



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències  
Departament de Genètica i Microbiologia

**Impacto de la colonización en la tasa de  
transposición, la expresión y la estructura  
molecular de los elementos transponibles *bilbo*  
y *gypsy* en *Drosophila subobscura***

Luz Angela Betancourt Cano  
Barcelona, 2013

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Luz Angela Betancourt Cano, para la obtención del título de Doctora en Genética que otorga la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, Mayo de 2013

Este estudio ha sido realizado bajo la dirección de los doctores María del Pilar García Guerreiro, Profesora agregada y Antonio Fontdevila, Catedrático Emérito del Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona, quienes certifican que:

El trabajo de investigación con el título: "Impacto de la colonización en la tasa de transposición, la expresión y la estructura molecular de los elementos transponibles *bilbo* y *gypsy* en *Drosophila subobscura*" es original y cumple con las normas establecidas.

Dra. María del Pilar García Guerreiro

Dr. Antonio Fontdevila Vivanco

Bellaterra, Mayo de 2013

A quienes han sabido estimular mi  
curiosidad y guiar mi crecimiento en  
todos los aspectos de la vida.



## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	
<b>1.1. Elementos transponibles</b>	<b>18</b>
1.1.1. Clasificación de los elementos transponibles	19
1.1.1.1. Elementos de clase I	19
1.1.1.2. Elementos de la clase II	24
1.1.2. Biología de los elementos transponibles	27
1.1.3. Regulación de la movilidad de los ETs	28
1.1.3.2. Silenciamiento post-transcripcional de los ETs por piRNAs	31
1.1.4. Modificaciones de la cromatina	33
1.1.5. Otros mecanismos de control de los ETs	35
1.1.6. Movilidad de los ETs	37
1.1.6.1. Transposición espontánea	39
1.1.6.2. Mecanismos que contribuyen a la transposición	41
1.1.7. Elementos transponibles y su relación con el genoma hospedador	46
1.1.8. Elementos transponibles en estudio	48
<b>1.2. Drosophila subobscura</b>	<b>51</b>
<b>1.3. Estudios de <i>bilbo</i> y <i>gypsy</i> en poblacionales colonizadoras de <i>Drosophila subobscura</i></b>	<b>52</b>
<b>1.4. OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
1.4.1. Objetivos generales	55
1.4.2. Objetivos específicos	55
2. METODOLOGÍA	57
<b>2.1. Material biológico</b>	<b>57</b>
<b>2.2. Extracción de ADN genómico</b>	<b>60</b>
2.2.1. Protocolo de extracción	61
<b>2.3. Extracción de ADN de fagos lambda</b>	<b>62</b>
<b>2.4. Células competentes</b>	<b>62</b>
<b>2.5. Amplificación de una genoteca de la población de Maipú de <i>Drosophila subobscura</i></b>	<b>63</b>
2.5.1. Titulación de la genoteca	63
2.5.2. Marcaje de sondas	63
2.5.3. Transferencia de ADN a filtros de nylon	64
2.5.4. Hibridación del ADN fijado al filtro	65
2.5.5. Detección del ADN marcado	65
2.5.6. Aislamiento y repurificación de clones de la genoteca	66
2.5.7. Lisis del vector (Fago Lambda)	66
<b>2.6. Hibridación in situ sobre cromosomas politénicos</b>	<b>67</b>
2.6.1. Obtención de preparaciones de cromosomas	67
2.6.2. Prehibridación	67
2.6.3. Hibridación <i>in situ</i>	68
2.6.4. Post-hibridación y revelado	68
<b>2.7. Localización cromosómica de los clones</b>	<b>69</b>
<b>2.8. Análisis poblacional de los clones de <i>gypsy</i> y <i>bilbo</i></b>	<b>70</b>
<b>2.9. Secuenciación y análisis bioinformáticos</b>	<b>71</b>
<b>2.10. Transposon display</b>	<b>72</b>

2.10.1. Digestiones de ADN .....	73
2.10.2. Ligación de los adaptadores.....	73
2.10.3. Cruces para el transposon display.....	75
2.10.5. Lecturas de genotipos: .....	76
2.10.6. Cálculos de las tasas de transposición:.....	76
<b>2.11. PCR a tiempo real (qRT-PCR).....</b>	<b>77</b>
2.11.1. Extracción de ovarios y testículos .....	77
2.11.2. Protocolo de extracción de ARN con trizol .....	78
2.11.3. Síntesis de cDNA .....	79
2.11.4. RT-PCR.....	80
2.11.5. PCR a tiempo real (qRT-PCR).....	81
2.11.6. Cálculos de las tasas de expresión:.....	82
2.11.7. Análisis estadísticos de los datos de expresión .....	83
<b>3. RESULTADOS 84</b>	
<b>3.1. Estudio de la estructura molecular de los elementos transponibles <i>bilbo</i> .....84</b>	<b>84</b>
<b>y <i>gypsy</i> en poblaciones originales y colonizadoras de <i>Drosophila subobscura</i>.....84</b>	<b>84</b>
3.1.1. Elemento Transponible <i>gypsy</i> .....	84
3.1.1.1. Clon <i>gypsy</i> 1 .....	84
3.1.1.2. Clon <i>gypsy</i> 10.....	89
3.1.2. Elemento transponible <i>bilbo</i> .....	93
<b>3.2. Estudio de las tasas de expresión de los elementos transponibles <i>gypsy</i> .....99</b>	<b>99</b>
<b>y <i>bilbo</i> en poblaciones colonizadoras vs originales .....</b>	<b>99</b>
3.2.1. Tasas de expresión de <i>gypsy</i> en poblaciones originales .....	100
3.2.2. Caracterización de los niveles de expresión de <i>gypsy</i> en poblaciones.....	105
colonizadoras.....	105
3.2.3. Comparación de las tasas de expresión de <i>gypsy</i> entre poblaciones.....	110
colonizadoras y originales.....	110
<b>3.3. Tasas de expresión de <i>bilbo</i>..... 113</b>	<b>113</b>
3.3.1. Caracterización de los niveles de expresión de <i>bilbo</i> en poblaciones originales.	113
.....	113
3.3.3. Comparación de las tasas de expresión de <i>bilbo</i> entre poblaciones.....	124
originales y colonizadoras.....	124
<b>3.4. Análisis de las tasas de expresión de <i>gypsy</i> y <i>bilbo</i> en línea germinal de ..... 133</b>	<b>133</b>
<b>poblaciones originales y colonizadoras .....</b>	<b>133</b>
3.4.1. Tasas de expresión de <i>gypsy</i> en línea germinal de poblaciones originales.....	133
3.4.2. Tasas de expresión de <i>gypsy</i> en línea germinal de poblaciones colonizadoras.	138
.....	138
3.4.3. Comparación de las tasas de expresión de <i>gypsy</i> en la línea germinal de .....	143
poblaciones colonizadoras y originales. ....	143
<b>3.5. Caracterización de los niveles de expresión de <i>bilbo</i> en la línea germinal... 148</b>	<b>148</b>
<b>de poblaciones originales y colonizadoras. ....</b>	<b>148</b>
3.5.2. Estudio de los niveles de expresión de <i>bilbo</i> en línea germinal de.....	151
poblaciones colonizadoras chilenas.....	151
<b>3.6. Estudio de las tasas de transposición del elemento <i>gypsy</i> en poblaciones... 160</b>	<b>160</b>
<b>originales y colonizadoras de <i>Drosophila subobscura</i> .....</b>	<b>160</b>
3.6.1. Tasas de transposición del elemento <i>gypsy</i> en las poblaciones originales .....	160
3.6.2. Tasas de transposición del elemento <i>gypsy</i> en poblaciones colonizadoras.....	162

3.6.3. Comparación de tasas de transposición entre poblaciones colonizadoras y ... originales. ....	168
4. DISCUSIÓN	170
4.1.1. Análisis poblacional .....	172
4.1.2. Clon <i>bilbo 12</i> .....	172
4.1.3. Clon <i>gypsy 1</i> .....	173
4.1.4. Clon <i>gypsy 10</i> .....	174
<b>4.2. Estudio de las tasas de expresión de los elementos transponibles <i>gypsy</i> ..... y <i>bilbo</i> en poblaciones colonizadoras vs originales. ....</b>	<b>178</b>
4.2.1. Tasas de expresión de ETs en los testículos de <i>Drosophila</i> .....	180
4.2.2. Tasas de expresión de ETs en los ovarios de <i>Drosophila</i> .....	184
<b>4.3. Tasas de transposición del elemento <i>gypsy</i>.....</b>	<b>189</b>
5. CONCLUSIONES	198
BIBLIOGRAFIA	200
ANEXOS	215

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los elementos transponibles. ....	26
Figura 2. Estructura del clon bilbo 1. ....	49
Figura 3. Estructura del elemento gypsy de <i>D. subobscura</i> . ....	50
Figura 4. Distribución geográfica de poblaciones colonizadoras suramericanas en estudio.....	59
Figura 5. Distribución geográfica de poblaciones colonizadoras norteamericanas..	60
Figura 6. Distribución geográfica de poblaciones originales europeas. ....	60
Figura 7. Electroferograma en el programa Peak Scanner. ....	76
Figura 8. Hibridación in-situ del clon gypsy 1 en la cepa ch-cu, en el cromosoma E. 85	85
Figura 9. Estructura molecular del clon gypsy 1 de <i>Drosophila subobscura</i> . ....	86
Figura 10. Hibridación in situ del clon gypsy10, en el cromosoma J. ....	89
Figura 11. Estructura molecular del clon gypsy 10 de <i>Drosophila subobscura</i> . ....	92
Figura 12. Hibridación in situ del clon bilbo 12 en el cromosoma E. ....	93
Figura 13. Estructura molecular del clon bilbo12a de <i>Drosophila subobscura</i> . ....	96
Figura 14. Estructura molecular del clon bilbo12b de <i>Drosophila subobscura</i> . ....	96
Figura 15. Tasas de expresión de gypsy en las poblaciones originales. ....	100
Figura 16. Tasas de expresión de gypsy en las hembras de las poblaciones originales.....	101
Figura 17. Tasas de expresión de gypsy en machos de las poblaciones originales. ....	102
Figura 18. Comparación de las tasas de expresión entre hembras vs machos de las poblaciones originales. ....	104
Figura 19. Tasas de expresión de gypsy en poblaciones colonizadoras chilenas..	106
Figura 20. Tasas de expresión de gypsy en hembras de las poblaciones colonizadoras chilenas.....	107
Figura 21: Tasas de expresión de gypsy en machos de poblaciones colonizadoras. ....	108
Figura 23. Tasas de expresión de gypsy en poblaciones colonizadoras vs originales. ....	111
Figura 24. Comparación de las tasas de expresión entre hembras de las poblaciones colonizadoras vs hembras de las poblaciones originales.....	112
Figura 25. Comparación de las tasas de expresión entre machos de las poblaciones colonizadoras vs machos de las poblaciones originales.....	114
Figura 26. Tasas de expresión de bilbo entre las poblaciones originales. ....	115
Figura 27. Tasas de expresión de bilbo en hembras de las poblaciones originales. ....	117
Figura 28. Tasas de expresión de bilbo en machos de las poblaciones originales.	118
Figura 29. Comparación de las tasas de expresión de bilbo entre machos y hembras de las originales. ....	119

