosophila Genetic Resource Center (DGRC, Kyoto Stock Center, Japan) (<http://www.dgrc.kit.ac.jp/en/index.html>), información acerca de líneas con inserciones de transposones del proyecto Gene Disruption Project (GDP) (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/>), líneas transgénicas para ARN de interferencia del Vienna Drosophila RNAi Center Stocks (en el IMP, Austria) (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>), colecciones de stocks de *Drosophila* que poseen un transposón que permite etiquetar un gen y reportar su expresión, es decir

deducir el patrón de expresión génico como FlyTrap Stock Collection (GFP protein trap <http://flytrap.med.yale.edu/>), FlyView Stock Collection (Enhancer trap lines <http://flyview.uni-muenster.de/>), y stocks de líneas de *Drosophila* de distintas especies en UC San Diego Drosophila Stock Center (<https://stockcenter.ucsd.edu/info/welcome.php>).

### Mapa citogenético

Como ya se mencionó anteriormente, los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de la larva de *Drosophila* (figura 6) fueron importante en el establecimiento de un mapa citogenético.

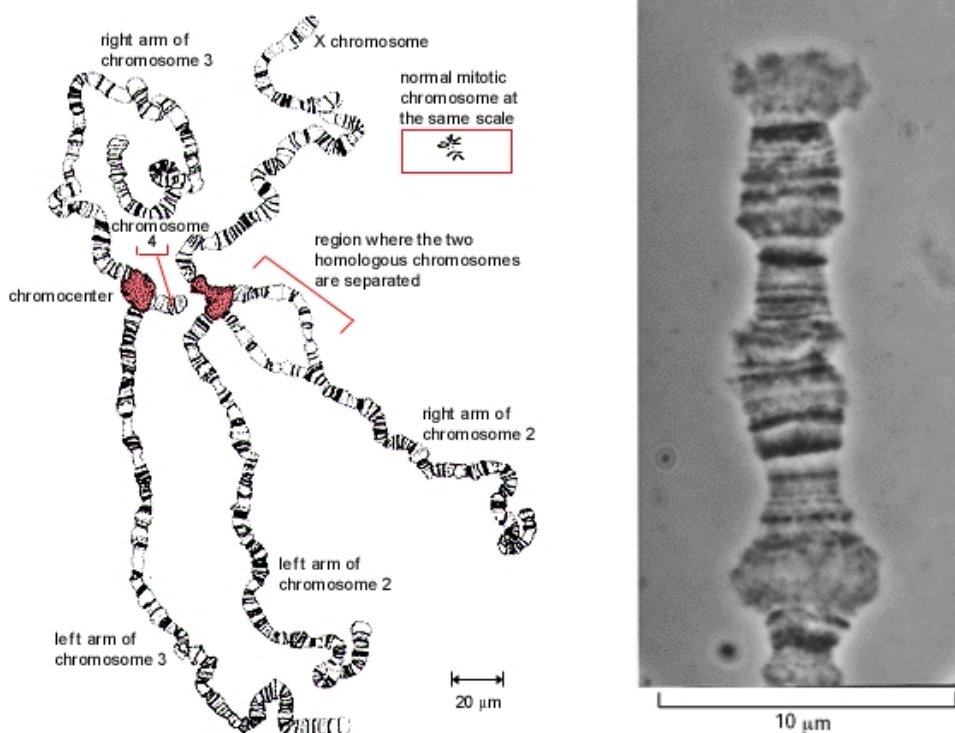


Figura 6: Esquema detallado del conjunto de cromosomas politénicos en célula de glándulas salivares de *Drosophila*. Los cromosomas tienen un patrón de bandeo diferencial. Las bandas corresponden a regiones con elevada concentración de cromatina. Cada par de cromosomas homólogos se encuentra apareados, tal como sucede en meiosis. Los centrómeros de los cromosomas se agregan y conforman el cromocentro. Notar la comparación de escalas con los cromosomas normales en fase mitótica. A la derecha se ilustra una porción de un cromosoma politénico visualizado en el microscopio.

### Desarrollo de la Práctica 3.

-Entrar a la página correspondiente a la base de datos de *Drosophila*: <http://flybase.org>  
-En la sección de búsqueda, entrar el nombre del gen afectado en alguna de las mutantes de *Drosophila* que hayan observado en la práctica.

-Analizar toda la información disponible concerniente al gen en cuestión:

- posición en el genoma (cromosoma, ubicación, genes vecinos)
- banda citogenética (mapeos)
- secuencias de genoma, de mensajero, de proteína
- todos los transcritos y las proteínas que se expresan
- posiciones de las inserciones de los transposones en las distintas líneas mutantes insercionales existentes hasta el momento
- patrón de expresión (órganos/estadios del desarrollo)
- fenotipo que presentan las líneas mutantes (notar la amplia gama de mutaciones que hay para un mismo gen (alelos) y consecuentemente la variedad de mutantes)
- función del gen
- aspecto evolutivo (genes ortólogos)
- stocks de moscas mutantes para ese gen
- referencias

