

Genètica i Citogenètica

PRÀCTIQUES DE LABORATORI

CURS 2013-14



Departament de Genètica

Professors: María José Martínez, Inmaculada García Robles, Javier Terol

PROGRAMA DE CLASSES PRÀCTIQUES DE LABORATORI

Temes	Hores
PRÀCTICA 1. Segregació de caràcters en <i>Drosophila</i>. Observació de la segregació independent enfront de la segregació de gens lligats. Aplicació de l'anàlisi estadística als resultats experimentals. Càlcul de la distància entre gens lligats.	7.5
PRÀCTICA 2. Cromosomes politènics de <i>Drosophila</i>. Preparació i observació de cromosomes politènics. Detecció i estudi d'inversions cromosòmiques.	4.5
PRÀCTICA 3. Aspectes citogenètics dels cromosomes sexuals: cromatina sexual. Preparació i observació d'extensions de cèl·lules de la mucosa bucal. Identificació de corpuscles de Barr. Comparació entre cèl·lules masculines i femenines.	2
TOTAL	14

Pla de treball

- Setmana 14 de octubre: Cromosomes politènics (P2)
- Setmana 21 de octubre: Realitzar preparacions de cromosomes politènics (P2)
- Setmana 4 de novembre: *Drosophila* (P1 Matar pares (P1). Encreuament parental (P1)
- Setmana 11 de novembre: Matar pares (P1). Observació de les preparacions de cromosomes politènics (P2)
- Setmana 18 de novembre: Observar F1 i encreuament per a F2 (P1)
- Setmana 25 de novembre: Cromatina sexual (P3)
- Setmana 9 de desembre: Recompte de F2 (P1) i Anàlisi de resultats (P1)

PRÀCTICA 1.- Segregació de caràcters en *Drosophila*

Objectiu de la pràctica

L'objectiu central d'aquesta pràctica és l'estudi del mode d'herència de caràcters en *Drosophila melanogaster*, comparant les diferències entre la transmissió de gens lligats i de gens segregació independent. Per això necessitarem aprendre en primer lloc el maneig de l'organisme experimental, *D. melanogaster*, i l'ús de la lupa binocular.

Drosophila melanogaster com a organisme model

Hi ha moltes raons que fan de *D. melanogaster* un organisme idoni per a l'experimentació en Genètica:

- És molt abundant en la natura, de fàcil captura i es manté fàcilment al laboratori.
- El seu cicle biològic es completa en 10-11 dies a 25°C, i produeix gran quantitat de descendents, cosa que en fa una espècie molt adequada per a comprovar les proporcions mendelianes.
- Solament té 4 parells de cromosomes. A més a més, en les glàndules salivals i altres teixits de la larva aquests cromosomes són gegants, la qual cosa facilita la seua observació al microscopi.
- Es treballa amb ella des de principis del segle XX i, per tant, es disposa d'una abundant bibliografia, d'una gran quantitat de mutants, naturals i induïts, i de moltes soques especials que permeten anàlisis genètiques prou detallades.

Medis de cultiu

Les mosques en estat salvatge s'alimenten de llevats que fermenten els sucres de les plantes. Per capturar individus en la naturalesa es poden preparar unes farinetes amb plàtan aixafat, farina i llevat de pa.

En el laboratori, la *Drosophila* pot mantenir-se en ampolles estèrils amb un menjar preparat a base de farina de dacsa, sucre, llevat i agar com a espessidor. Per evitar contaminacions, s'hi afegeix un fungicida, normalment nipagin (metil p-hidroxibenzoic), i un bactericida (àcid propiònic).

Un cop solidificada, se li afegeix llevat picat (per proporcionar una font de proteïnes a les larves) i un paper en zig-zag (perquè absorbisca la humitat i com a superfície per a la pupació). Aquests flascons es tapen amb un cotó esterilitzat i s'indica la data i el tipus de soca o encreuament que es manté en el tub o en l'ampolla.

La temperatura òptima de cultiu és de 25°C. A aquesta temperatura, el cicle biològic es completa en 10-11 dies. A temperatures superiors, es produeixen fenòmens d'esterilitat i mort, a temperatures inferiors, el desenvolupament és molt lent.

Cicle biològic

El cicle biològic de *D. melanogaster* a 25° C es mostra en la Fig. 1:

Ou.- Les seues dimensions són 0,19 x 0,50 mm i el seu pes és de 10⁻⁵ g. És de color blanc i recobert d'un gruixut embolcall anomenat cori, amb uns petits apèndixs en l'extrem superior que li serveixen per surar en un medi líquid. A les 22 hores, a una temperatura de 25°C, emergeix la larva.

