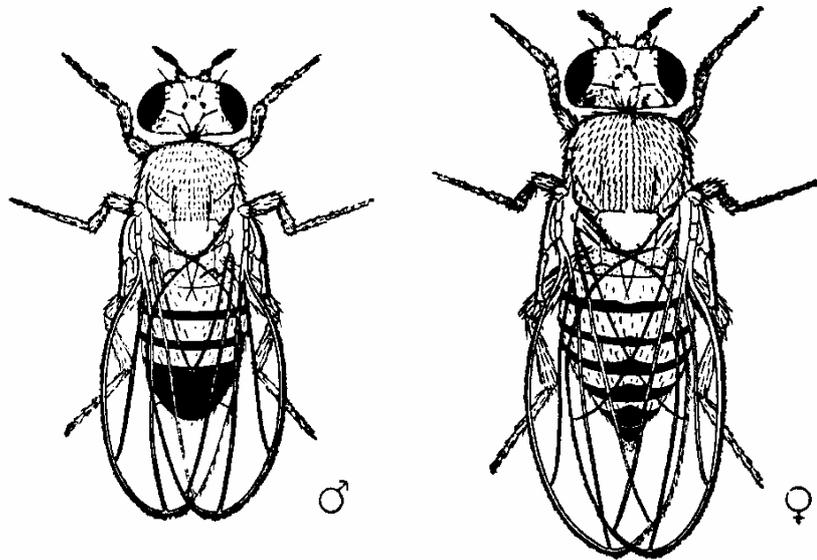


Prácticas de laboratorio de:

GENÉTICA (Grado en Biotecnología)



Departament de Genètica
Facultat de Ciències Biològiques

CURSO 2011-2012

PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA

Duración:

Cinco sesiones de aprendizaje y una sesión examen de 2 h/c.u.

Contenido:

Se realizarán dos prácticas, una sobre la “**Segregación de Caracteres**” utilizando *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, y otra sobre “**Cromosomas Politénicos**” utilizando *Drosophila subobscura*. Ambas prácticas estarán imbricadas en el tiempo para optimizar las sesiones de laboratorio.

Práctica 1: Segregación de Caracteres (observación de la segregación independiente frente a la segregación de genes ligados).

Objetivos didácticos:

- 1) Aprender el manejo de un organismo experimental, en concreto, *D. melanogaster*.
- 2) Aprender a realizar cruzamientos en *D. melanogaster*.
- 3) Aprender el uso de la lupa binocular.
- 4) Observar el resultado de la uniformidad de la generación filial cuando se cruzan líneas puras.
- 5) Observar el resultado de una segregación independiente frente a una segregación de genes ligados.
- 6) Aplicar el análisis estadístico a los resultados experimentales (prueba de χ^2).

Material: Lupas y 4 cepas mutantes de *D. melanogaster* (pupas y adultos).

Práctica 2: Cromosomas Politénicos (preparación y observación de cromosomas politénicos, así como de inversiones cromosómicas).

Objetivos didácticos:

- 1) Aprender el uso del microscopio mediante la observación de preparaciones de cromosomas politénicos de *D. subobscura*.
- 2) Observación de inversiones cromosómicas.
- 3) Aprender a preparar cromosomas politénicos a partir de glándulas salivares de larvas.

Material: Microscopios y lupas, tubos con *D. subobscura* con inversiones en heterocigosis (larvas último estadio) y material de disección y tinción.

Desarrollo de las sesiones de prácticas:

Se realizarán en 5 sesiones semanales consecutivas de 2 horas/c.u.

1ª semana: Empezar la primera práctica. Presentación del organismo experimental y explicación del uso de la lupa binocular. Realización de dos cruces por pareja (se trabajará con 4 cepas portadoras de una mutación recesiva cada una. Se realizará el cruce de una de ellas con otras dos, de tal manera que un cruce será entre genes ligados y el otro no) (2 h).

2ª semana: Respecto a la primera práctica, matar generación parental (0.5 h).

Empezar segunda práctica. Explicación de la utilización del microscopio y observación de preparaciones de cromosomas politénicos para detectar inversiones (1.5 h).

3ª semana: Respecto a la primera práctica, observación de las F_1 , interpretación del resultado y realización de un nuevo cruce entre machos y hembras de la F_1 (1 h). Desarrollo teórico de los resultados esperados de los distintos cruces (1 h).

4ª semana: Respecto a la primera práctica, matar generación F_1 (0.25 h).

Respecto a la segunda práctica, disección de larvas, preparación de cromosomas politénicos y observación (1.75 h).

5ª semana: Respecto a la primera práctica, recuento de la F_2 e interpretación de los resultados (el análisis estadístico se realizará en casa y se entregarán junto con el resumen) (1 h).