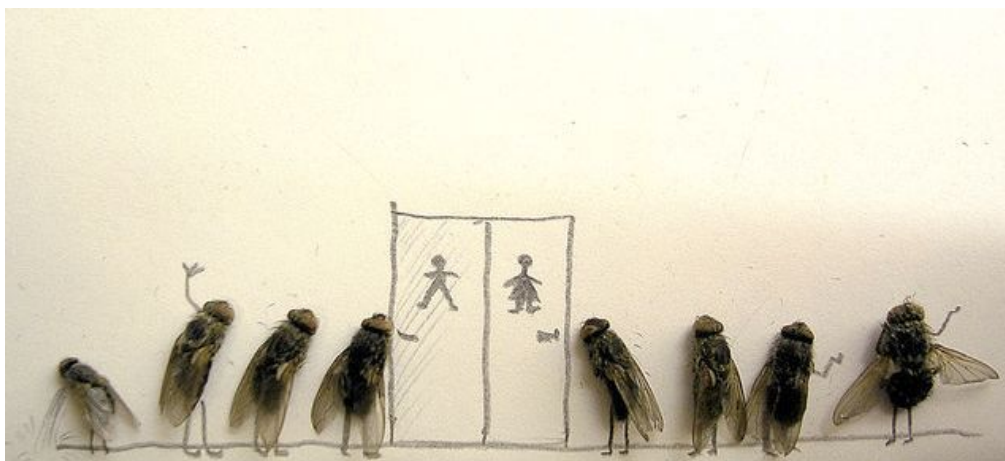
- Entrar en el link de “Flybase Gbrowse”

- Ir al “switch to Chromosome Map”

- Visualizar los cromosomas politénicos, y la posición de cada uno de los genes en este mapa de bandas citogenéticas.

- Los íconos Dmel-A ó Dmel-B permiten ir de un cromosoma ó brazo de cromosoma a otro.

- Determinar la distancia que existe entre los genes *yellow* y *white* en base a la información disponible en el Flybase



**Práctica 4.****ANÁLISIS DE LA PROGENIE DE LOS CRUZAMIENTOS- DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

El objetivo de esta práctica es en primer que el alumno extraiga los resultados del experimento realizado y los analice en base a las herramientas genéticas aprendidas en el curso. Y en segundo lugar, que discuta con otros grupos para contrastar estos resultados.

**Desarrollo de la Práctica 4.**

- Observar el estado del vial y determinar cada uno de los estadios de desarrollo de *Drosophila*. En el caso en que no haya prosperado el cruzamiento, pensar posibles causas.

- Colectar los individuos de la progenie de los cruzamientos realizados en la práctica 2

- Clasificarlos en base al fenotipo y al sexo

- Cuantificar la proporción relativa de cada una de estas categorías. Es decir calcular el número total de moscas de una categoría (fenotipo/sexo) con respecto al total.

Es conveniente cuantificar cada vial por separado ya que si hubo contaminación en algún vial, éste simplemente se descarta. Por contaminación nos referimos a que se encontraron con fenotipos que no eran los esperados. ¿Cuál puede ser la causa de esta contaminación?

- Determinar el genotipo en base al fenotipo.

Con respecto al cruzamiento para realizar el mapeo genético entre *white* y *yellow*, recordar que el macho usado como parental provee cromosomas con alelos recesivos solamente. Entonces el fenotipo que se ve en la progenie se corresponde con la contribución de las gametas maternas porque la masculina no altera el fenotipo, se trata de un cruzamiento de prueba.

Evaluar si los fenotipos de la progenie varían según el sexo, y plantear el esquema del cruzamiento inverso para ese marcador. ¿Está ligado al cromosoma X? ¿Por qué?

- Calcular la distancia genética entre los marcadores *white* y *yellow*. Considerar el conjunto de los datos de todos los grupos y compararlo con los calculados en el TP3. ¿Hay diferencia al considerar los datos de cada grupo por separado con respecto al global? ¿Cómo influye?

- Determinar en qué cromosoma del genoma de *Drosophila* se localiza el elemento P de cada una de las líneas de la colección de mutantes insercionales. Todos los grupos analizan todas las líneas.

- ¿Cómo haría para mapear la ubicación del elemento P dentro del correspondiente cromosoma?



**BIBLIOGRAFÍA**

- Ashburner, Michael, *Drosophila, a Laboratory Manuel*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. (Contains 137 Laboratory protocols for *Drosophila* study, ranging from salivary gland chromosome staining, to karyotyping tissue-culture cells. )
- Griffiths, Anthony et al, *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman and Company, Salt Lake City, Utah, 1996. (This is a good genetics resource text for teachers. It covers DNA, chromosomes, mutations, recombinant technology, population genetics, and developmental genetics, all with a focus on landmark experiments and analysis.)
- Lindsley, Dan, *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press Inc, San Diego, California, 1992. (The bible/dictionary of *Drosophila* genetic elements, a.k.a. “The Red Book”, contains an alphabetized list of all mutants, alleles, and loci current up to the end of 1989. Also contains detailed genetic and chromosomal maps.)
- Greenspan, Ralph, *Fly Pushing, The theory and Practice of Drosophila Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997.
- Venema, Dennis R., *Enhancing Undergraduate Teaching and Research with a Drosophila Virginizing System*, CBE-Life Sciences Education, Vol. 5, 353–360, 2006.

**AGRADECIMIENTO**

Dra. Fernanda Ceriani – Laboratorio Genética del comportamiento, Fundación Instituto Leloir- Buenos Aires- por suministrar las líneas de *Drosophila* y el equipamiento necesario para llevar a cabo el práctico