Larva.- És la fase de creixement. De color blanc, viu a les farinetes, en les quals perfora canals. Les glàndules salivals de la larva produeixen suc gàstric i també unes secrecions que utilitza l'insecte per adherir-se a la paret de l'ampolla quan va a pupar. Té tres estadis larvaris, amb dues mudes.

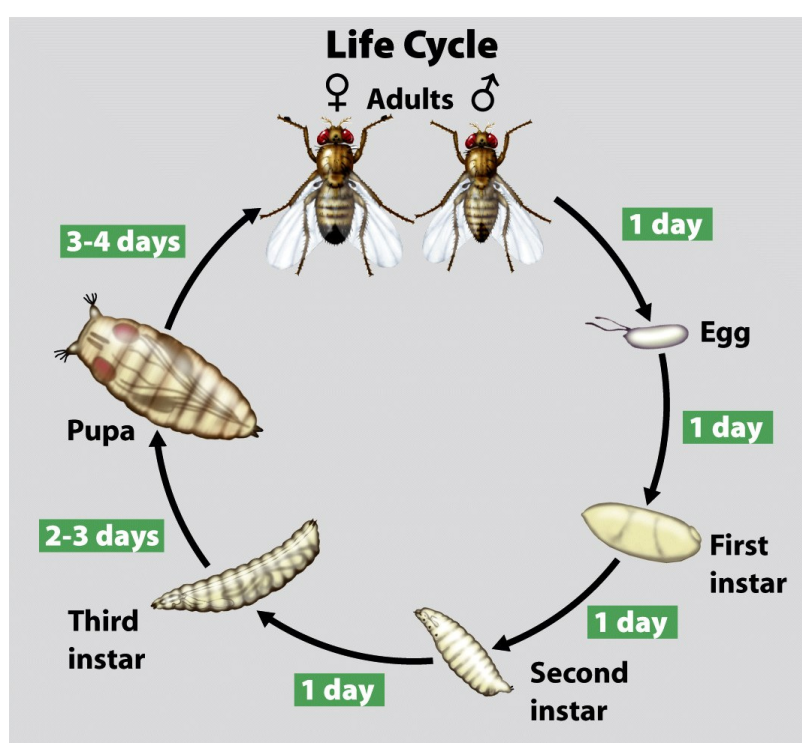


Fig. 1. Cicle de vida de *D. melanogaster*. Els diversos temps es refereixen a un cultiu mantingut a 25°C (il·lustració extreta del llibre *Genética: Un enfoque conceptual*, de Pierce, 3ª ed.).

Pupa.- Quan la larva es prepara per pupar, s'allunya de la humitat del medi de cultiu i puja per les parets de l'ampolla fins a una zona relativament seca on s'enganxa. La larva pupa dins de la seua última pell, que al principi és blanca i flexible (estat de prepupa, en el qual ja s'observen els espiracles), s'endureix (estat de pupa blanca) i es fa més fosca amb el temps (pupa madura). Immediatament després de pupar, els teixits de la larva s'histolitzen, i unes estructures embrionàries, denominades discos imaginals, creixen i produeixen seccions de l'organisme adult.

Imago.- Comença aquesta fase quan la mosca emergeix de l'embolcall de la pupa. Sol fer de 2 a 3 mm de longitud i pesar de 0,8 a 1,5 mg, segons siga mascle o femella, respectivament. Acabat de sortir de la pupa, l'adult està despigmentat, i no

es pigmenta fins a unes tres o quatre hores després. Així mateix, té les ales plegades i les desplega una hora després. Cap a les 6 hores ja ha arribat a la maduresa sexual.

Observació d'individus adults

Per facilitar-ne l'estudi, convé anestesiar les mosques, especialment per evitar que s'escapen. Encara que hi ha diversos mètodes per anestesiar-les (èter, CO₂, fred, etc.), fem servir l'èter que, tot i que és perillós, és el més efectiu (Fig. 2).

Metodologia que cal seguir:

Es pren el pot on es troben els adults i es colpeja suaument en un suro perquè caiguin cap al fons. Es retira el cotó i es bolca el pot sobre l'eterificador. L'eterificador (una ampolla o tub de vidre) es tapa amb un cotó impregnat d'èter. Quan les mosques estan adormides es bolquen sobre un paper i s'observen amb la lupa. El temps que tarden les mosques a adormir-se és molt variable i depèn bastant de l'edat (com més velles són, abans s'adormen).



Fig. 2. Equip per a l'observació de *D. melanogaster*.

Consells pràctics durant l'observació

1.- Cal anar amb compte, ja que una exposició prolongada a l'èter els pot produir la **mort** (es reconeix perquè les ales es disposen perpendicularment al cos).

2.- Cal tenir cura de no mantenir oberta l'ampolla del cultiu, per evitar que les mosques **se n'escapen** o que n'hi entren unes altres i el cultiu es **contamini**.