Respecto a la segunda práctica, se continuará practicando la preparación de cromosomas politénicos (1 h).

Evaluación práctica: Se realizará en una de las semanas siguientes a las anteriores sesiones de laboratorio, y consistirá en la preparación individual de cromosomas politénicos y en la realización de un cruce (pupas hembras y machos adultos).

Nota: Los fenotipos de las cepas que se cruzan serán lo suficientemente visibles para que el profesor no tenga que utilizar la lupa para observar el resultado (simplemente observar el fenotipo de las hembras y de los machos, así como el porcentaje de supervivientes entre los parentales).

Sistema de evaluación:

Se realizará la evaluación del aprovechamiento del aprendizaje en el laboratorio. Esto se hará evaluando la asistencia y presentación de un **resumen** de los resultados de las prácticas y **análisis** de los resultados (5% de la nota total) y un **examen** en el laboratorio que consistirá en realizar un cruzamiento entre dos cepas de *Drosophila* y una preparación de cromosomas politénicos (5% de la nota total). El valor de la nota de laboratorio será el **10%** del total de la asignatura.

PARTE I

Segregación de caracteres en *Drosophila* *melanogaster*

Introducción al organismo modelo

Drosophila melanogaster

Razones para el uso de *Drosophila*:

Hay muchas razones que hacen de *D. melanogaster* (Figura 1) un organismo idóneo para la experimentación:

- Es muy abundante y de fácil captura.
- Se cultiva fácilmente en el laboratorio.
- Produce gran cantidad de descendientes (adecuado para comprobar las proporciones mendelianas).
- A 25°C se completa el ciclo biológico en 10-11 días.
- Solamente posee 4 pares de cromosomas.
- Tiene cromosomas gigantes en las glándulas salivares y otros tejidos de la larva, lo que facilita su observación microscópica.
- Se trabaja con ella desde 1905 y por lo tanto se dispone de una abundante bibliografía.
- Hay una gran cantidad de mutantes, tanto naturales como inducidos, y muchas cepas especiales que permiten cuidadosos análisis genéticos.



Fig. 1: Macho adulto de *Drosophila melanogaster*.

Medios de cultivo:

Las moscas en estado salvaje se alimentan de levaduras que fermentan los jugos de las plantas. Para la captura de individuos en la naturaleza se puede preparar una papilla con plátano machacado, harina y levadura de pan.

En el laboratorio *Drosophila* puede cultivarse en botellas estériles con una comida preparada a base de harina de maíz, azúcar, levadura y agar como espesante. Para evitar contaminaciones se añade un fungicida, normalmente Nipagin (metil p-oxibenzoato), y un bactericida (ácido propiónico).

Una vez solidificada se le añade levadura picada (para proporcionar una fuente de proteínas a las larvas) y un papel en zigzag (para que absorba la humedad y como superficie para la pupación). Estos frascos se tapan con un algodón esterilizado y se indica la fecha y el tipo de cepa o cruce cultivado en la botella.

La temperatura óptima de cultivo es de 25°C. A esta temperatura el ciclo biológico se completa en 10-11 días. A temperaturas superiores se producen fenómenos de esterilidad y muerte, a temperaturas inferiores el desarrollo es muy lento.

Observación de los individuos:

Para facilitar su estudio conviene anestesiarse las moscas, especialmente para evitar escapes. Aunque existen varios métodos para anestesarlas (éter, CO₂, frío, etc.), utilizaremos el éter que, aunque peligroso, es el más efectivo (Fig. 2).

Metodología a seguir:

Se toma el frasco donde se encuentran los adultos y se golpea suavemente en un corcho para que caigan hacia el fondo. Se retira el algodón y se vuelca el frasco sobre el eterificador. El eterificador (una botella o tubo de vidrio) se tapa con un algodón impregnado de éter. Cuando las moscas están dormidas se vuelcan sobre un papel y se observan con la lupa. El tiempo que tardan las moscas en dormirse es muy variable, y depende bastante de la edad (cuanto más viejas son, antes se duermen).



Fig. 2: Equipo para la observación de *D. melanogaster*.

Consejos prácticos:

1.- Hay que tener cuidado, pues una exposición prolongada al éter les puede producir **la muerte** (se reconoce porque las alas se disponen perpendicularmente al cuerpo).

2.- Hay que cuidar no mantener abierta la botella del cultivo, para evitar que las moscas se **escapen** o que entren otras y el cultivo se **contamine**.

3.- No dejar abierto el eterificador ni la botella de éter, ya que además de evaporarse, por su bajo punto de ebullición y cargar el ambiente, hay peligro de **explosión**, ya que es altamente **inflamable**. Por lo tanto, **no pueden haber mecheros encendidos** en el laboratorio durante las prácticas con éter.