<b>Figura 30. Tasas de expresión de bilbo en las poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 31. Tasas de expresión de bilbo en las hembras de las poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 32. Tasas de expresión de bilbo en los machos de poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 33. Relación de tasas de expresión de bilbo entre los machos vs hembras de las poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 34. Tasas de expresión de bilbo entre poblaciones colonizadoras vs poblaciones originales europeas.....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 35. Tasas de expresión entre las hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales.....</b>	<b>129</b>
<b>Figura 36. Tasas de expresión entre los machos de poblaciones colonizadoras y originales.....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 37. Relación de tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de poblaciones originales.....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 38. Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de hembras de las poblaciones originales.....</b>	<b>135</b>
<b>Figura 39. Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 40. Comparación de las tasas de expresión entre la línea germinal de machos y de hembras de las poblaciones originales.....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 41. Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>138</b>
<b>Figura 42. Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de las hembras de poblaciones colonizadoras chilenas.....</b>	<b>139</b>
<b>Figura 43: Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de los machos de poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 44. Comparación de las tasas de expresión de gypsy entre las líneas germinales de machos vs hembras de poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 45 Tasas de expresión de gypsy en la línea germinal de poblaciones colonizadoras vs originales.....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 46. Comparación de las tasas de expresión de la línea germinal de hembras de las poblaciones colonizadoras y originales.....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 47. Comparación de las tasas de expresión de la línea germinal de machos de poblaciones colonizadoras y originales.....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 48. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de las poblaciones originales.....</b>	<b>148</b>
<b>Figura 49. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de hembras de las poblaciones originales.....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 50. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 51. Comparación de las tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de machos vs hembras de las poblaciones originales.....</b>	<b>151</b>

<b>Figura 52. Tasas de Expresión de bilbo en línea germinal de las poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>152</b>
<b>Figura 53. Tasas de expresión de bilbo en las hembras de las poblaciones colonizadoras.....</b>	<b>153</b>
<b>Figura 54. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de machos de las poblaciones colonizadoras. ....</b>	<b>154</b>
<b>Figura 55. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal de los machos vs hembras de las poblaciones colonizadoras chilenas. ....</b>	<b>155</b>
<b>Figura 56. Tasas de expresión de bilbo en la línea germinal entre poblaciones colonizadoras y originales. ....</b>	<b>156</b>
<b>Figura 57. Tasas de expresión de la línea germinal de hembras entre poblaciones colonizadoras y originales. ....</b>	<b>157</b>
<b>Figura 58. Tasas de expresión de la línea germinal de los machos de las poblaciones colonizadoras y originales. ....</b>	<b>159</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Posiciones cromosómicas estándar de los ETs <i>bilbo</i> y <i>gypsy</i> en la cepa mutante <i>ch cu</i> de <i>D. subobscura</i> .	57
Tabla 2. Poblaciones analizadas.	58
Tabla 3. Cebadores para análisis poblacional de los diferentes clones secuenciados.	70
Tabla 4. Material usado en la mezcla para reacción PCR, amplificación de clones en poblaciones.	71
Tabla 5. Material usado en la reacción de digestión en el transposon display.	73
Tabla 6. Mezcla de adaptadores.	73
Tabla 7. Materiales para la mezcla de la reacción de ligación de adaptadores.	74
Tabla 8. Materiales para la mezcla usada para la PCR externa.	74
Tabla 9. Materiales para la mezcla usada para la PCR externa.	75
Tabla 10. Materiales para mezcla usada en el control positivo en primera reacción.	79
Tabla 11. Materiales para mezcla usada en el control negativo en primera reacción.	79
Tabla 12. Materiales para mezcla usada en el control positivo en segunda reacción.	80
Tabla 13. Materiales para mezcla usada en el control positivo en segunda reacción.	80
Tabla 14. Secuencia de cebadores usados en la RT PCR.	81
Tabla 15. Materiales para la mezcla usada en RT PCR.	81
Tabla 16. Materiales usados en la mezcla para PCR a tiempo real.	82
Tabla 17. Homologías del clon <i>gypsy 1</i> .	88
Tabla 18. Homologías de las secuencias flanqueantes del elemento transponible <i>gypsy10</i> .	91
Tabla 19. Comparación de los cambios nucleotídicos, deleciones e inserciones del clon <i>gypsy10</i> en las diferentes poblaciones naturales y el <i>gypsy</i> canónico.	94
Tabla 20. Homologías de la secuencia flanqueante 3' del clon <i>bilbo 12a</i> .	97
Tabla 21. Homologías de la secuencia flanqueante 3' del clon <i>bilbo 12b</i> .	98
Tabla 22. Comparaciones de las tasas de expresión de <i>gypsy</i> entre las hembras de las poblaciones originales.	102
Tabla 23. Comparaciones de las tasas de expresión entre machos de las poblaciones originales.	103
Tabla 24. Comparaciones entre hembras (H) y machos (M) de cada una de las poblaciones originales.	105
Tabla 25. Comparaciones de las tasas de expresión entre hembras y machos para cada población colonizadora.	109

Tabla 26. Prueba de Mann Whitney para comparaciones de tasas de expresión de <i>bilbo</i> entre poblaciones originales.....	116
Tabla 27. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre hembras de poblaciones originales. ....	117
Tabla 28. Prueba de Mann Whitney para las comparaciones entre machos (M) vs hembras (H) de poblaciones originales. ....	120
Tabla 29. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre machos vs hembras, de las poblaciones colonizadoras. ....	124
Tabla 30. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre las poblaciones colonizadoras y las originales. ....	127
Tabla 31. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre las hembras de poblaciones colonizadoras y originales. ....	130
Tabla 32. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre los machos poblaciones colonizadoras vs originales. ....	132
Tabla 33. Comparaciones de las tasas de expresión de <i>gypsy</i> en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.....	136
Tabla 34. Comparaciones entre la línea germinal de hembras de Chillán con respecto al resto de las poblaciones colonizadoras. ....	140
Tabla 35. Comparaciones entre la línea germinal de los machos de Santiago frente al resto de las poblaciones colonizadoras. ....	141
Tabla 36. Comparaciones de las tasas de expresión entre poblaciones colonizadoras.....	143
Tabla 37. Comparaciones entre la línea germinal de hembras de las poblaciones colonizadoras.....	154
Tabla 38. Bandas de <i>gypsy</i> detectadas por transposon display en las poblaciones originales.....	161
Tabla 39. Tasas de transposición de las poblaciones originales.....	162
Tabla 40. Tasas de transposición por familia de las poblaciones originales. ....	163
Tabla 41. Comparaciones de las tasas de transposición intra e interpoblacionales de Bellaterra y Aarhus.....	163
Tabla 42. Bandas de <i>gypsy</i> encontradas en las poblaciones colonizadoras. ....	164
Tabla 43. Tasas de transposición por familia de las poblaciones colonizadoras. ..	165
Tabla 44. Tasas de transposición de las poblaciones colonizadoras. ....	166
Tabla 45. Prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones de la tasas de transposición entre las poblaciones colonizadoras. ....	167
Tabla 46. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de la tasas de transposición entre machos vs hembras, y entre machos de las poblaciones colonizadoras.....	168
Tabla 47. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de las tasas de transposición entre las poblaciones colonizadoras y las originales. ....	169

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Bellaterra. ....</b>	<b>215</b>
<b>Anexo 2: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Bellaterra. ....</b>	<b>216</b>
<b>Anexo 3: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Bellaterra. ....</b>	<b>217</b>
<b>Anexo 4: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de población de Aarhus. ....</b>	<b>218</b>
<b>Anexo 5: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Aarhus.....</b>	<b>219</b>
<b>Anexo 6: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Aarhus.....</b>	<b>220</b>
<b>Anexo 7: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Puerto Montt. ....</b>	<b>221</b>
<b>Anexo 8: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Puerto Montt. ....</b>	<b>222</b>
<b>Anexo 9: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Puerto Montt. ....</b>	<b>223</b>
<b>Anexo 10: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Valdivia. ....</b>	<b>224</b>
<b>Anexo 11: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Valdivia. ....</b>	<b>225</b>
<b>Anexo 12: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Valdivia. ....</b>	<b>226</b>
<b>Anexo 13: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Laja.....</b>	<b>227</b>
<b>Anexo 15: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Laja.....</b>	<b>228</b>
<b>Anexo 16: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Chillán.....</b>	<b>229</b>
<b>Anexo 17: Relación del número y tamaño (<i>pb</i>) de inserciones de <i>gypsy</i> encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Chillán.....</b>	<b>230</b>

## RESUMEN

Estudios previos de la distribución de los sitios de inserción de los elementos transponibles (ETs) *bilbo* y *gypsy*, en cromosomas de *Drosophila subobscura* se han realizado en aras de entender, con más claridad, la implicación de los ETs a nivel evolutivo y los mecanismos susceptibles de promover su actividad. *D. subobscura* es una especie interesante para el estudio de estos aspectos ya que colonizó Suramérica y Norteamérica recientemente (hace 30 años aproximadamente). Este escenario de colonización hace que esta especie sea valiosa para el estudio del impacto de la colonización en la dinámica y distribución de los ETs en el genoma. Los resultados de la presente investigación, comparando copias de elementos móviles en poblaciones originales y colonizadoras, apoyan la hipótesis de que la deriva fundadora es la responsable de la distribución bimodal de dos ETs previamente observada en el genoma de las poblaciones colonizadoras. Sin embargo, no podemos descartar, de manera categórica, la existencia de un incremento de las tasas de transposición hacia determinados lugares cromosómicos en las poblaciones colonizadoras.

Con el objetivo de determinar si la actividad de los ETs era diferente en poblaciones originales y colonizadoras se realizó un estudio de las tasas de expresión y transposición de los ETs *gypsy* y *bilbo*. Las tasas de expresión se analizaron en el tejido total de individuos adultos, ovarios y testículos. Los resultados de los análisis de individuos completos mostraron diferencias en las tasas de expresión de estos elementos, siendo *gypsy* el que presentó tasas de expresión más altas que *bilbo*. A este nivel de comparación, las poblaciones colonizadoras mostraron un patrón generalizado de mayores tasas de expresión que las originales. Esto nos hace suponer que existe un aumento de actividad de estos dos elementos a nivel somático en las poblaciones colonizadoras. No obstante, en los análisis de la línea germinal no se observó este patrón: entre las poblaciones colonizadoras y originales no se observaron diferencias generalizadas en las tasas de expresión. Uno de los puntos destacables de este trabajo es la diferencia en las tasas de expresión a nivel de sexos. *Gypsy* presentó en los análisis de individuos completos tasas de expresión más altas en las hembras, mientras que en la línea germinal dicho incremento se presentó en los machos. Sin embargo, en

el caso de *bilbo* tanto los análisis de individuos completos como los de la línea germinal muestran mayores tasas de expresión en los machos.

Los estudios de las tasa de transposición de *gypsy* mostraron una mayor incidencia de nuevos eventos de transposición en machos de las poblaciones colonizadoras, mientras que en las originales estas diferencias a nivel de sexos no parecen tan evidentes.