3.- No deixar obert l'eterificador ni l'ampolla d'èter, ja que a més d'evaporar-se, pel seu baix punt d'ebullició, i carregar l'ambient, hi ha perill **d'explosió**, ja que és altament **inflamable**. Per tant, **no hi pot haver encenedors encesos** al laboratori durant les pràctiques amb èter.

4.- Abans d'eterificar de nou, ens hem d'assegurar que no queden mosques al fons de l'eterificador.

5.- Si durant una observació o recompte les mosques comencen a despertar-se, es poden reeterificar, amb cura de no matar-les.

6.- Per facilitar l'observació dels individus és recomanable alinear totes les mosques sobre la cartolina i passar-ne la filera sota el focus de la lupa. Així es poden anar separant segons el nostre interès.

7.- Quan es retornen les mosques adormides a un pot amb menjar, cal procurar que aquest estiga horitzontal, perquè no s'enganxen i moren. L'ampolla no es col·locarà en posició vertical fins que estiguen despertes. Un altre mètode consisteix a posar les mosques en un petit cucurull de paper, que després es posarà en el pot.

8.- Un cop finalitzada l'observació, els individus que no ens interessin s'introduiran en un flascó (*morgue*) que contindrà oli o una barreja de H₂O:EtOH:èter, per evitar la descomposició de les mosques.

Diferenciació entre sexes

D. melanogaster té tres parells d'autosomes (cromosomes 2, 3 i 4) i un parell de cromosomes sexuals (cromosomes X i Y). La determinació del sexe en aquest organisme és XX per a les femelles i XY per als mascles.

Aquesta espècie presenta un clar dimorfisme sexual (Fig. 3):

Les femelles tenen l'abdomen acabat en punta, amb bandes transversals fosques i separades les unes de les altres fins al final. Els mascles són de menor mida que les femelles. Tenen l'extrem de l'abdomen arrodonit, amb les últimes bandes transversals fusionades. A més a més, tenen una estructura anomenada *pinta sexual* (quetes modificades) en el primer segment tarsial del primer parell de potes (Fig. 3).

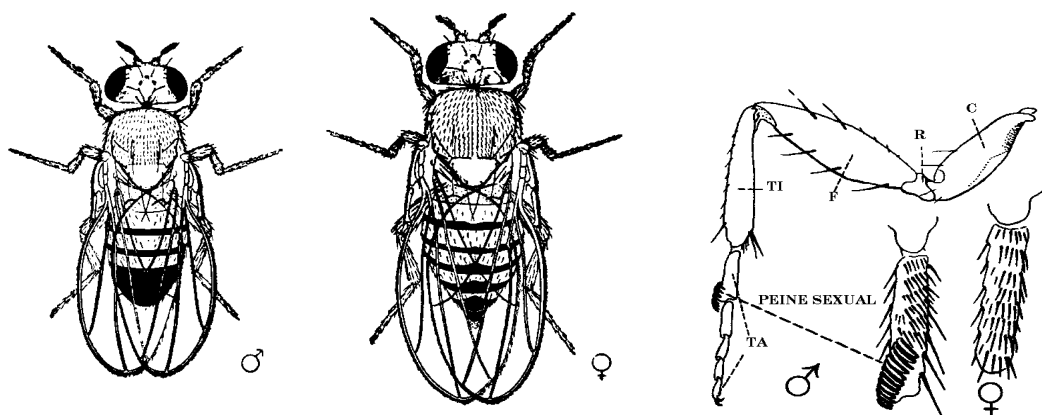
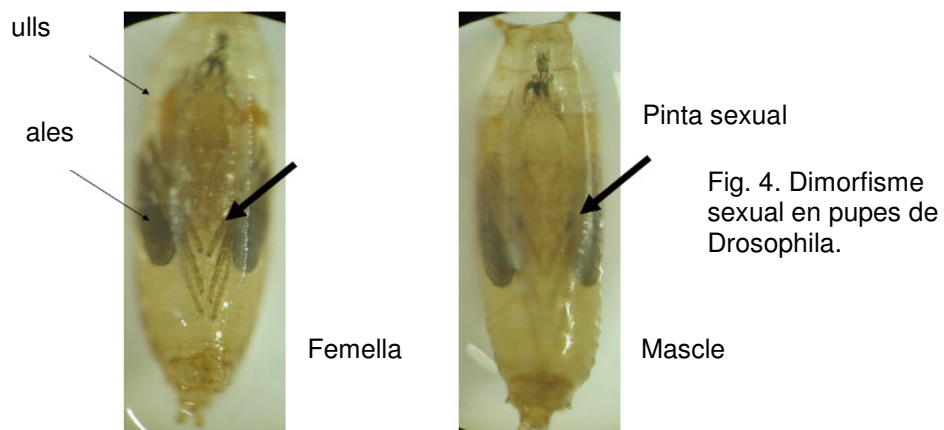


Fig. 3.- Mascle (esquerra) i femella (dreta) de *D. melanogaster* en estadi de pupa i imago, i detall de la pota davantera d'un mascle en la qual es pot apreciar la pinta sexual.