4.- Antes de eterificar de nuevo, nos hemos de asegurar de que no quedan moscas en el fondo del eterificador.

5.- Si durante una observación o recuento las moscas empiezan a despertarse, se pueden reeterificar, con cuidado de no matarlas.

6.- Para facilitar la observación de los individuos es recomendable alinear todas la moscas sobre la cartulina, pasando la hilera bajo el foco de la lupa. Así se pueden ir separando según nuestro interés.

7.- Cuando se devuelven las moscas dormidas a un frasco con comida, se ha de procurar que éste esté horizontal, para que no se peguen y mueran. La botella no se colocará en posición vertical hasta que estén despiertas. Otro método consiste en meter las moscas en un pequeño cucurucho de papel, que a su vez se mete en el frasco.

8.- Una vez finalizada la observación, los individuos que no nos interesen se introducirán en un frasco (**MORGUE**) que contiene aceite o una mezcla H₂O:EtOH:éter, para evitar la descomposición de las moscas.

Diferenciación entre sexos:

Esta especie presenta un claro dimorfismo sexual (Fig. 3):

Características de las hembras:

- 1.- Abdomen acabado en punta y más grueso que el del macho.
- 2.- Dorso del abdomen con bandas transversales oscuras y separadas unas de otras hasta el final del mismo.

Características de los machos:

- 1.- Menor tamaño que las hembras.
- 2.- Extremo del abdomen redondeado.
- 3.- Las últimas bandas transversales del abdomen están fusionadas, lo que da una apariencia oscura al final del mismo, visible a simple vista.
- 4.- Poseen un *peine sexual* (quetas modificadas) en el primer segmento tarsiano del primer par de patas (Fig. 3).

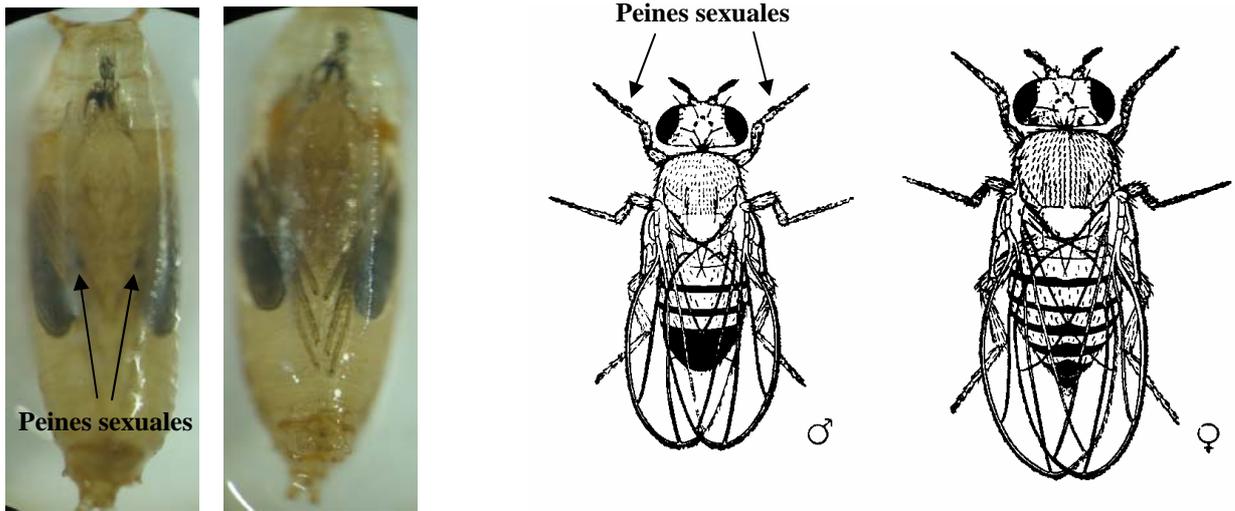
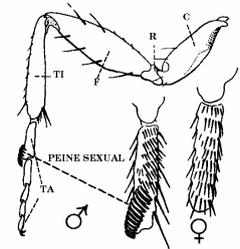


Fig. 3.- Macho (izquierda) y hembra (derecha) de *D. melanogaster* en estado de pupa e imago, y detalle de la pata delantera de un macho en la que se puede apreciar el peine sexual.



Obtención de hembras vírgenes:

Las hembras de *D. melanogaster* almacenan el esperma de una sola inseminación durante gran parte de su vida reproductiva. Esto supone un inconveniente cuando se trata de realizar estudios genéticos en los cuales es preciso realizar cruces entre genotipos determinados, y por tanto es necesaria la utilización de hembras vírgenes:

Las hembras se pueden separar de los machos en el estado de pupa madura, ya que en este estado se pueden distinguir los peines sexuales de los machos como dos puntos entre las manchas de las alas. Las pupas se pueden extraer de la botella con un pincel húmedo, colocándose sobre la cartulina. Las pupas sin los puntos oscuros serán hembras, y se pondrán en un tubo aparte. A las 24 horas ya habrán emergido, y si no hemos confundido ningún macho entre ellas, serán vírgenes y estarán listas para ser utilizadas en cruzamientos.