Los resultados del presente estudio evidencian que existen diferencias en las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo*, a diferentes niveles de comparación (sexo, tipo celular y población). Estas diferencias pueden estar determinadas por mecanismos de control diferentes para cada elemento. Se sabe que el control epigenético de la expresión de muchos ETs sigue mecanismos diferentes en tejido germinal y somático. Además este control puede verse influenciado por el ambiente al que esté sometido cada población y por su contenido genético (también influido por la colonización). Esto explicaría las diferencias observadas entre tipos celulares y poblaciones. El conjunto de mecanismos de regulación desplegados por el genoma huésped afectaría la expresión y la dinámica poblacional de estos ETs en el genoma de *D. subobscura*.

## ABSTRACT

Previous studies about the distribution of the transposable elements (TEs), *bilbo* and *gypsy* in *Drosophila subobscura* chromosomes were done to a better understanding of the role of TEs and the mechanisms triggering their activity. *D. subobscura* is an interesting species of study because it recently colonized South America and North America (~ 30 years ago); which makes this species valuable for studying the impact of the colonization in the dynamic and distribution of TEs in the genome. This research work where we compare the copies of mobile elements in original and colonizer populations, supports the hypothesis that the founding drift is the responsible for the bimodal distribution, previously observed in two TEs in the genome of colonizer populations. However, we cannot categorically discard the existence of an increase of transposition rates towards particular sites of chromosomes in colonizer populations.

In order to assess whether TE activity was different in original vs. colonizer populations, a study of expression and transposition rates of *gypsy* and *bilbo* was performed. The expression rates were analyzed in whole adult individuals, ovaries and testes. The results of the of whole individual analysis showed differences in expression rates of both elements, being *gypsy* which showed the highest rate. Moreover, colonizing populations showed a generalized pattern of higher expression rates than original ones. This result suggests an increase in the activity of these two elements at somatic level in colonizing populations. However, this pattern was not observed in the germline analysis of where no differences in expression rates were observed between colonizing and original populations. A major point of this work are the differences in expression rates between sexes. (i.e. between males and females at both levels *Gypsy* showed the highest expression rate in females, whereas in the germline the largest increase was found in males. However, the expression rates of *bilbo* were the same when germinal line and the whole individuals males were checked.

Studies of *gypsy* transposition rates showed a higher incidence of new transposition events in males from colonizing populations whereas in original populations these differences were not clear.

Results of this study show differences in the expression rates of *gypsy* and *bilbo* at different levels: sex, cellular type, and population. These differences could be determined by different control mechanisms specific of each element. It is known that the epigenetic control of expression of many TEs follows different mechanisms in germinal and somatic tissues. Moreover, this control can be influenced by the environment to which each population is exposed and their genetic content (at the same time affected by the colonization). This would explain the observed differences between germinal line, somatic tissues and populations. The regulation mechanisms displayed by the host genome would affect the expression and the population dynamics of these TEs in the *D. subobscura* genome.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Elementos transponibles

Los elementos transponibles (ETs) son secuencias repetitivas de ADN, relativamente cortas (generalmente menores de 25 Kb), que ocupan una parte importante en el genoma de muchos organismos (Fukui et al., 2008). Fueron descubiertos por primera vez en el maíz por Barbara McClintock hace más de 60 años, y denominados “elementos controladores” debido a su capacidad de inserción y control de la expresión de algunos genes, constituyendo una poderosa fuente de variación. A partir de entonces, se han encontrado elementos móviles en el genoma de una gran diversidad de organismos eucariotas y procariotas: en el genoma humano ocupan el 50 % y en el genoma de algunas especies de gramíneas (incluyendo el maíz) llegan a representar hasta un 70 % (Jurka, 2008; Wessler, 2006; Feschotte et al., 2002; McClintock, 1953).

La clasificación de los ETs ha ido evolucionando a lo largo del tiempo debido a la aparición continuada de nuevas secuencias como consecuencia de la secuenciación masiva de genomas. Por lo tanto, no se ha logrado desarrollar un sistema de clasificación unificado que logre agrupar la gran diversidad de ETs existentes. En algunos sistemas de clasificación se han tenido en cuenta los diferentes mecanismos de transposición y en otros dicha clasificación se ha hecho desde un enfoque meramente filogenético (Capy, 2005).

La primera clasificación de los ETs fue propuesta por Finnegan (1989), quien sugirió que existen dos clases de ETs definidas básicamente por sus mecanismos de transposición: los ETs de clase I, que retrotranscriben un ARN intermediario (mediante el mecanismo de ADN-ARN-ADN) y cuyo mecanismo de transposición es comúnmente llamado “copia y pega”. Y los de clase II, que transponen directamente via ADN, mediante un mecanismo de “corta y pega”. Esta clasificación fue ampliamente aceptada, pero el descubrimiento de ETs en bacterias y eucariotas que usaban el mecanismo de “copia y pega”, sin intermediarios de ARN, y de los elementos *MITE* (Miniature Inverted-repeats Transposable Elements), entre otros, hicieron necesario redefinir esta clasificación (Wicker et al., 2007; Capy, 2005).

Wicker et al. (2007) propusieron, una clasificación jerárquica, intentando unificar el sistema de clasificación de los ETs en eucariotas. En este sistema de clasificación, se conservaron las dos clases de ETs propuestas por Finnegan y se incluyeron, además, los niveles de subclase, orden, superfamilia, familia y subfamilia, teniendo en cuenta las relaciones estructurales y filogenéticas entre ellos, trazadas a través de las secuencias de su reverso transcriptasa. Algunos autores han criticado este sistema de clasificación argumentando que a pesar de que imita la clasificación filogenética orgánica, no lo hace de manera consistente (Serberg y Petersen, 2009). Sin embargo, el trabajo realizado por Wicker et al. (2007) es uno de los sistemas de clasificación más completos y utilizados (figura 1), motivo por el cual se anota a continuación.

### **1.1.1. Clasificación de los elementos transponibles**

#### **1.1.1.1. Elementos de clase I**

Los elementos pertenecientes a esta clase también son llamados retrotransposones, ya que transponen usando un ARN intermediario. El genoma de ARN del retrotransposón es copiado en una cadena doble de ADN, por la transcriptasa inversa, para poder ser integrado en el genoma hospedador. Los retrotransposones son, generalmente, los principales responsables de los segmentos de secuencias repetitivas en el genoma eucariota (García Guerreiro, 2012; García Guerreiro y Fontdevila, 2007; Wicker et al., 2007, McCarthy y McDonald, 2004).

Los retrotransposones pueden dividirse en cinco ordenes, teniendo en cuenta características sobre su funcionamiento, organización y las filogenias de su reverso transcriptasa: retrotransposones LTR, LINEs y SINEs, elementos de tipo DIRS, y elementos tipo Penélope (PIEs).

#### **a. Retrotransposones LTR**

Los primeros retrotransposones con LTR fueron descubiertos gracias a su capacidad de generar mutaciones en los dos modelos biológicos más estudiados hasta el momento: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la mosca *Drosophila melanogaster*. La mutación *white-apricot*, que surgió espontáneamente en 1923,

causaba un cambio del color rojo (salvaje) a naranja-amarillo(mutante). Esta mutación del gen *white* fue la primera que se asoció con la inserción de un elemento transponible llamado *copia* u otro relacionado. La secuencia de estos elementos presentaba características estructurales muy parecidas a las de los retrovirus (Eickbush y Jamburuthugoda, 2008; Clare y Farabaugh, 1985; Mount y Rubi, 1985).

Se incluyen en este orden ETs que van desde pocos cientos de pares de bases hasta 25 Kb y cuya secuencia se encuentra flanqueada por dos repeticiones largas terminales (LTRs: Long Terminal Repeats, por sus siglas en inglés). Las secuencias LTR pueden ser pequeñas ó alcanzar más de 5 kb y sus extremos comienzan con 5'-TG-3' y finalizan con 5'-CA-3'. Estos elementos presentan duplicaciones del sitio de inserción (TSD por sus siglas en inglés) de 4-6 pb, que se producen durante la integración del retrotransposón en el genoma hospedador. Además, presentan dos marcos de lectura abiertos (ORFs por sus siglas en inglés): uno que codifica para una poliproteína estructural, similar a la de los virus, llamada GAG, y otro para la poliproteína POL. El dominio *pol* codifica la proteinasa aspártica (AP), la reverso transcriptasa (RT), la RNasa H (RH) y una integrasa (INT). A veces, existe un tercer marco de lectura abierto del cual se desconoce su función (Wicker et al., 2007). No obstante, se sabe que el tercer ORF es muy similar a los genes *env*, codificantes de la envoltura proteica de los retrovirus (López et al., 1999; Song et al., 1997; Kim et al., 1994; Song et al., 1994). Los retrotransposones LTR también contienen señales específicas de empaquetamiento, dimerización, reverso transcripción e integración (Wicker et al., 2007; Song et al., 1994).

Los retrotransposones LTR se dividen en dos superfamilias, *Copia* y *Gypsy*, que se diferencian principalmente por el orden de sus tres dominios proteicos: proteasa (PR), reverso transcriptasa (RT) e integrasa (IN) codificados dentro del dominio *pol*. El dominio *pol* de los elementos *Copia* está en el orden: PR, IN, RT, mientras que en los elementos *Gypsy* tiene el orden: PR, RT, IN, que es también el orden encontrado en los retrovirus (Wicker et al., 2007; Bowen y McDonald, 2001).

Los elementos *copia* y *gypsy* son estructuralmente parecidos a los retrovirus, se consideraba que la mayor diferencia radicaba en que los retrotransposones no codificaban para la envoltura proteica (Env); esta proteína la necesitan los virus

para el proceso infeccioso de célula a célula. Sin embargo, tras los descubrimientos hechos en *D. melanogaster* (Havecker et al., 2004; Song et al., 1997, 1994; Kim et al., 1994), se sabe que el elemento *gypsy* puede ser considerado un retrovirus de invertebrados, ya que en su ORF3 codifica para una proteína análoga a la proteína Env de los retrovirus que le permite ser transferido extracelularmente (Havecker et al., 2004; Song et al., 1997, 1994; Kim et al., 1994).

Actualmente existe una falta de consenso respecto a si los retrotransposones con ORF3 deben de ser considerados retrovirus o ETs. Algunos autores consideran que no solo *gypsy*, sino también, otros retroelementos que contienen ORF3 son retrovirus endógenos de insectos, mientras que otros, consideran que los retrotransposones son probablemente ancestros de los retrovirus ó alternativamente descendientes de éstos, que han perdido su capacidad infecciosa. La comparación de la alta diversidad de retrotransposones con la limitada diversidad de retrovirus de vertebrados, ha sugerido que las formas ancestrales fueron retrotransposones (Eickbush y Jamburuthugoda, 2008; Pantazidis et al., 1999; Song et al., 1997; Kim et al., 1994).

Por otra parte, también se han descrito elementos pertenecientes a la superfamilia *BEL-Pao*, que son estructuralmente parecidos a los elementos *Copia* y *Gypsy*. En ellos, el dominio IN se encuentra después del dominio RT. Los elementos *BEL* de *Drosophila melanogaster* y los elementos *Cer7-12* de *Caenorhabditis elegans*, pertenecen a esta superfamilia (Wicker et al., 2007; Bowen y McDonald, 2001).

Los grupos de elementos *copia* y *gypsy* tienen una distribución muy amplia en plantas, hongos, vertebrados e invertebrados, mientras que los *Bel* solo han sido descritos en animales.