Obtenció de femelles verges

Les femelles de *D. melanogaster* emmagatzemen l'esperma d'una sola inseminació durant gran part de la seua vida reproductiva. Això suposa un inconvenient quan es tracta de realitzar estudis genètics en els quals cal realitzar encreuaments entre genotips determinats i, per tant, és necessària la utilització de femelles verges:

Les femelles es poden separar dels mascles en l'estat de pupa madura (Fig. 4), ja que en aquest estat es poden distingir les pintes sexuals dels mascles com dos punts entre les taques de les ales.



Les pupes es poden extraure de l'ampolla amb un pinzell humit, i llavors posar-les sobre la cartolina. Les pupes sense els punts foscos seran femelles, i es posaran en un tub a part. A les 24 hores, ja hauran emergit, i si no hem confós cap mascle entre elles, seran verges i estaran a punt per ser utilitzades en encreuaments.

Desenvolupament de la pràctica

Aquesta pràctica es deu resoldre com si es tractés d'un problema de Genètica. A partir dels resultats de les generacions F_1 i F_2 s'ha de proposar una hipòtesi per establir si els caràcters emprats en cadascun dels encreuaments estan lligats o segreguen de manera independent, i confirmar-la o rebutjar-la emprant l'estadístic de χ^2 .

Emprarem quatre soques homozigòtiques per a diferents mutacions **recessives**:

1. **soca *ri*** (*ri* = radi incomplet, absència total o parcial de la segona vena longitudinal de l'ala)
2. **soca *Hn*** (*Hn* = henna, color d'ulls molt obscur)
3. **soca *bw*** (*bw* = brown, ulls marrons)
4. **soca *v*** (*v* = vermilion, ulls roig clar)

Mitjançant l'anàlisi dels resultats dels encreuaments entre les soques 1 i 2, i les soques 3 i 4, intentarem establir si les mutacions *Hn* i *ri*, i les mutacions *bw* i *v* estan lligades o s'hereten de manera independent.

Pla de treball

1^a setmana: Familiarització amb l'organisme experimental i la lupa binocular. Preparació de flascons de cultiu. Realització de dos encreuaments: soca 1 X soca 2 i soca 3 X soca 4. En cada encreuament s'inclouran 6 femelles verges (pupes) d'una soca i 4 mascles adults de l'altra.

2^a setmana: Eliminar els adults de la generació parental per no sobrecarregar el cultiu i que no es mesclen amb la descendència. Observar els parentals per tal de detectar possibles errors en els encreuaments i, en el seu cas, anotar-los.

3^a setmana: Observació de les F_1 , anotació i interpretació del resultat i realització d'un encreuament de prova amb femelles verges de cada F_1 .

4^a setmana: Eliminar els adults de la generació F_1 . Observar els parentals per tal de detectar possibles errors en els encreuaments i, en el seu cas, anotar-los.

5^a setmana: Recomptar els diversos fenotips de les F_2 , anotar, analitzar i interpretar els resultats.

Les dades observades en les F_2 es compararan estadísticament amb els esperats per a aquelles hipòtesis que l'alumne consideri possibles. En cas de concloure que els gens es troben lligats, es realitzarà una estima de la distància que els separa a partir de la segregació de la F_2 .

PRÀCTICA 2.- Cromosomes politènics de *Drosophila*

Objectiu de la pràctica

L'objectiu central d'aquesta pràctica és aprendre a preparar cromosomes politènics de *Drosophila*, a partir de glàndules salivals de larves, per a la posterior observació al microscopi. Una vegada aconseguit això es procedirà a:

- a) Estudiar l'estructura d'aquests cromosomes, identificant bandes, interbandes...
- b) Detectar la presència de variacions cromosòmiques estructurals (inversions) en heterozigots.

Politènia: els cromosomes politènics dels dípters

La politènia és un procés en què es produeix un nombre elevat de successives rondes de replicació (5, 10 o més) que donen lloc als anomenats cromosomes gegants o **cromosomes politènics**, que estan constituïts per 2^n cromatidis, essent n el nombre de rondes de replicació.

Els **cromosomes politènics** no entren en una nova fase M sinó que es mantenen en interfase, per tant són cromosomes somàtics **interfàsics** en els quals les cromàtides es mantenen descondensades (com correspon a la interfase), per la qual cosa la llargària del cromosoma és entre 100 i 200 vegades la del cromosoma mitòtic corresponent. Com que les nombroses còpies de cada cromosoma romanen juntes i, a més a més, els cromosomes homòlegs tendeixen a estar aparellats, la politènia produeix un grossor total que és d'unes deu vegades el dels cromosomes metafàsics. Tot això els fa perfectament analitzables amb microscòpia òptica a pesar de tractar-se de cromosomes interfàsics.