Estudio del fenotipo silvestre de *D. melanogaster* :

Se llama así el fenotipo normal que no manifiesta ningún gen mutante. Hay cepas de laboratorio que se toman como estándar del fenotipo silvestre, en las que se sabe con certeza el genotipo, como por ejemplo, *Oregon R*, *Canton-S*, etc. El ciclo biológico se muestra en la Fig. 4:

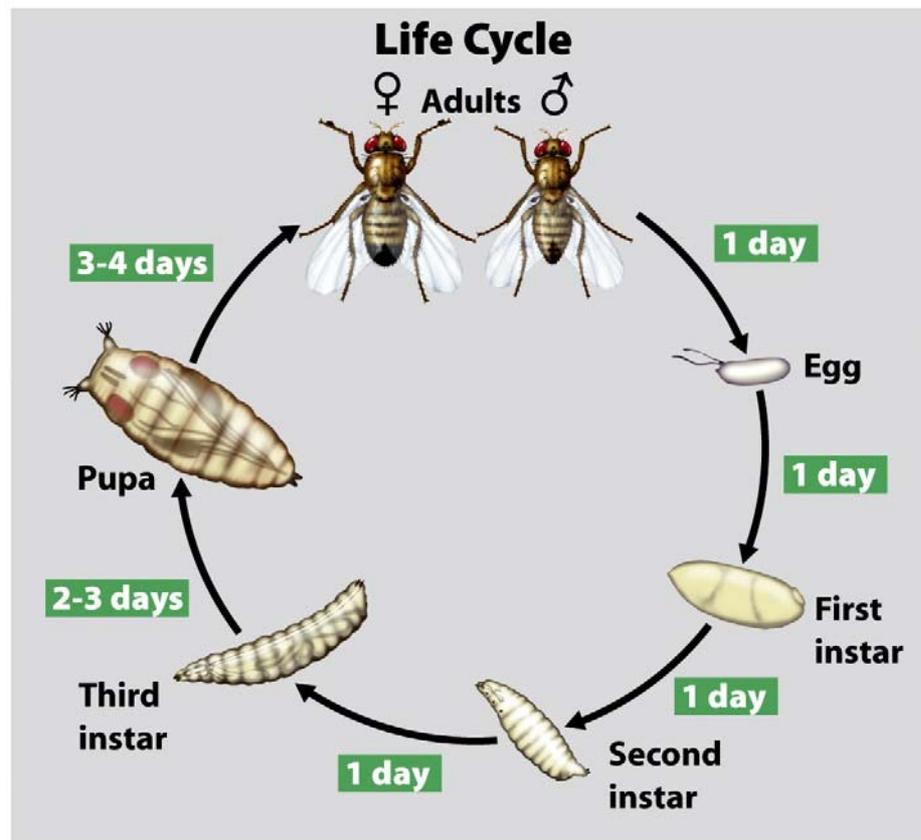


Fig. 4.- Ciclo de vida de *D. melanogaster*. Los distintos tiempos se refieren a un cultivo mantenido a 25°C (ilustración tomada del libro *Genética: Un enfoque conceptual*, de Pierce, 3ª ed.).

HUEVO.- Sus dimensiones son 0.19 x 0.50 mm y su peso de 10^{-5} g. Es de color blanco y recubierto de una gruesa envoltura llamada corión, con unos pequeños apéndices en el extremo superior que le sirven para flotar en un medio líquido. A las 22 horas, a una temperatura de 25°C, emerge la larva.

LARVA.- Es la fase de crecimiento. De color blanco, vive en la papilla en la cual perfora canales. Las glándulas salivares de la larva producen jugo gástrico y también unas secreciones que utiliza el insecto para adherirse a la pared de la botella cuando va a pupar. Tiene tres estadios larvarios, con dos mudas.

PUPA.- Cuando la larva se prepara para pupar, se aleja de la humedad del medio de cultivo y sube por las paredes de la botella hasta una zona relativamente seca en donde se fija. La larva pupa dentro de su última piel, que al principio es blanca y flexible (estado de prepupa, en el cual ya se observan los espiráculos), endureciéndose (estado de pupa blanca) y haciéndose más oscura con el tiempo (pupa madura). Inmediatamente después de pupar, los tejidos de la larva se histolizan, y unas estructuras embrionarias, denominadas discos imaginales, crecen y producen secciones del organismo adulto.