La abundancia de los elementos con LTRs es altamente variable en hongos y animales y particularmente alta en plantas. Por ejemplo, el 75 % del incremento en el tamaño del genoma del maíz en los últimos 5 millones de años, fue el resultado de la proliferación de 11 familias de estos elementos. De otra parte, los elementos LTRs representan menos del 8% del genoma humano, y parece que no han estado activos en este linaje desde hace 50 millones de años, mientras que en ratones la estima es del 10 %. En el caso de *Drosophila* se estima que contiene 23 familias entre retrotransposones con LTRs y retrovirus (Sun et al., 2012; Muszewska et al.,

2011; Wendland y Walther, 2011; Eickbush y Jamburuthugoda, 2008; García Guerreiro y Fontdevila, 2007; MacCarthy y McDonald, 2004; Pantazidis et al., 1999).

#### **b. Elementos LINE**

Los retrotransposones miembros de este orden no presentan LTRs, pueden alcanzar longitudes de aproximadamente 5 Kb, y están presentes en un número de copias mayor de  $10^4$  por genoma en mamíferos (Wicker et al., 2007; López et al., 1999).

Los elementos LINEs también son llamados elementos poli-A<sup>+</sup>, dado que algunos presentan en su extremo 3' una región rica en adeninas (A). Estos elementos, pueden integrarse en una diana específica del ADN genómico hospedador (elementos sitio-específicos), como lo hacen los ETs *R1* y *R2* de insectos. También, pueden encontrarse insertados de manera dispersa a lo largo del genoma (elementos no específicos de sitio), entre los que se encuentra el elemento *L1* de humanos (Wicker et al., 2007; López et al., 1999).

Algunos elementos LINE son autónomos, presentando un marco de lectura abierto (ORF) para los genes *pol*, lo que les permite codificar una transcriptasa inversa (RT) y una nucleasa. Otros, presentan un ORF para los genes *gag* cuya función aún no se conoce. Sólo los miembros de la superfamilia *I* (que incluye el elemento *I* de *D. melanogaster*) contienen actividad enzimática RNasa H. Algunos LINE, como resultado de la integración de la nueva copia en el genoma hospedador, generan la duplicación del sitio de inserción (TSD) dando lugar a que el elemento quede flanqueado por secuencias repetitivas directas, de entre 7 y 20 nucleótidos (Wicker et al., 2007; López et al., 1999).

Los LINEs fueron descubiertos originalmente en humanos, pero con el paso del tiempo se han descrito en diferentes especies eucariotas, predominando en animales, a diferencia de los retrotransposones LTR cuya prevalencia es mayor en plantas (Sun et al., 2012; López et al., 1999). Los miembros de este orden se pueden agrupar en 5 superfamilias: *R2*, *L1*, *RTE*, *I* y *Jockey* (Wicker et al., 2007). En *Drosophila* existen 11 familias de retrotransposones sin LTRs (García Guerreiro y Fontdevila, 2007). Uno de ellos es el elemento *I* del que en algunas cepas de *D. melanogaster* existen entre 20-30 copias defectuosas por genoma haploide

localizadas en el ADN pericentromérico. Algunas otras cepas presentan de 10-15 copias en la eucromatina, en los brazos de los cromosomas (Chaboissier et al., 1998).

### **c. Elementos SINE**

Los elementos SINEs no tienen la maquinaria necesaria para su transposición, por lo tanto no son autónomos. Se movilizan a través de la retrotransposición en *trans* mediada por proteínas, como la RT, producidas por elementos autónomos LINE.

Se originan a partir de retrotransposiciones accidentales de transcritos de la RNA polimerasa III (Pol III), como ARN 7SL, ARN 5S y tRNA, y no, a partir de deleciones de elementos de la clase I, pese a pertenecer a esta clase. A diferencia de los pseudogenes que se retrotransponen, los SINEs poseen un promotor interno funcional capaz de llevar a cabo la transcripción del elemento completo mediante la ARN polimerasa III. Al integrarse en el genoma hospedador genera TSDs a ambos extremos del elemento. Su extremo 3' puede ser rico en adeninas (A) o en adeninas-timinas (AT), que se repiten en bloques de 3-5 pb, ó tener una cola poli (T) que es la señal de terminación del gen *Pol III* (Wicker et al., 2007; López et al., 1999).

### **d. Elementos tipo DIRS**

Los miembros de este orden, contienen un gen de la tirosin recombinasa en vez de una integrasa (INT), y por tanto no generan TSDs. Sus extremos se parecen a repeticiones parciales directas (SDR por sus siglas en inglés) ó a repeticiones invertidas. Por tanto, el mecanismo de integración es diferente de los elementos transponibles LTR y LINEs. Los elementos pertenecientes a este orden han sido encontrados en diferentes especies que van desde algas verdes a animales y hongos (Wicker et al., 2007).

### **e. Elementos tipo PLE**

Estos elementos codifican: una transcriptasa inversa (RT), que está más relacionada con una telomerasa que con la RT de los retrotransposones LTR ó LINEs. También poseen una endonucleasa que está relacionada con la proteína UvrC de reparación del ADN bacteriano. Algunos miembros de este orden presentan un intrón funcional y otros, secuencias tipo LTRs orientadas de forma

directa o inversa. Todos los miembros de este orden se encuentran agrupados en una única superfamilia: *Penelope* (Wicker et al., 2007), que se encontró por primera vez en *D. virilis* y se describió como un buen candidato para la producción de la disgénesis híbrida en esta especie (Evgen'ev et al., 1997). Hoy día se han encontrado en más de 50 especies, incluyendo animales unicelulares, hongos y plantas. Sin embargo, su ausencia en el genoma de algunas especies ya secuenciadas, demuestra que presenta una distribución irregular (Wicker et al., 2007).

#### 1.1.1.2. Elementos de la clase II

Los elementos de clase II ó elementos de ADN, son fragmentos de ADN que se mueven utilizando una hebra sencilla o doble de ADN, mediante el mecanismo de transposición “corta y pega” (Feschotte y Pritham, 2007; Wicker et al., 2007). Están agrupados en dos subclases que difieren por el número de hebras de ADN cortadas durante la transposición. En la subclase I las dos hebras son cortadas, mientras que en la subclase II solo una de ellas se corta.

La **subclase I**: está compuesta por el orden *TIR* que se caracteriza por presentar repeticiones terminales invertidas (TIR) de longitud variable y por generar duplicaciones del sitio de inserción (TSD). Está compuesta por nueve superfamilias: *Tc1-Mariner*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *PiggyBac*, *PIF – Harbinger*, *CACTA*, y por el orden *Crypton*, con una superfamilia, *Crypton*, cuyos transposones no poseen TIRs (Wicker et al., 2007).

La **subclase 2**. Está representada por dos órdenes, con una superfamilia cada uno: **1) Helitron**. Estos elementos utilizan para su replicación el mecanismo de círculo rodante, no generan duplicaciones en el sitio de inserción (TSD) y presentan una horquilla en su extremo 3'. Algunos *Helitron* han sido descritos en plantas, pero también se encuentran en insectos y hongos. Constituyen el 2 %, tanto, del genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans*, como de la planta *Arabidopsis thaliana*, y el 3% en el murciélago *Myotis lucifugus*. Actualmente se ha demostrado que también forman parte del genoma de algunas especies de salamandras (Sun et al., 2012; Wicker et al., 2007; Kapitonov y Jurka, 2001).

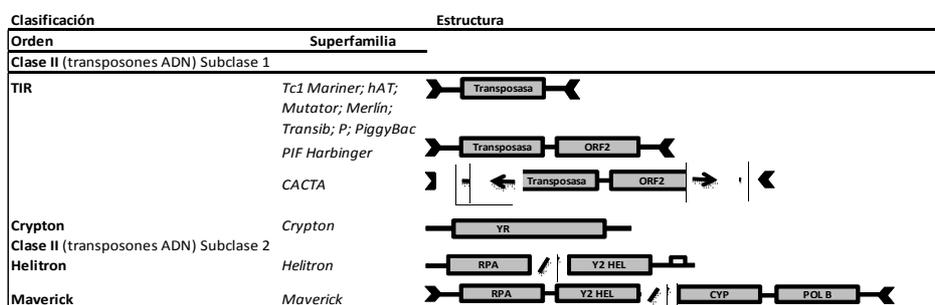
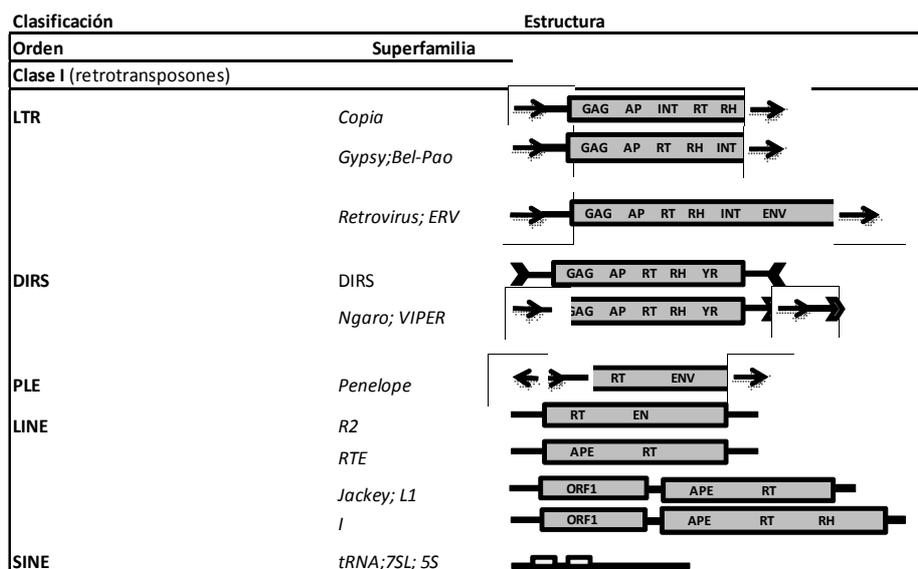
**2) *Maverick*.** Estos elementos son muy grandes (10-20 kb) y están flanqueados por largas repeticiones invertidas terminales (TIR). Codifican para once proteínas que varían en número y orden. Algunos de estos ETs tienen homología con proteínas de virus de ADN (Wicker et al., 2007). Su mecanismo de transposición no se conoce bien, pero se sabe que codifican para la ADN polimerasa B y para una integrasa (INT), relacionada con las encontradas en la clase I de elementos transponibles. Además, no presentan RT, lo que confirma que en su replicación no usan un ARN intermediario (Wicker et al., 2007).

La mayoría de estos elementos probablemente presente un mecanismo de transposición que implica el desplazamiento y la replicación de una sola hebra de ADN intermediario. Por lo tanto, usarían un mecanismo de transposición replicativo, el proceso de copiar y pegar (Feschotte y Pritham, 2007). Hasta el momento han sido encontrados en diversos organismos eucariotas, pero no en plantas (Wicker et al., 2007).