Els cromosomes politènics van ser descoberts per Balbiani (1881), però el seu significat no va ser entès fins a mitjan dècada del 1930, en què van ser analitzats en les glàndules salivals de les larves dels dípters. Posteriorment, es van observar en altres teixits o òrgans de les larves (epiteli intestinal, tubs de Malpigi, etc.) i en altres organismes, per exemple en el macronucli de protozous ciliats, glàndules de la seda de *Bombyx mori*, glàndules salivals d'insectes col·lèmbols i també en diversos teixits vegetals.

De totes maneres, els organismes més favorables per observar els cromosomes politènics són els dípters, raó per la qual els cromosomes politènics més ben coneguts són els de les glàndules salivals de les larves de *Drosophila* i *Chironomus*.

Quan s'estudia el desenvolupament de les larves de *Drosophila*, s'observa la formació de les glàndules salivals per divisions cel·lulars i invaginacions de la blastoderma, fins a aconseguir un nombre aproximat de 125 cèl·lules cada glàndula. A partir d'aquest moment, que coincideix amb el període d'eclosió de la larva, les cèl·lules ja no es divideixen més i comencen a augmentar de mida com a conseqüència del procés d'endoreduplicació que origina els cromosomes politènics. Els cromosomes politènics mostren un patró de bandes típic, produït per l'alternança de regions condensades (bandes) i regions descondensades (interbandes). Aquesta organització és

conseqüència de l'alineament exacte de les cromàtides en els cromosomes, de manera que les regions de fort empaquetatge de les cromàtides individuals (corresponents a cromòmers) tenen l'aparença de bandes, i s'alternen amb les interbandes (Fig. 5).

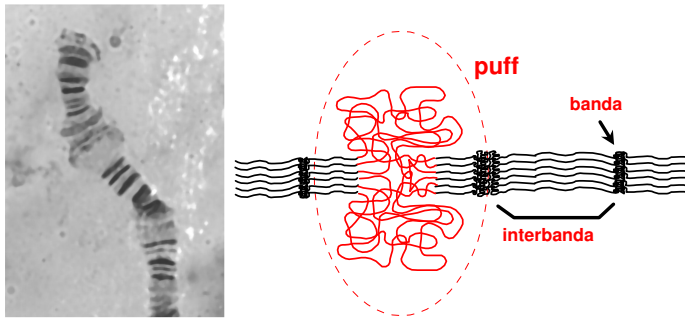


Fig. 5. Detall de la morfologia d'un cromosoma politènic.

En la *Drosophila*, els cromosomes politènics apareixen units en una zona central, denominada cromocentre, que s'interpreta com la fusió de les regions pericentromèriques heterocromàtiques de tots els cromosomes (Fig. 6a). En altres gèneres de dípters, com el *Chironomus*, no apareix cromocentre, de manera que els cromosomes politènics es presenten solts (Fig. 6b).

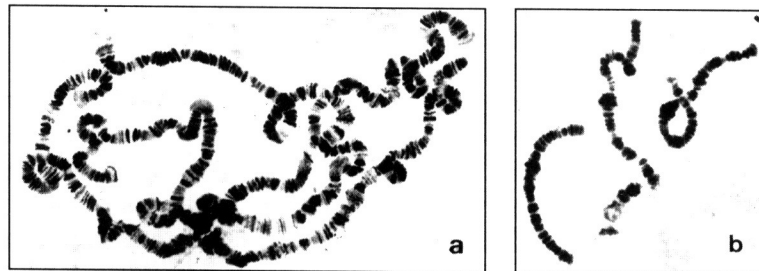


Fig. 6. Cromosomes politènics (a) de *Drosophila melanogaster* que mostren la presència del cromocentre i (b) de *Chironomus thummi*, sense cromocentre. (Fig. 2).

L'aparellament dels braços homòlegs és tan íntim que sol ser difícil distingir un braç de l'altre; no obstant això, en ocasions es produeix la falta d'aparellament en regions homòlogues dels cromosomes politènics (Fig. 7).



Fig. 7. Secció del cromosoma O de *D. subobscura* (soca K228) que presenta una zona desaparellada entre els homòlegs.

Una vegada establert que el patró de bandes que presenten els cromosomes politènics és característic per a cada espècie, es van poder construir mapes citològics molt precisos, en els quals cada banda cromosòmica quedava identificada per una lletra i un número (Figs. 8 i 9).