IMAGO.- Comienza esta fase al emerger la mosca de la envoltura de la pupa. Suele medir de 2 a 3 mm de longitud y pesar de 0.8 a 1.5 mg, según sea macho o hembra, respectivamente. Recién salido de la pupa, el adulto está despigmentado, y no se pigmenta hasta unas tres o cuatro horas después. Así mismo, tiene las alas plegadas, desplegándolas una hora después. Hacia las 6 horas ya ha alcanzado la madurez sexual.

Práctica 1: Segregación de Caracteres

OBJETIVO GENERAL:

Estudio del modo de herencia de caracteres en *Drosophila melanogaster*, comparando las diferencias entre la segregación independiente y la segregación de genes ligados.

Objetivos didácticos:

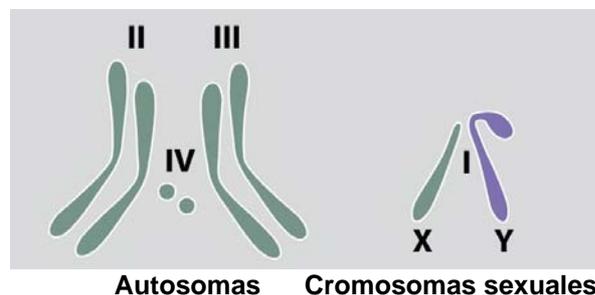
- 1) Aprender el manejo de un organismo experimental, en concreto, *D. melanogaster*.
- 2) Aprender a realizar cruzamientos en *D. melanogaster*.
- 3) Aprender el uso de la lupa binocular.
- 4) Observar el resultado de la uniformidad de la generación filial cuando se cruzan líneas puras.
- 5) Observar el resultado de una segregación independiente frente a una segregación de genes ligados.
- 6) Aplicar el análisis estadístico a los resultados experimentales (prueba de χ^2).

MATERIAL REQUERIDO:

Lupas y 4 cepas mutantes de *D. melanogaster* (pupas y adultos).

INTRODUCCIÓN:

Drosophila melanogaster tiene tres pares de autosomas (cromosomas 2, 3 y 4) y un par de cromosomas sexuales (cromosomas X e Y). La determinación del sexo en este organismo es XX para las hembras y XY para los machos. Los cromosomas 2 y 3 son metacéntricos y el 4 es puntiforme. El cromosoma X es telocéntrico y el Y acrocéntrico.



Esta práctica debe resolverse como si se tratara de un problema de Genética.

A partir de los resultados de las generaciones F_1 y F_2 hay que proponer una hipótesis sobre el tipo de herencia de los dos caracteres usados en cada cruce y confirmarla o rechazarla utilizando el estadístico de χ^2 . Es importante tener en cuenta que en los machos de *D. melanogaster* no se da el fenómeno de entrecruzamiento entre cromosomas homólogos.

Hay cinco tipos posibles de cruzamientos (descartando aquellos que incluyan genes del cromosoma Y, y suponiendo que todos los alelos mutantes sean recesivos), los cuales son:

- 1) cruzamiento entre cepas portadoras de genes mutantes del cromosoma X.
- 2) cruzamiento entre cepas portadoras de genes mutantes autosómicos ligados.
- 3) cruzamiento entre cepas portadoras de genes mutantes autosómicos no ligados.
- 4) cruzamiento entre una hembra portadora de un gen mutante en el cromosoma X y un macho con un gen mutante autosómico.
- 5) cruzamiento entre una hembra portadora de una mutación autosómica y un macho portador de un gen mutante del cromosoma X.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

1ª semana: Familiarización con el organismo experimental y del material de observación (lupa binocular). Realización de dos cruces por pareja utilizando 4 cepas portadoras de una mutación recesiva cada una. Se realizará el cruce de una de ellas con otras dos (transferir al frasco de cultivo pupas hembras de una de las cepas y machos adultos de la otra, de 3 a 4 parejas). Tiempo previsto: 2 h.

2ª semana: Eliminar los adultos de la generación parental para que no se mezclen con la descendencia. Tiempo previsto: 0.5 h.

3ª semana: Observación de las F_1 , anotación e interpretación del resultado y realización de un nuevo cruce entre machos y hembras de cada F_1 (3 a 4 parejas). Desarrollo teórico de los resultados esperados de los distintos cruces. Tiempo previsto: 2 h.

4ª semana: Eliminar los adultos de la generación F_1 para que no se mezclen con los de la F_2 . Tiempo previsto: 0.25 h.

5ª semana: Recuento de los distintos fenotipos de las F_2 (teniendo en cuenta el sexo por si este dato fuera necesario), anotación e interpretación de los resultados. Tiempo previsto: 1 h.