**Los retrotransposones no autónomos.** Se conocen tres tipos: LARDs (“Large retrotransposon derivatives”), TRIMs (“Terminal repeat retrotransposons in miniature”) y MITEs (“Miniature Inverted-repeats Transposable Elements”). Estos elementos no fueron clasificados dentro de un orden particular, ya que sus características estructurales no presentan un origen que les relacione con algún nivel taxonómico usado en el sistema propuesto por Wicker et al. (2007). Sabemos que los minitransposones MITEs son un grupo heterogéneo de transposones de ADN, no autónomos, que presentan tamaños de menos de 600 pb de longitud. Están flanqueados por secuencias TIR y se encuentran frecuentemente introgresados en genes o cerca de ellos, afectando la expresión de los mismos (Shirasawa et al., 2012; Wicker et al., 2007; Feschotte y Pritham, 2007). El genoma de las plantas contiene generalmente entre  $10^3$  y  $10^5$  copias, describiéndose movilidad inicialmente en el arroz y posteriormente en otros eucariotas (Momose et al., 2010). Las familias más grandes son los *Tourist* y *Stowaway*, la primera es abundante en plantas herbáceas y la segunda en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Feschotte et al., 2002; Bureau y Wessler 1994; 1992).

En varias especies algunos ETs autónomos del tipo *Tc1-Mariner* son responsables del origen y activación de muchas poblaciones de elementos no autónomos como las decenas de miles de MITEs *Stowaway* presentes en el arroz, o los más de mil elementos no autónomos *Galluhop* que se encuentran en pollos (Shirasawa et al., 2012; Wicker et al., 2007).

**Figura 1. Clasificación de los elementos transponibles.**



<b>Simbolos</b>		<b>Abreviaciones</b>	
	Repeticiones largas terminales (LTRs)	GAG: proteína de la capsida	ORF: Marco de lectura abierto
	Repeticiones terminales invertidas (TIRs)	AP: proteinasa aspartica	APE: endonucleasa apurínica
	Región codificante	RT: reverso transcriptasa	EN: endonucleasa
	Región no codificante	RH: RNasa H	HEL: helicasa
	Región que puede contener una o más ORFs	INT: Integrasa	YR: recombinasa tirosina
	Región diagnóstica no codificante	ENV: proteína envoltura proteica	Y2: recombinasa tirosina con modificaciones
		RPA: proteína A de replicación	C-INT: integrasa de tipo C
		ATP: ATPasa de empaquetamiento	CYP: proteasa cisteína
		POL B: DNA polimerasa B	

Modificado de Wicker et al. (2007).

### 1.1.2. Biología de los elementos transponibles

Los avances en biología molecular, genética y genómica han ayudado a entender en detalle muchos aspectos de la biología de los ETs. Los descubrimientos hechos en la interfaz de estos campos han proporcionado información sobre nuevos mecanismos de transposición permitiendo la identificación de nuevos ETs y la ampliación de la información sobre su distribución taxonómica, mostrando que los ETs y los virus están relacionados. Además, se ha logrado un mayor entendimiento sobre la influencia de los ETs en la organización, integridad y evolución de los genomas y del transcriptoma de su hospedador (Cam et al., 2008; Feschotte y Pritham, 2007; García Guerreiro y Fontdevila, 2001).

Su capacidad de transponerse de manera autónoma, ó con ayuda de secuencias auxiliares de otros elementos, puede dar lugar a inversiones, duplicaciones, y hasta delecciones de 100 kb ó mutaciones génicas. Todos estos cambios pueden acarrear reorganizaciones a gran escala del genoma influyendo en la plasticidad genómica que con el paso del tiempo llevará al cambio del genoma hospedador, tanto a nivel estructural como de expresión génica (Pereira et al., 2009; Fukui et al., 2008; López et al., 1999). Los dominios cromosómicos (Lewin, 2008, pag, 850), fruto de la reorganización del genoma mediada por ETs, se caracterizan porque presentan una actividad transcripcional distinta y diferentes marcas epigenéticas (Feschotte y Pritham, 2007). Estas marcas son heredables y normalmente estables, pudiendo estar sujetas a cambios dinámicos en respuesta a factores ambientales y estrés genético (Cam et al., 2008; Feschotte y Pritham, 2007; García Guerreiro y Fontdevila, 2001).

La distribución de los ETs varía de especie a especie atendiendo a dos aspectos fundamentales: 1) La clase a la que pertenecen y su fracción en el genoma , 2) El nivel de su actividad. Por ejemplo, las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) tienen únicamente retrotransposones LTR (elementos *Ty*), en el genoma de mamíferos predomina la clase I de retrotransposones no-LTR, representando tan solo un 5 % los ETs de ADN. Los genomas de plantas con flores, incluyendo monocotiledóneas (gramíneas como el arroz y el maíz) y dicotiledóneas (*Arabidopsis* y tomate), presentan una gran cantidad de elementos de ambas clases, siendo los

retrotransposones LTR los más abundantes en los genomas más caracterizados (Wessler, 2006).

### **1.1.3. Regulación de la movilidad de los ETs**

Los ETs pueden presentar secuencias que codifican una gran variedad de productos. Sólo en algunas ocasiones, por medio de mecanismos evolutivos, algunas de sus secuencias que codifican proteínas quedarán integradas en el genoma del hospedador como elementos útiles y regulables. Por otra parte, gracias a mecanismos evolutivos, los ETs se han convertido en una diana natural para una serie de antiguos mecanismos de silenciamiento de genes como los RNAi (ARN de interferencia), piRNAs (proteínas Piwi asociados a RNAs) y mecanismos epigenéticos como la metilación de citosinas, que aparentemente también se encuentra controlada por RNAi. Estos sistemas de defensa intracelular también operan frente a retrotransposones y virus encontrándose en plantas, hongos y animales (Cam et al., 2008; Abrusán y Krambeck, 2006).

En los últimos 12 años se ha hecho cada vez más evidente que las vías de silenciamiento mediadas por pequeños ARN protegen los genomas de plantas, hongos y animales contra los transposones y otros elementos egoístas (Senti y Brennecke, 2010). Estos pequeños ARNs no codificantes desempeñan papeles importantes en la modulación de la síntesis de proteínas (Kim et al., 2009) y su función comprende desde la formación de la heterocromatina, hasta la desestabilización del mRNA y el control transcripcional (Kim et al., 2009).

#### **1.1.3.1. Silenciamiento post-transcripcional de los ETs por RNAi.**

El mecanismo de regulación génica a través de la presencia de RNAi es un fenómeno, evolutivamente conservado, de regulación a nivel post-transcripcional que permite silenciar genes por reconocimiento de una secuencia nucleotídica específica y está presente en diferentes especies (de Adjounian et al., 2008).

El silenciamiento de genes por RNAi fue observado por primera vez en 1990 en *Petunias* (Napoli et al., 1990) en un intento por aumentar la expresión de la enzima chalcona sintetasa (CHS) en los pétalos de petunias pigmentadas, mediante la introducción de un gen quimérico CHS de *Petunia*. Los resultados obtenidos fueron

distintos de lo esperado: bloqueo de la biosíntesis de antocianina generando petunias totalmente blancas o poco pigmentadas, exhibiendo una gran cantidad de fenotipos diferentes, dependiendo de la reducción de la expresión del gen CHS (hasta 50 veces inferior). Los autores propusieron que el aumento de la expresión del gen transferido provocó una “co-supresión” del gen de la CHS endógeno. Otros estudios reportados en el mismo año, mostraron que la “co-supresión” no se limitaba únicamente a los genes quiméricos o al gen CHS. Hoy día se sabe que pese a que el silenciamiento de genes mediado por RNAi es muy común en plantas (Matzke et al., 2009), también está presente en diferentes organismos como: *D. melanogaster*, *N. crassa*, *C. elegans*, y en mamíferos (de Adjounian et al., 2008; Napoli et al., 1990).

El trabajo realizado por Fire et al. (1998), fue el primero que describió, en parte, el mecanismo de los pequeños ARN de interferencia (siRNA), usando como modelo biológico el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Los autores encontraron que en los animales inyectados con ARNs de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés) se observaba (a través de hibridación *in situ*), una disminución significativa o la eliminación de la transcripción del mRNA endógeno. Hoy día se tiene mucho más claro el mecanismo por el cual el ARN interfiere en los procesos post-transcripcionales (de Adjounian et al., 2008; Fire et al., 1998) constituyendo un potente mecanismo regulador no sólo de genes sino también de ETs endógenos. El mecanismo regulador (Slotkin y Martienssen, 2007; Fire et al., 1998) se puede resumir de la siguiente manera:

1. El dsRNA (ARN de doble cadena) es cortado por un grupo de proteínas de la familia Dicer (miembros de la familia de nucleasas RNasa III), en siRNAs con tamaños que oscilan entre 21 y 30 nucleótidos.
2. Estos siRNAs son reconocidos e incorporados a un complejo enzimático formado por varias proteínas llamado complejo RISC (RNA-induced silencing complex), el cual se ensambla y desenrolla la doble cadena de los siRNAs quedándose con la hebra anti sentido o guía (RNA mensajero blanco), todo esto mediado por proteínas de la familia Argonauta de las cuales se conocen dos subfamilias AGO y PIWI.

3. La maquinaria activa del complejo RISC reconoce a los ARN mensajeros y actúa de manera catalítica degradando varios ARN mensajeros, evitando con ello la síntesis de proteínas correspondiente.

Los siRNAs están involucrados en modificaciones epigenéticas en las plantas que están generalmente relacionadas con metilaciones del ADN dirigidas por ARN (RdDM). Los RdDM inducen metilaciones de novo en las citosinas en toda la secuencia (CG, GNC, y CNN, donde N es A, T o C) en la región del ADN homóloga al siRNA. En *A. thaliana* aproximadamente el 30 % de las citosinas se encuentra metiladas por este sistema (Matzke et al., 2009). Los RdDM se acumulan en dominios repetitivos heterocromáticos y también en las regiones eucromáticas, por lo general dispersos en transposones y secuencias relacionadas (Matzke et al., 2009).

Como se mencionó al principio de este apartado, en muchas especies, los RNAi también actúan como un mecanismo que la célula utiliza para defenderse de la acción de los ETs. En *C. elegans* el RNAi es el principal mecanismo de silenciamiento de ETs como *Tc1*, en la línea germinal. Por otra parte, las mutaciones en los genes de las proteínas de la familia *ArgonAUTA* y *Dicer* causan la reactivación de los elementos transponibles en muchas especies de eucariotas.

Los ETs son responsables de la formación de muchos siRNA en la mayoría de las especies, incluyendo humanos, de hecho, los niveles de estos ARNs se asocia con la actividad de los ETs. Diferentes experimentos han demostrado que los RNAi se desencadenan cuando un transposon se encuentra activo, comparándose frecuentemente con el sistema inmune debido a su “especificidad contra elementos externos y su capacidad de ampliar y planear una respuesta masiva contra un ácido nucleico invasor”. Sin embargo, algunos análisis genéticos proveen evidencia de que el RNAi puede ser más que una respuesta de defensa a ARNs invasores, ya que también tiene funciones muy claras en la regulación de genes endógenos (Bernstein et al., 2001).

Los mecanismos por los cuales los RNAi identifican a los ETs para silenciarlos aún no se conocen muy bien, pero las características estructurales de los ETs pueden ayudar a diferenciar entre los transcritos del elemento y los del hospedador. Por ejemplo, los transcritos que poseen TIRs de los transposones de ADN pueden

formar bucles en las estructura del dsRNA (Slotkin y Martienssen, 2007; Abrusán y Krambeck, 2006; Bernstein et al., 2001).