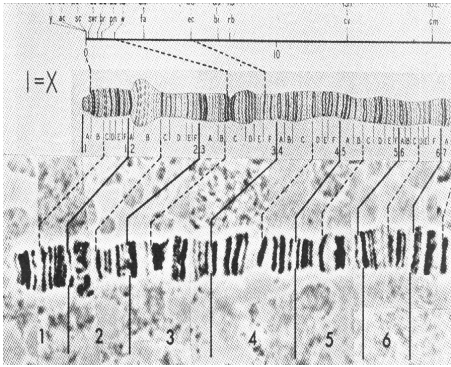
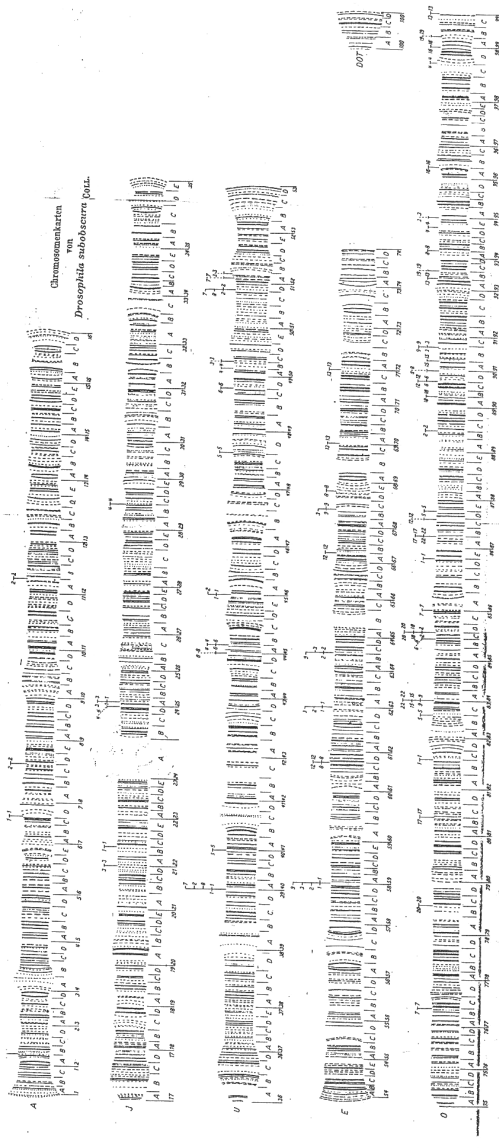


Fig. 8. Mapa genètic, mapa citològic i fotomapa de les sis primeres regions del cromosoma X de *D. melanogaster*

Fig. 9. Mapa citològic complet dels cromosomes politènics de *D. subobscura*.



Aquests mapes permeten la localització de reordenacions cromosòmiques que produeixen alteracions del patró de bandes. En *D. melanogaster*, moltes d'aquestes reordenacions cromosòmiques s'han pogut associar a mutants fenotípics determinats, facilitant la correlació entre mapes citològics i mapes genètics. Actualment la posició exacta de gens concrets en el mapa citològic pot determinar-se emprant la tècnica d'hibridació *in situ*.

Quan un individu és homozigot per a una determinada inversió, sols s'observa la reordenació dels seus gens. Però si és heterozigot, l'aparellament dels cromosomes homòlegs necessita la formació dels anomenats llaços d'inversió (Fig. 10).