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS:

El día de la evaluación de las prácticas de laboratorio, el alumno presentará un resumen de la práctica en el que figure:

- a. El desarrollo teórico de los cinco tipos de cruzamientos posibles, calculando las segregaciones fenotípicas obtenidas en la F_1 y en la F_2 de cada cruzamiento. En los cruzamientos entre cepas portadoras de genes mutantes situados en el mismo cromosoma, se calcularán las proporciones fenotípicas obtenidas en la F_2 para el caso de que estén separados por una distancia de 20 cM.
- b. Los datos observados en las F_2 se compararán estadísticamente con los esperados para aquellas hipótesis que el alumno considere posibles.

PARTE II

Cromosomas politénicos de *Drosophila* *subobscura*

Introducción a la politenia y los cromosomas politénicos de *Drosophila*

Cuando en el ciclo de división celular se modifica la alternancia normal de las fases S y M, de manera que después de una mitosis se producen dos períodos de síntesis sucesivos, tiene lugar el fenómeno de la endorreduplicación. Un caso extremo de la misma es la politenia, proceso en el que se produce un número elevado de rondas sucesivas de replicación (5, 10 o más) dando lugar a los llamados cromosomas gigantes o cromosomas politénicos que están constituidos por 2^n cromátidos (siendo n el número de rondas de replicación). Así, por ejemplo, en las glándulas salivales de varias especies de *Drosophila* la replicación se produce durante diez rondas sucesivas, es decir, que cada cromosoma tiene $2^{10} = 1.024$ cromátidos.

Los cromosomas politénicos se mantienen en interfase; por tanto son cromosomas somáticos interfásicos en los que las cromátidas permanecen descondensadas (como corresponde a la interfase) por lo que la longitud del cromosoma es entre 100 y 200 veces la del cromosoma mitótico correspondiente. Como las numerosas copias de cada cromosoma permanecen unidas y, además, los cromosomas homólogos tienden a estar apareados, la politenia produce un grosor total que es unas diez veces el de los cromosomas metafásicos. Todo ello los hace perfectamente analizables con microscopia óptica a pesar de tratarse de cromosomas interfásicos.

La politenia no es una anomalía del ciclo celular, sino que se considera un mecanismo de amplificación génica dentro de un proceso de citodiferenciación. Este sistema permite a los organismos disponer de una línea germinal con un contenido de ADN relativamente bajo, con las ventajas que ello conlleva respecto a replications rápidas y ciclos celulares cortos, pero con la capacidad de multiplicar el genoma (o partes de él) en líneas celulares específicas.

Los cromosomas politénicos fueron descubiertos por Balbiani (1881), pero su significado no fue comprendido hasta mediados de los años treinta en que fueron analizados en las glándulas salivales de las larvas de los dípteros. Posteriormente, se observaron en otros tejidos u órganos de las larvas (epitelio intestinal, tubos de Malpigio, etc) y en otros organismos, por ejemplo en el macronúcleo de protozoos ciliados, glándulas de la seda de *Bombix mori*, glándulas salivales de insectos colémbolos y también en distintos tejidos vegetales. De todas formas los organismos más favorables para la observación de los cromosomas politénicos son los dípteros, por lo que los cromosomas politénicos mejor conocidos son los de las glándulas salivales de las larvas de *Drosophila* y *Chironomus*.

Cuando se estudia el desarrollo de las larvas de *D. melanogaster* se observa la formación de las glándulas salivales por divisiones celulares e invaginaciones del blastodermo hasta alcanzar un número aproximado de 125 células cada glándula. A partir de este momento, que coincide con el periodo de eclosión de la larva, las células ya no se dividen más y comienzan a aumentar de tamaño como consecuencia del proceso de endorreproducción que origina los cromosomas politénicos.

Los cromosomas politénicos muestran un patrón de bandas típico, producido por la alternancia de regiones condensadas (bandas) y regiones descondensadas (interbandas). Esta organización es consecuencia del alineamiento exacto de las cromátidas en los cromosomas de forma que las regiones de fuerte empaquetamiento de las cromátidas individuales (correspondientes a cromómeros) tienen la apariencia de bandas, alternándose con las interbandas (Fig. 1).

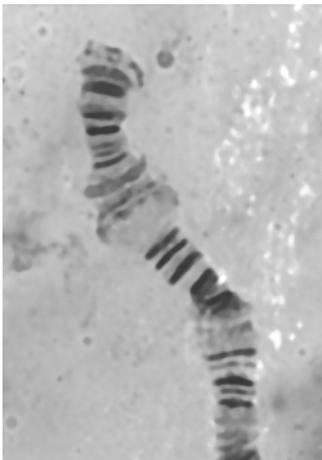
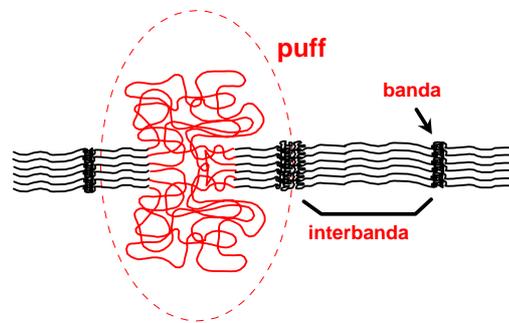


Fig. 1. Fotografía de un cromosoma politénico de *Drosophila* y detalle de su morfología.