### **1.1.3.2. Silenciamiento post-transcripcional de los ETs por piRNAs**

Una clase de pequeños ARNs no codificantes lo constituyen los ARNs asociados a las proteínas Piwi, que forman parte del complejo de silenciamiento inducido por piRNA (piRISC: piRNA induced silencing complex, por su sigla en inglés) que está altamente conservado en la línea germinal de diferentes especies animales (Siomi et al., 2011; Senti y Brennecke, 2010; Kim et al., 2009). Los piRISC fueron descubiertos al estudiar los pequeños ARNs en el desarrollo de *D. melanogaster* (Yin y Lin, 2007). La principal función de los piRISC es silenciar ETs presentando una expresión limitada en las gónadas y una alta diversidad de secuencias (Siomi et al., 2011; Kim et al., 2009; Watanabe et al., 2008; Yin y Lin, 2007).

La vía piRNA es la principal línea de defensa contra los transposones en los ovarios de *Drosophila*, tanto en la línea germinal como en la somática ya que estos dos tipos celulares están presentes en ellos. Las células somáticas de apoyo (células foliculares) tienen un papel clave en mantener y proteger las células de la línea germinal. Las estrechas conexiones que existen entre las células germinales y somáticas, como por ejemplo el intercambio de señales del desarrollo o el flujo de nutrientes, expone el genoma de los ovocitos a las amenazas tanto internas como externas (Senti y Brennecke, 2010). Por una parte, algunos transposones son muy activos en las células germinales y explotan maquinarias celulares para maximizar su acceso al genoma del ovocito, como lo hace *gypsy* que depende de su expresión somática para aumentar su número de copias dentro de la línea germinal (Chalvet et al., 1999). Y por otra parte, algunos retroelementos de la familia Gypsy forman partículas virales en las células somáticas de apoyo, y estas partículas pueden invadir la línea germinal, posiblemente a través de vesículas de transporte celular (Senti y Brennecke, 2010).

Por otra parte, las proteínas Piwi son un factor esencial de auto renovación en las células madre de línea germinal, tanto de machos como de hembras. Estas proteínas están involucradas en la regulación de la actividad de los transposones, especialmente en ovarios y están asociadas con piRNAs derivados de

retrotransposones además de otros elementos repetitivos intergénicos (Brennecke et al., 2008; Nishida et al., 2007; Vagin et al., 2006). Los piRNAs asociados a piwi sirven como un mecanismo de silenciamiento de genes de elementos repetitivos en el núcleo, protegiendo de esta manera el genoma de elementos invasivos (Brennecke et al., 2007; Zamore, 2007).

La regulación epigenética mediada por los pequeños ARN es muy compleja dado que las proteínas Piwi pueden ejercer efectos opuestos dependiendo de la región genómica en la que actúen. Los piRNA pueden tener una función guiando a Piwi a sitios específicos, sin embargo, los efectos opuestos de Piwi en diferentes sitios diana podría estar mediada por el contexto local de la cromatina, que uniría el complejo Piwi- piRNA a distintos dominios que contienen histonas dimetiladas (Yin y Lin, 2007). Las proteínas Piwi de las moscas (AUB y AGO3) pueden cortar mRNAs marcados, dando como resultado el silenciamiento de retrotransposones, otros elementos repetitivos intergénicos y genes codificantes de proteínas, tales como *Stellate*, también conocido como *SteXh*, (Nishida et al., 2007; Saito et al., 2006). Piwi funciona diferente de AUB y AGO3, asociándose con la cromatina e interactuando con HP1a (proteína 1a de la heterocromatina), que está involucrada en la formación de la heterocromatina (Kim et al., 2009). Los piRNAs median en el silenciamiento en trans de cientos de copias de transposones a nivel transcripcional. Se sabe que Piwi es necesaria para establecer marcas heterocromáticas (H3K9me3: histone H3 lysine 9 trimethylation) en transposones y en su entorno genómico (Sienski et al., 2012). De esta manera, la vía de los piRNAs puede contribuir al control epigenético del genoma de las moscas (Sienski et al., 2012; Kim et al., 2009).

Hoy día se conoce mucho más acerca de su biogénesis y su función molecular, incluyendo la compartimentalización específica subcelular de la vía de los piRNA en los cuerpos granulares citoplasmáticos, presentes en las células germinales de muchas especies de metazoos, los cuales se encuentran muy cerca del núcleo, sugiriendo que estos sirven como estructuras que reconocen y procesan precursores de piRNA exportándolos del núcleo al citoplasma (Siomi et al., 2011). Es importante señalar, que incluso para los miembros Piwi que están presentes en el núcleo, tales como Piwi en *D. melanogaster* y Miwi2 en ratones, se tiene

evidencia de que la producción y asociación con los piRNAs se producen en estos gránulos citoplasmáticos (Siomi et al., 2011; Kim et al., 2009; Watanabe et al., 2008).

#### **1.1.4. Modificaciones de la cromatina**

Los estados de la cromatina son heredados por las próximas generaciones de células, con el fin de preservar el patrón de expresión de genes específicos, un fenómeno conocido dentro del campo de la epigenética.

Los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel importante como respuesta de los genomas al estrés ambiental y, a su vez, actuando como barreras que protegen los genomas. Los cambios en la cromatina en los que se incluyen: las modificaciones en las colas de las histonas, metilaciones de ADN y alteraciones en el empaquetamiento y condensación de la cromatina, suprimen la transcripción de los ETs. Los elementos al insertarse en el genoma, son generalmente marcados por modificaciones epigenéticas destinadas a suprimir su expresión. Estas modificaciones, a su vez, pueden causar alteraciones específicas en la cromatina que pueden extenderse al ADN contiguo y modificar (generalmente reprimiendo) la expresión de los genes adyacentes en un tejido mediante un proceso llamado heterocromatinización (Venner et al., 2009; Huang et al., 2004).

El control epigenético de la expresión de un gen se hace posible cuando se presentan modificaciones a nivel del ADN o de las proteínas asociadas a él, principalmente histonas, que no alteran la secuencia del ADN original (Venner et al., 2009; Biémont y Vieira, 2006; Huang et al., 2004). Estas modificaciones de la cromatina están determinadas, en gran parte, por alteraciones específicas postranscripcionales de las colas de las histonas o por modificaciones covalentes de los residuos de citosina. La actividad transcripcional de la cromatina está caracterizada frecuentemente por metilaciones y acetilaciones (Huang et al., 2004). Estos cambios generan descondensación de la cromatina, que puede facilitar que la maquinaria transcripcional pueda acceder al ADN, pero también lo expone a las enzimas implicadas en la transposición (Fontanillas et al., 2007; Timakov et al., 2002).

La mayoría de los genes de copia única se encuentran en la eucromatina. Por el contrario, la heterocromatina representa una forma condensada de la cromatina y está generalmente marcada por hipermetilación del ADN, e hipometilación de las histonas 3 y 4. Una metilación específica de la histona 3 en Lys-9 sirve como señal de reconocimiento de una proteína muy importante, la proteína de la heterocromatina 1 (HP1), que está implicada en la organización de la heterocromatina. Se sabe que la heterocromatina contiene una gran cantidad de secuencias repetitivas derivadas de ETs, de retrovirus, y secuencias macro y micro satélites (Huang et al., 2004).

La metilación es un mecanismo ancestral, por lo tanto, se encuentra en todos los grupos filogenéticos. En *Drosophila*, se presentan niveles bajos de metilación del ADN en todos sus estadios de vida, excepto en el embrionario donde los niveles son altos. Sin embargo, las secuencias objetivo de metilación son diferentes a los dinucleótidos clásicos CpG (Lyko, 2001). Esta particularidad y el hecho de que la metilación se realiza en etapas tempranas del desarrollo, es la responsable de la dificultad histórica de detectar metilaciones en estas especies. No obstante, se han detectado metilaciones en muchas especies de *Drosophila* y en una gran variedad de otros insectos (Fontdevila, 2011; Marhold et al., 2004). En plantas y mamíferos, los residuos de citosina pueden ser metilados en el dinucleótido simétrico (CpG) y estas metilaciones son copiadas durante la replicación del ADN en una nueva hebra de ADN, lo que genera un mecanismo de herencia del silenciamiento del ET (Slotkin y Martienssen, 2007).

Las metilaciones asimétricas también son responsables de la represión de los ETs en plantas, y en menor medida en mamíferos, generalmente corresponden a metilaciones de *novo* (metilación de secuencias no metiladas) que no requieren un sustrato metilado como guía. Algunos estudios sugieren que las metilaciones son un requisito indispensable para el silenciamiento epigenético de los ETs en algunos estadios del desarrollo de los mamíferos (Slotkin y Martienssen, 2007). No obstante, los bajos niveles de metilación que se presenta en *Drosophila* (Fontdevila, 2011; Slotkin y Martienssen, 2007) hacen pensar que la metilación no es un mecanismo muy relevante en el control de los ETs en este género.

### 1.1.5. Otros mecanismos de control de los ETs

El control de la actividad de los ETs en los genomas se considera importante, ya que los ETs activos son altamente mutagénicos que, entre otras alteraciones, pueden generar recombinaciones ectópicas o influir en los genes cambiando los patrones de *splicing*, poliadenilación, ó funcionar como *enhancers* o promotores (Slotkin y Martienssen, 2007; Abrusán et al., 2006). Por tanto, su actividad está fuertemente controlada a diferentes niveles, tanto a nivel de frecuencia, como de especificidad de su inserción. Por tanto, la prevalencia de los ETs en el genoma depende de un delicado balance entre su expansión y las restricciones que impone el genoma hospedador vmediado, probablemente, por el desarrollo de una relación simbiótica con éste (Fontdevila, 2011; Goodier y Kazazian, 2008; López et al., 1999).

Los mecanismos que usa el genoma hospedador para controlar la movilidad de los ETs, probablemente actúen a múltiples niveles, tales como: la transcripción del elemento, su expresión específica, el procesamiento del ARN y proteínas codificadas, el ensamblaje de partículas virales, la transcripción inversa y la integración de la doble cadena de ADN. Algunos de estos mecanismos han sido descritos en elementos LTR y pueden ser extrapolados a los elementos LINEs por su similitud. En el caso específico de los elementos LINEs se encontró un mecanismo de control que afecta al promotor interno del elemento *I* de *Drosophila* (López et al., 1999). La actividad de este promotor presenta una correlación negativa con el número de copias existentes en el elemento de los primeros 186 nucleótidos, que forman la región 5' no traducida del mismo, ya que esta región contiene secuencias que reducen, en cepas inductoras, la expresión del promotor de este elemento (Chaboisser et al., 1998).