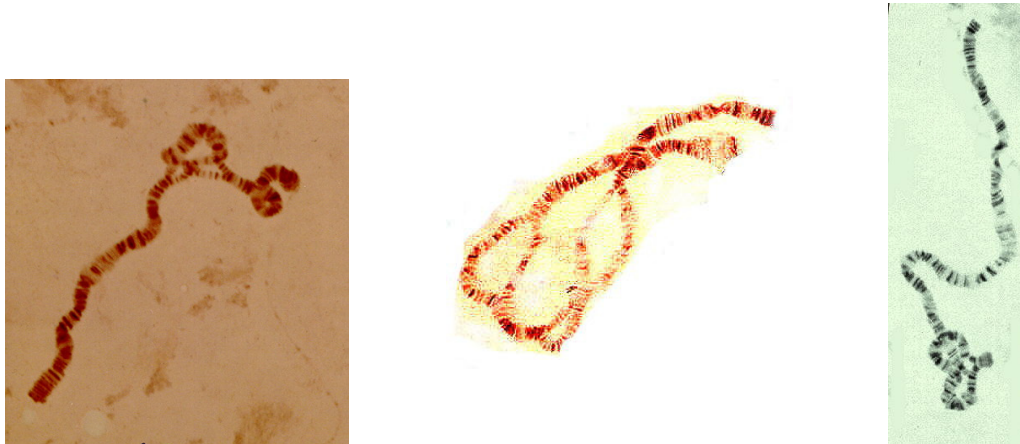


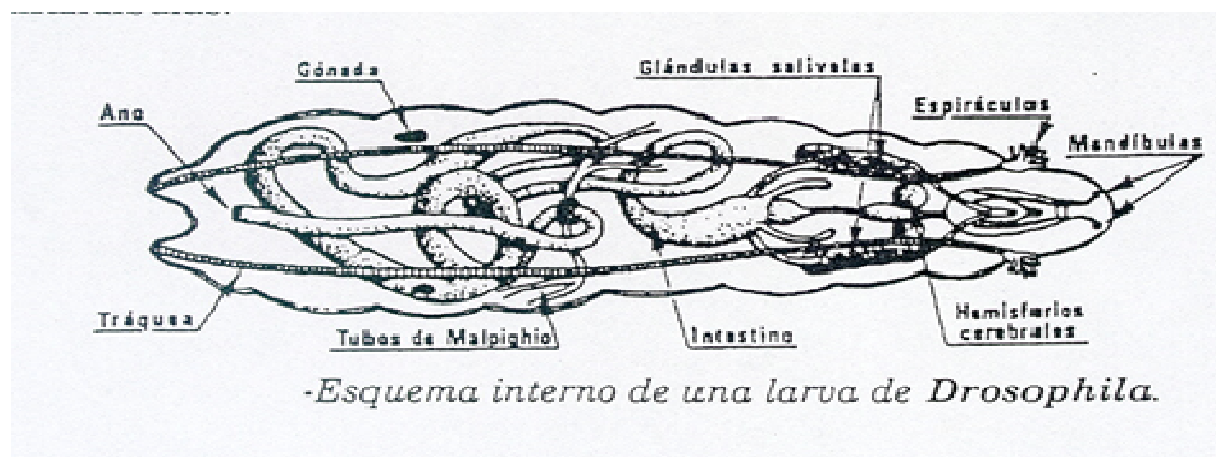
Fig. 10. Cromosomes politènics de *Drosophila* heterozigots estructurals per a diferents inversions.

Els cromosomes politènics són un material idoni per a observar les estructures que apareixen en els heterozigots per a les inversions. A diferència d'altres espècies properes que sols presenten inversions en un o dos dels seus cromosomes, a *D. subobscura* s'han descrit inversions (aproximadament 60 en total) en tots els seus cromosomes (A,J,U,E,O) excepte en el cromosoma puntual "dot".

Desenvolupament de la pràctica

El mètode a seguir per a preparar i analitzar els cromosomes politènics a partir de les glàndules salivals de *Drosophila* és el següent:

1. Col·locar una larva neta en un portaobjectes amb una gota de NaCl al 0,6%. Situar el porta sobre la plataforma de la lupa. Com pot observar-se en la figura 6, les glàndules salivals es troben unides entre si per la part anterior en un conducte únic que es comunica amb la faringe.



2. Per extraure les glàndules, se subjecta la part posterior de la larva amb unes pinces i es decapita amb una agulla emmanegada. Les glàndules apareixeran com dos saquets transparents, situats a un costat i l'altre de l'esòfag, i units a teixit gras.

3. Aïllar les glàndules tant com sigui possible però amb atenció de no danyar-les. No és excessivament problemàtic que romanguí un poc de teixit gras adherit.

4. Transferir les glàndules a una gota de colorant (orceïna acètico-làctica) i mantenir-les durant 25 minuts. Aquest temps es determina empíricament i depèn de la marca de colorant i de la soca utilitzada. És necessari que les glàndules es mantinguen cobertes en tot moment pel colorant ja que, en cas de no ser així, s'assecaran i es farà malbé el material.

5. Després de la tinció, cal cobrir la preparació amb un cobreobjectes i fer uns cops suaus amb la punta de l'agulla emmanegada perquè les cèl·lules se separen. A continuació, cal cobrir la preparació amb paper absorbent i fer pressió sobre el cobreobjectes, i evitar que aquest es moga, perquè els cromosomes s'estenguen i queden perfectament aplanats.

Pla de treball

1^a setmana: Aprendre l'ús del microscopi. Observació de preparacions de cromosomes politènics de *D. subobscura*. Estudi de la seua estructura. Observació d'inversions cromosòmiques en heterozigosi.

2^a setmana: Realització de preparacions de cromosomes politènics.

3^a setmana: Observació i estudi de les preparacions realitzades.

PRÀCTICA 3.- Aspectes citogenètics dels cromosomes sexuals: cromatina sexual

Objetiu de la pràctica

L'objectiu central d'aquesta pràctica és **observar els cossos de Barr en preparacions de cèl·lules de la mucosa bucal.**

Cromatina sexual

La cromatina sexual és un cos heteropiconòtic positiu observable en nuclis interfàsics de cèl·lules somàtiques, que desapareix en la mitosi. Representa part o tot un cromosoma sexual i té relació amb el sexe de l'individu en les cèl·lules del qual apareix.