En *Drosophila*, los cromosomas politénicos aparecen unidos en una zona central, denominada cromocentro, que se interpreta como la fusión de las regiones pericentroméricas heterocromáticas. En otros géneros de dípteros, como *Chironomus*, no aparece cromocentro de manera que los cromosomas politénicos se presentan sueltos (Fig. 2).



Figura 2. Cromosomas politénicos (a) de *Drosophila melanogaster* mostrando la presencia del cromocentro, (b) de *Chironomus thummi*, sin cromocentro.

El apareamiento de los brazos homólogos es tan íntimo que suele ser difícil distinguir un brazo del otro; sin embargo, en ocasiones se produce la falta de apareamiento en regiones homólogas de los cromosomas politénicos (Fig. 3).



Fig. 3. Sección de cromosoma O de *D. subobscura* (cepa K228) que presenta una zona desapareada entre los homólogos.

Una vez establecido que el patrón de bandas que presentan los cromosomas politénicos es característico para cada especie, se pudieron construir mapas citológicos muy precisos, en los cuales cada banda cromosómica quedaba identificada por una letra y un número (Fig. 4). Estos mapas permiten la localización de reordenaciones cromosómicas que producen alteraciones del patrón de bandas. En *D. melanogaster*, muchas de estas reordenaciones cromosómicas se han podido asociar a mutantes fenotípicos determinados, facilitándose la correlación entre mapas citológicos y mapas genéticos. Actualmente, la posición exacta de genes concretos en el mapa citológico puede determinarse mediante la técnica de hibridación "in situ".

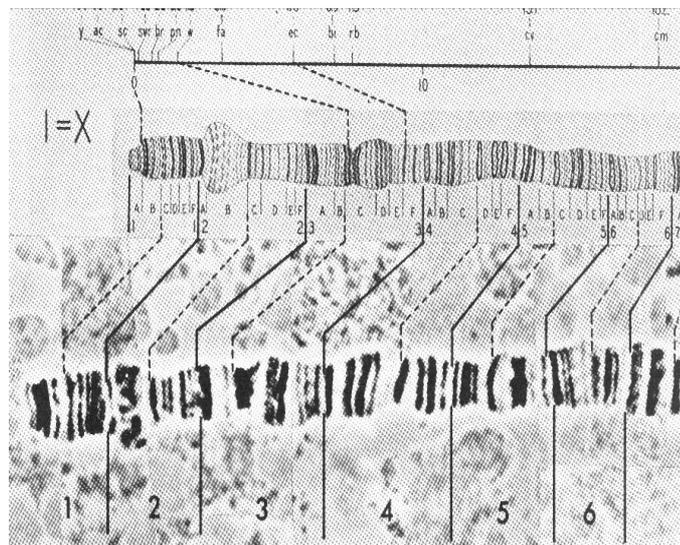


Fig. 4. Mapa genético, mapa citológico y fotomapa de las seis primeras regiones del cromosoma X de *D. melanogaster*.

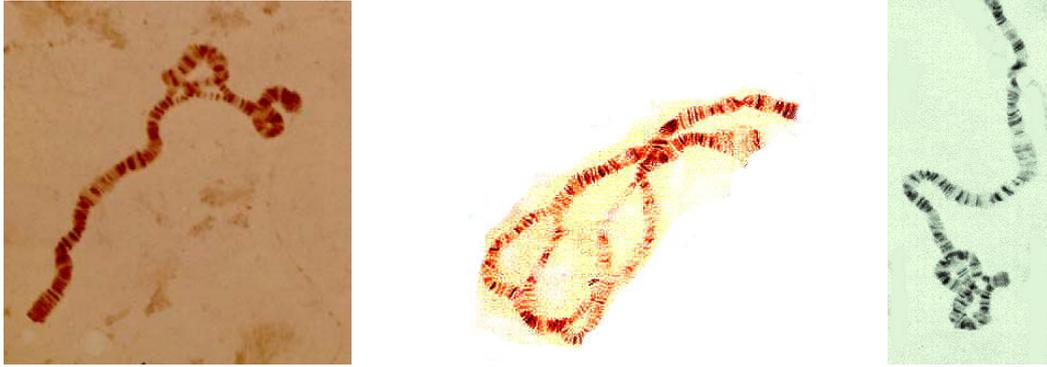


Figura 5: Cromosomas politénicos de *Drosophila subobscura* de individuos heterocigóticos para inversiones compuestas.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

1ª sesión (2ª semana): Explicación de la utilización del microscopio y observación de preparaciones de cromosomas politénicos para detectar inversiones. Tiempo previsto: 1.5 h.