Algunas otras estrategias que protegen el genoma hospedador de mutaciones deletéreas causadas por ETs son, por ejemplo, la especificidad de inserción, que hace referencia a la inserción de ETs en zonas no codificantes del genoma hospedador o incluso en elementos preexistentes (López et al., 1999). Los estudios realizados sobre la endonucleasa (EN) codificada por el elemento L1, son una prueba de la existencia del primero de estos casos. En estos estudios se encontró que las regiones que son reconocidas por EN se encontraban mayoritariamente en

regiones no codificantes del genoma humano. Muchos hexámeros de EN de los elementos L1 son restos de cola poli A (secuencias no codificantes) del extremo 3' de inserciones previas de L1/*Alu*. De esta manera, la evolución de dicha especificidad es uno de los factores que han asegurado el éxito en la proliferación de estos elementos en mamíferos. La restricción moderada de la transposición, por dianas específicas, favorece que los elementos L1 sean tolerados por el genoma hospedador (Ichiyanagi et al., 2007; Cost y Boeke, 1998). Los genes de muchos tipos de mamíferos y plantas presentan regiones de preferencia de inserción de ETs al final de sus intrones ó en las zonas no traducidas de los extremos 5' y 3' (Naito et al., 2006). Ejemplos del segundo caso, lo constituyen los elementos *R2Bm*, *Ty1*, *R1Bm*, *DRE*, entre otros, que son específicos de secuencias repetitivas, y otros, como *TX1*, que se insertan preferencialmente dentro de transposones. Este fenómeno es muy común en el maíz, en donde la mitad de los elementos estudiados están insertados dentro de otros elementos (López et al., 1999; Cost y Boeke, 1998).

Por otra parte, a nivel de interrupción de los genes, los ETs que se insertan en los genes pueden ser deletéreos, por tanto los individuos portadores de estas inserciones probablemente desaparecerán de la población. De esta manera, se espera que los ETs se acumulen en regiones pobres en genes, donde las inserciones tienen mayor probabilidad de ser neutras (Charlesworth et al., 1994).

Otro ejemplo de estas estrategias, hace referencia a la acumulación de ETs en zonas con baja recombinación. Las múltiples copias insertadas en el genoma presentan gran homología entre ellas y esto podría causar recombinaciones entre regiones no homologas de los cromosomas (recombinaciones ectópicas), y con ello, eliminar genes funcionales o exones, cambios en el genoma hospedador que pueden ser deletéreos. Teniendo en cuenta las desventajas que esto supondría para el hospedador, se espera que los ETs se acumulen en regiones con bajas tasas de recombinación (Abrusán et al., 2006; Langley et al., 1988).

A diferencia del modelo de interrupción de genes, el de recombinación ectópica tiene en cuenta la diversidad de los ETs: cuando aumenta el número de copias de ETs

homologas entre ellas, también aumenta la probabilidad de recombinaciones ectópicas, con las consecuencias que ya se han considerado en el párrafo anterior. Por tanto, este proceso influye en la diversificación de los ETs, ya que al reducir secuencias similares de repeticiones, reduce la probabilidad de recombinaciones entre ellas, y con ello, se espera el surgimiento de diferentes comunidades de transposones, con numerosas familias de ETs que estén presentes en un bajo número de copias (Abrusán et al., 2006).

Teniendo en cuenta esta hipótesis, se espera que los animales con genomas compactos tengan tasas más altas de recombinaciones ectópicas, que los animales con grandes genomas, y en consecuencia, la diversidad de los ETs en genomas pequeños sería alta. De hecho, se ha encontrado una gran diversidad de ETs en organismos con genomas compactos, como es el caso del pez globo, *akifugu rubripes* (Fugu) y *Tetraodon nigroviridis*. Esa diversidad de ETs, que también se observa en el pez cebra, es característica del genoma de peces y no se perdió después de la compactación del genoma en las especies de pez globo. La respuesta a la retrotransposición del genoma de los peces globo es similar a la observada en *D. melanogaster*, en la cual también se presentan un importante número de ETs (Abrusán et al., 2006; Volff et al., 2003).

#### **1.1.6. Movilidad de los ETs**

La dinámica evolutiva y la diversidad de los ETs en insectos, peces, aves y mamíferos, es muy diferente (Feschotte y Pritham, 2007; Abrusán y Krambeck, 2006) e incluso entre individuos de la misma especie (Wessler, 2006). En *Z. mays*, *D. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, muchas familias de ETs se encuentran activos, generando gran cantidad de mutaciones en ciertas zonas del genoma (Wessler, 2006). No obstante, en términos generales, en muchos insectos y peces son relativamente pocas las familias de ETs que se han mantenido activas durante largos periodos de tiempo (Wessler, 2006). Por otra parte, las plantas con flores especialmente los miembros del clado de las gramíneas (arroz, maíz, cebada y trigo), presentan una diversificación del genoma mediada por muchas familias de ETs de la clase I y II. En contraposición, en el genoma de los mamíferos la actividad de ciertos linajes de ETs es mucho menor, sin embargo, el nivel de actividad varía

significativamente entre familias (Wessler, 2006). En mamíferos una sola familia de transposones, la familia L1, ha dominado el genoma durante la radiación de los mamíferos, a expensas de todas las familias de retrotransposones autónomos. Los mamíferos también presentan una gran cantidad de elementos SINEs, repeticiones no autónomas que parasitan los retrotransposones LINE (Abrusán y Krambeck, 2006). En otros organismos como los pollos la actividad de todos los transposones es muy baja o no existe (Abrusán y Krambeck, 2006).

En humanos, aproximadamente el 80 % de los genes contienen, intercalados, elementos L1, más de  $2 \times 10^4$  copias de elementos *Alu* (Naito et al., 2006) y  $3 \times 10^3$  copias de elementos SVA, aproximadamente (Fontdevila, 2011, pag 102; Cordaux y Batzer 2009; Xing et al., 2006). La evidencia reciente indica que aproximadamente 35-40 subfamilias de *Alu*, L1, elementos de SVA y posiblemente elementos HERV-K, siguen activos en el genoma humano (Mills et al., 2007) y el de chimpances (Mills et al., 2006). Estos transposones activos son de gran interés debido a que continúan generando diversidad genética en las poblaciones humanas y porque causan enfermedades humanas mediante su integración en los genes (Cordaux y Batzer, 2009; Mills et al., 2007). De esta manera, los elementos *L1*, *Alu* y SVA han tenido un gran impacto en la evolución de los genomas de los primates en términos de estructura y función, gracias a su continua actividad y la acumulación en el genoma a lo largo de decenas de millones de años (Cordaux y Batzer, 2009).

Hasta el momento, no se sabe cuál es realmente el papel que desempeñan los ETs en la regulación de los genes individuales humanos. Si se tiene en cuenta que la mayor parte de las inserciones se produjeron hace más de 5 millones de años es probable que su impacto en la expresión de los genes nunca se conozca, por la sucesiva acumulación de mutaciones adicionales (Naito et al., 2006).

Por el contrario, muchos genes de plantas contienen ETs, pertenecientes a diferentes familias, que son de origen reciente. Estos elementos han permitido estudiar el impacto de los ETs en la expresión de los genes y en la diversificación alélica. Tras el descubrimiento de un minitransposon activo en el genoma del arroz, el elemento *mPing*, se abrió la primera puerta para determinar el impacto de las inserciones de elementos MITE en los genes de las plantas. Los estudios demostraron que existía una selección negativa en contra de los elementos *mPing*,

que se encontraban cerca de los genes del arroz, afectando posiblemente de manera sutil la expresión de los genes (Naito et al., 2006). En la actualidad, los elementos transponibles MITEs han sido considerados uno de los factores más importantes que han contribuido a la aceleración de la evolución del genoma eucariótico, ya que al transponerse dentro de genes y sus regiones flanqueantes causan la disrupción funcional de los mismos ó inducen su expresión (Shirasawa et al., 2012; Naito et al., 2006; 2009).

#### **1.1.6.1. Transposición espontánea.**

Los elementos transponibles solo se mueven de forma esporádica en los genomas eucariotas, debido probablemente a genes y mecanismos de regulación por parte del genoma hospedador (García Guerreiro, 2012; Federoff, 2002). Muchos estudios realizados sobre la dinámica poblacional de los ETs se han enfocado en unos pocos organismos modelo, especialmente en *Drosophila melanogaster*. Estos estudios, basados en el análisis de varias familias, mostraron que los ETs se encuentran a frecuencias bajas en la mayoría de las localizaciones genómicas. La permanencia de estos elementos en las poblaciones sería el resultado de un equilibrio entre el incremento del número de copias por transposición y la eliminación por selección natural (Petrov et al., 2011).

Las tasas de transposición en las poblaciones naturales y de laboratorio son generalmente muy bajas,  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  eventos de transposición por copia y por generación. Sin embargo, pese a la estabilidad de los genomas, se han reportado explosiones de transposición, sin una causa evidente, en procariontas y en *Drosophila* (García Guerreiro, 2012). Por ejemplo la transposición espontánea de secuencias de inserción (IS: IS1096 y ISMsm3) en la micobacteria *M. smegmatis* genera variabilidad confiriendo plasticidad genotípica a esta especie (Kocíncová et al., 2008). En *Staphylococcus aureus* la transposición espontánea de secuencias IS genera una cepa mutante resistente a antibióticos (Nagel et al., 2011).

Por otra parte, en *D. melanogaster* la “explosión” de eventos de transposición se ha observado en los ETs: *mdg1*, *mdg2*, *mdg3*, *copia*, *Doc*, *FB*, *P*, y *roo* y *DINE-1*, en *D. yakuba*. En *D. simulans*, una explosión de transposición es la responsable del

incremento del número de copias del ET 412 en poblaciones naturales de Camberra en Australia (García Guerreiro, 2012; Vieira y Biémont 1997).

En la actualidad no se conocen los mecanismos exactos que promueven la “explosión” de la transposición. No obstante, algunos autores consideran que estos eventos tiene un profundo impacto en la estructura de los genomas, y regulación de los genes, contribuyendo a procesos de especiación rápida. En *Drosophila*, se ha propuesto que la transposición ha podido contribuir en los procesos de especiación promoviendo el surgimiento de variabilidad genética, que favoreciera la adaptación demográfica y, en última instancia, el surgimiento de nuevas especies. En algunos casos, las explosiones de transposición en *Drosophila* ocurren solamente en pocos individuos e incluyen uno o varios ETs (García Guerreiro, 2012; Fontdevila, 2005). Este fenómeno de explosiones de transposición con periodos de radiación de especies, también se ha propuesto para especies de salmones y mamíferos (García Guerreiro, 2012; O’Neill et al., 1998).

Sin embargo, la correlación entre la transposición y la especiación es complicada, ya que es difícil determinar la fecha exacta de la “explosión” de ETs y la diversificación de especies naturales (Rebollo et al., 2010).

Por otra parte, los ETs no serían los únicos que contribuirían a la especiación. Otra variedad de factores como: la transferencia y pérdida de genes, las mutaciones que afectan a los “genes de especiación”, las interacciones endosimbióticas, los mecanismos que evitan la recombinación durante la meiosis y la introgresión también podrían explicar el aislamiento reproductivo. Además, en algunas especies la influencia de los ETs en los procesos de especiación es casi nula, ó dichos procesos de “explosiones” de transposición no siempre llevan a procesos de especiación. En el caso particular de *Drosophila*, no existe hasta el momento datos de asociación entre las “explosiones” de transposición y radiación de especies. Pese a ello, tampoco se puede asegurar que los eventos de transposición no estén implicados en el aislamiento reproductivo, formación de nuevas especies y al incremento del tamaño del genoma (García Guerreiro, 2012).