En 1949, Barr i Bertram van descobrir que aquest cos sexual, corresponent al cromosoma X (cos de Barr), estava present en els nuclis de cèl·lules nervioses de gata i absent en els de gat. En 1973, Pearson va observar un cos petit fluorescent que corresponia al cromosoma Y (cos Y) en cèl·lules d'homes. Aquests descobriments han fet possible detectar el nombre de cromosomes sexuals en els nuclis interfàsics i per tant descriure anomalies en el nombre de cromosomes.

La cromatina sexual corresponent al cromosoma Y es veu mitjançant microscòpia de fluorescència i sols s'observa en cèl·lules d'home i goril·la. El nombre de cossos Y és igual al nombre de cromosomes Y que hi ha a la cèl·lula.

La **cromatina sexual corresponent al cromosoma X** es veu, mitjançant diverses tècniques de tinció o amb microscòpia de contrast de fase, en els nuclis de la majoria de mamífers. El nombre de cossos de Barr és igual al nombre de cromosomes X que hi ha a la cèl·lula menys un. Aquest fenomen es deu a la inactivació o "heterocromatització" de tots els cromosomes X menys un; d'aquesta manera, la relació de dosi en una femella (XX) entre els seus cromosomes sexuals i els seus autosomes serà la mateixa que en tots els teixits somàtics del mascle. Aquesta inactivació es produeix en les primeres etapes del desenvolupament embrionari i té lloc a l'atzar, de manera que en certes cèl·lules s'inactiva el cromosoma X d'origen patern i en altres el matern, i aqueix mateix cromosoma està inactivat en totes les seues cèl·lules filles.

El "cos de Barr" s'observa com una estructura intensament tenyida, d'una micra de diàmetre, i se sol veure junt a la membrana nuclear. La seua forma és triangular, amb l'àpex dirigit cap al centre nucli, o semiesfèrica. Apareix en d'un 15 a un 45% de les cèl·lules somàtiques de la dona.

Desenvolupament de la pràctica

1. Esbaldir-se la boca amb aigua, per a eliminar saliva, bacteris, etc.
2. Extraure cèl·lules de la mucosa raspant amb una espàtula l'interior d'una galta, per a la qual cosa convé pressionar l'exterior amb els dits de la mà.
3. Ficar una gota d'aigua destil·lada al centre d'un portaobjectes i dissoldre el producte extret amb l'espàtula, estenent-lo.
4. Abans que s'asseque, afegir una gota d'orceïna acètica-làctica i deixar-la actuar uns 20 o 30 minuts a temperatura ambient (l'orceïna actua com a fixador i colorant).
5. Ficar un cobreobjectes i, amb un paper de filtre damunt, fer una lleugera pressió perquè les cèl·lules queden ben esclafades.
6. Observar la preparació al microscopi.

Si les cèl·lules observades són d'una dona, moltes presentaran un corpuscle de Barr fortament tenyit en la perifèria del nucli, junt a la cara interna de la membrana nuclear (Fig. 11).

Si es tracta d'una dona normal, apareixerà un sol corpuscle de Barr; si és una dona XXX, n'apareixeran dos, etc. Al contrari, si són cèl·lules masculines XY, no n'apareixerà cap; si és un home Klinefelter (XXY), a pesar de ser home presentarà en les seues cèl·lules un corpuscle de Barr. En definitiva, apareixeran tants corpuscles de Barr com cromosomes X posseïska la cèl·lula menys un.

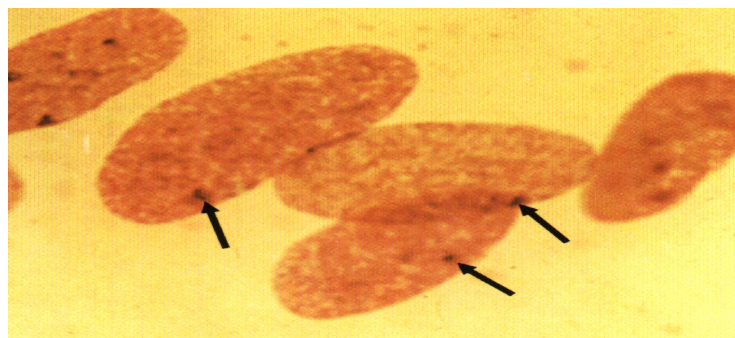


Fig. 11. Cossos de Barr, indicats mitjançant fletxes, en els nuclis de cèl·lules de dona 46,XX.

Pla de treball

1^a setmana: Realització i observació al microscopi òptic de preparacions de cèl·lules de la mucosa bucal tant de dones com d'homes.