2ª sesión (4ª semana): Disección de larvas, preparación de cromosomas politénicos y observación. Tiempo previsto: 1.75 h.

3ª sesión (5ª semana): Se continuará practicando la preparación de cromosomas politénicos. Tiempo previsto: 1 h.

METODOLOGÍA:

1. Colocar una larva limpia en un portaobjetos con una gota de NaCl al 0,6%. Situar el porta sobre la plataforma de la lupa. Como puede observarse en la figura 6, las glándulas salivales se encuentran unidas entre sí por la parte anterior en un conducto único que se comunica con la faringe.

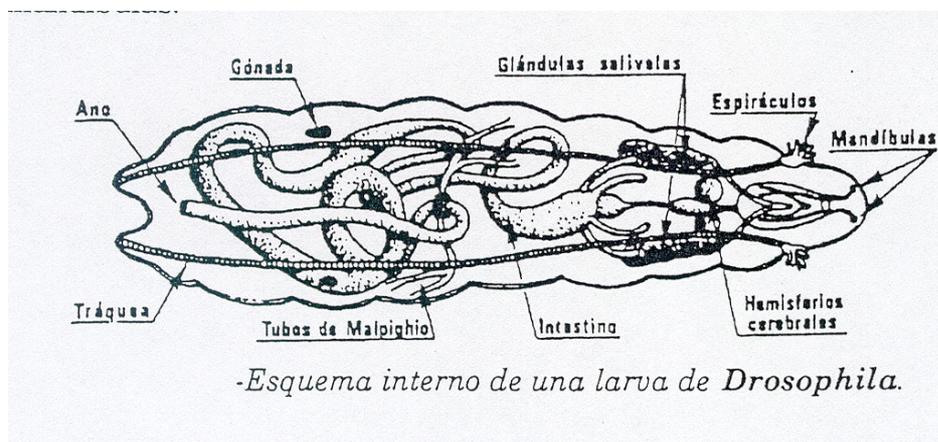


Figura 6: Esquema interno de una larva de *Drosophila*.

Para extraer las glándulas, se sujeta la parte posterior de la larva con unas pinzas y se decapita con una aguja enmangada (Fig. 7). Las glándulas aparecerán como dos saquitos transparentes, situados a ambos lados del esófago, y unidos a tejido graso.

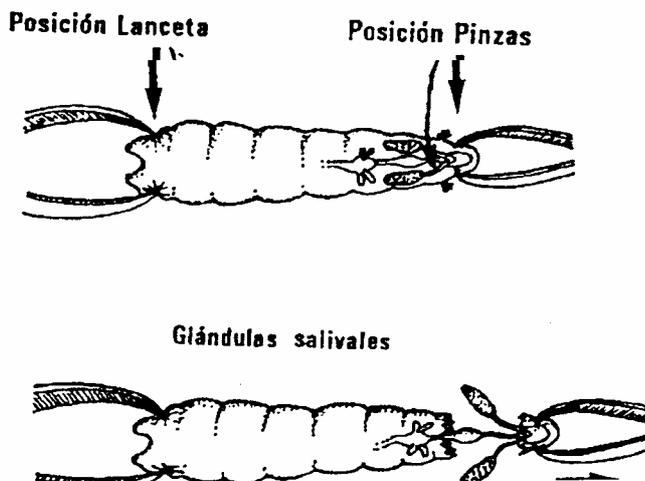


Figura 7: Esquema de la extracción de las glándulas salivales de una larva de *Drosophila*.

2. Aislar las glándulas lo mejor posible pero con cuidado de no dañarlas. No es excesivamente problemático el hecho de que quede un poco de tejido graso adherido.
3. Transferir las glándulas a una gota de colorante (orceína acético-láctica) y mantenerlas durante 25 minutos. Este tiempo se determina empíricamente y depende de la marca de colorante y de la cepa utilizada. Es necesario que las glándulas permanezcan cubiertas por el colorante ya que, de no ser así, se secarán y se estropeará el material.
4. Tras la tinción, cubrir la preparación con un cubreobjetos y dar unos golpes suaves con la punta de la aguja enmangada para que las células se separen. A continuación, cubrir la preparación con papel absorbente y hacer presión sobre el cubreobjetos, evitando que éste se mueva, para que los cromosomas se extiendan y queden perfectamente aplanados.

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS:

El día de la evaluación de las prácticas de laboratorio, el alumno presentará un resumen de la práctica en el que figure un esquema de lo que ha obtenido en sus preparaciones.