### **1.1.6.2. Mecanismos que contribuyen a la transposición**

En la actualidad no se conoce con exactitud cuáles son los mecanismos involucrados en la activación de los ETs en el genoma eucariota. No obstante, desde la década de los 80 se indaga al respecto. Barbara McClintock sugirió que los ETs son activados como respuesta a desafíos que se le presentaban al genoma. Desde entonces, el relajamiento del silenciamiento epigenético de los ETs ha sido descrito como una posible respuesta a exposiciones a luz UV, temperatura, radiación, lesiones, cultivo celular, infección por patógenos y poliploidización.

Esta reactivación de los ETs por estrés puede generar cambios que podrían tener un valor adaptativo para el hospedador. Esta respuesta adaptativa es una estrategia a largo plazo para el incremento de la variabilidad por selección. Desde entonces, la activación de los ETs por factores bióticos o abióticos y por cambios ambientales, también, ha sido documentada en eucariotas.

En *Drosophila* se ha sugerido, a través del estudio de las tasas de transposición, que la activación de los ETs está asociada a estrés térmico, sin embargo, no existe un consenso generalizado al respecto. Algunas movilizaciones pueden ocurrir de manera espontánea, sin explicación alguna, pero los cruces disgénicos, cruces híbridos y eventos de colonización, pueden también incrementar las tasas de transposición de algunos ETs (García Guerreiro, 2012; Slotkin y Martienssen, 2007; López et al., 1999; Labrador et al. 1999; Evgen'ev et al., 1997; Labrador y Fontdevila, 1994).

#### **a. Estrés ambiental**

A pesar de su uso cotidiano el significado de la palabra estrés es difícil de definir para los biólogos, dado que se utiliza en la literatura científica de muchas maneras y contextos diferentes. Las diferentes acepciones sobre el estrés va en función de la disciplina en la que se trabaje (fisiología, ecología y evolución biológica), y del nivel desde el que se aborde (molecular, fisiológico, del organismo o de la población). No obstante, lo más importante a tener claro es que el estrés ambiental, y el nivel de estrés impuesto, solo pueden definirse en relación al organismo o la población que experimenta este esfuerzo especial (Bijlsma y Loeschcke, 2005).

El estrés hace referencia a todos aquellos cambios ambientales que reducen drásticamente la idoneidad de un organismo. Existen dos tipos de estrés, determinados por la respuesta de los organismos: los que desencadenan una respuesta fisiológica (en un contexto individual), y los que lo hacen a nivel fenotípico y/o genético (en un contexto evolutivo). Las consecuencias de las relaciones entre los ETs y el estrés deben considerarse a nivel individual y poblacional (Capy et al., 2000).

La actividad de los ETs puede estar inducida por factores ambientales y poblacionales, y en particular por estrés en varios organismos. Como ya se ha mencionado, una de las consecuencias del aumento de la actividad de los ETs es la creación de variabilidad genética que puede ser útil ante condiciones de estrés. El estrés puede inducir la movilidad de los ETs, por medio de promotores o sitios de fijación de activadores de la transcripción en regiones no traducidas de los ETs, similares a los encontrados en regiones reguladoras en genes de defensa del hospedador (Capy et al., 2000).

La respuesta de los ETs al estrés puede darse a través de dos vías: 1) activando directamente los ETs y su actividad mutagénica, y 2) inhibiendo el silenciamiento de genes en el genoma que contribuirían indirectamente, a la reactivación de los ETs (Slotkin y Martienssen, 2007).

Los experimentos que involucran factores abióticos (irradiaciones y temperatura), así como también, factores bióticos (cultivo de tejidos, ó las infecciones por virus o patógenos), enfatizan en que el estrés estimula la activación de ETs, que se encontraban en reposo, en *Drosophila*, plantas y levaduras. Existe un consenso general en que los factores abióticos y bióticos, estimulan la transposición en plantas, pero en *Drosophila* y vertebrados esto no está tan claro (García Guerreiro, 2012).

## 1) Estrés abiótico

Algunos ETs en *D. melanogaster* responden a estrés por calor, estos elementos contienen promotores inductores de choque térmico (heat-shock). En poblaciones naturales de *D. simulans* la temperatura podría influir en las tasas de transposición, dado que el número de copias del elemento 412 sigue una clina para la temperatura mínima (Vieira et al., 1998). Los experimentos en cepas de laboratorio de *Drosophila* no muestran siempre un patrón de asociación entre el aumento de la transposición y los cambios bruscos de temperatura. La diferencia en los resultados obtenidos por diferentes autores (Arnault et al., 1997; Ratner et al., 1992; Arnault et al., 1991) puede deberse a los antecedentes genéticos de cada población, al tipo de ET analizado ó a ambos factores. De otra parte, es difícil poder determinar si los eventos de transposición son nuevos o pre existentes (García Guerreiro, 2012; Slotkin y Martienssen, 2007). Además, de la temperatura, existen otros factores ambientales que han sido asociados con la transposición. Por ejemplo: algunos agentes químicos se reportan como inductores de eventos de transposición en nematodos, levaduras y hongos. Y algunos gases y agentes alquilantes en *Drosophila*, de los elementos: *P* y *412*. Por el contrario, otros agentes mutagénicos, no influyeron en el movimiento de los ETs tipo  *copia* y *B104*. Las radiaciones como activadores de eventos de transposición, tampoco siguen un modelo de asociación directa, en este caso en particular los efectos dependían del tipo de ET estudiado y del tipo de radiación a la que fueran sometidas las muestras (García Guerreiro, 2012).

## 2) Estrés biótico

Algunos patógenos se han asociado como activadores de la transposición en plantas. En cultivo de tejidos se han asociado a la activación del retrotransposones *Tnt1* en el tabaco, y de los elementos *MITE* en el arroz (Slotkin y Martienssen, 2007; Naito et al., 2006; Gonzalvo, 2006). La influencia de los factores bióticos en la transposición en *Drosophila* ha sido poco documentada, y en los casos reportados no existe un consenso acerca de su implicación.

En experimentos en los que se inyectaron partículas víricas o de oncovirus a embriones de *Drosophila*, se observó un incremento de transposición de los ETs

*mdg1* y *mdg2*, pero no del elemento *copia*. Una de las dificultades, en el caso particular con oncovirus es determinar si las mutaciones observadas están asociadas a eventos de movilización de los ETs ó a la integración directa de los oncovirus. Estudios con cultivos celulares de *Drosophila* infectados con virus de ARN han demostrado el silenciamiento del ARN del virus y de los supresores esenciales para la infección. En plantas se han observado resultados similares. Podemos pensar, que ya que los retrotransposones son parecidos a los retrovirus, que tras una infección viral en el que los ARNs virales han silenciado los supresores de la transposición, el sistema de regulación de algunos retrotransposones puede verse alterado, aumentando la transposición tras una infección vírica (García Guerreiro, 2012).

Por otra parte, se ha propuesto que el mantenimiento de cultivos celulares de *Drosophila* promovía la actividad de algunos elementos (Maisonhaute et al., 2007). Los factores que activan la movilidad de los ETs en cultivos celulares son desconocidos hasta el momento. Algunos autores consideran que los componentes del medio de cultivo podrían ser los responsables de la movilización de los ETs observada (García Guerreiro, 2012). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el estrés ambiental sólo puede ser valorado en relación con el organismo que experimenta el estrés y, por lo tanto, el estrés también tiene un componente intrínseco. Los cambios genéticos en los organismos y poblaciones provocadas, por ejemplo, por consanguinidad u otros cambios en la arquitectura genética de organismos o poblaciones, conlleva a lo que se conoce como estrés genético (Bijlsma y Loeschcke, 2005).

### **3) Estrés genómico**

El estrés genómico hace referencia a cualquier factor que pueda influir en la estabilidad del genoma. Uno de los casos más documentados hace referencia a cruces entre individuos genéticamente diferentes que conduce a un incremento de las tasas de transposición de algunos ETs asociado a altas tasas de mutación, procesos de no disyunción, altas tasas de recombinación en machos, rearrreglos cromosómicos, y esterilidad. En *Drosophila*, este fenómeno es generalmente conocido como disgénesis híbrida y está relacionada con cruces entre líneas de

diferente origen geográfico. En este fenómeno están implicados, de manera independiente, tanto ETs de ADN como retrotransposones. Además, los eventos de transposición pueden ser de un único elemento o de varios. (García Guerreiro, 2012; Kidwell y Kidwell, 1976).

En *Drosophila melanogaster*, la disgénesis híbrida es la responsable de la movilización de un único elemento transponible, *P*, *I* o *hobo*, dependiendo del tipo de disgénesis híbrida que se esté analizando (Evegen'ev et al., 1997; Yannopoulos et al., 1987; Picard et al., 1978). Mientras que en *D. virilis* se movilizan los elementos *Penelope*, *Ulysses*, *París* y *Helena*. Se sabe que la movilización de los tres últimos elementos está asociada a la movilización de *Penelope*, que al ser el responsable de la disgénesis híbrida desencadena la transposición de los demás, quizás a través de roturas cromosómicas ó a través del suministro de las proteínas necesarias para la transposición de los demás. (García Guerreiro, 2012; Jensen et al., 2008; Evgen'ev et al., 1997).

Sin embargo, no solo los cruces disgénicos en *Drosophila* estimulan la transposición, otros tipos de cruces también la inducen, por ejemplo, los cruces entre diferentes líneas mutantes de *D. melanogaster* (Georgiev et al., 1990), entre líneas de laboratorio vs líneas silvestres y algunas líneas; balanceadas (García Guerreiro y Biémont, 1995; Pasyukova y Nuzhdin, 1993; Pasyukova et al., 1988). La hipótesis más probable, que explicaría estos resultados, es la de considerar que la movilización de los ETs depende del tipo cruces que se haga (García Guerreriro, 2012).

Los paralelismos entre híbridos disgénicos en *D. melanogaster* y cruzamientos híbridos interespecíficos, llevó a suponer que la especiación podría generarse por un alto índice de transposición (Coyne, 1989; Rose y Doolittle, 1983).

Los cruces interespecíficos, que contribuyen a la inestabilidad del genoma, también, afectan las tasas de transposición de los elementos móviles. Estos casos han sido reportados ampliamente en diferentes géneros de plantas (Michalak, 2010; Joseffson et al., 2006; Mallet, 2005). En canguros, los cruces interespecíficos inducen la activación de la transposición (Metcalf et al., 2007). En *Drosophila* los

híbridos resultantes del cruce entre *D. virilis* y *D. littoralis* sugerían un aumento en la movilización del elemento *pDv111* (Evgen'ev et al., 1982). Sin embargo, el primer ejemplo, estadísticamente significativo, de transposición interespecífica en híbridos de *Drosophila*, fue reportado a través de los cruces entre las especies sinmórficas *D. buzzatii* y *D. koepferae*, en los que se observó un incremento de la tasa de transposición del retrotransposon *Oswaldo* (Labrador et al, 1999; Labrador, 1994). Este fenómeno fue propuesto por los autores como un primer indicio de la implicación de los ETs en los procesos de especiación ya que trabajos anteriores, como el de Coyne (1989) no apoyaban esta hipótesis. En la actualidad existe mucha más evidencia sobre la relación, directa o indirecta, de los ETs en la especiación (Noor y Chang, 2006).

La acumulación de las disfunciones híbridas, ocurre no solo por incompatibilidades híbridas, sino también por un conjunto de procesos relacionados con la activación de los ETs. Los mecanismos por los cuales se activa la transposición en estos cruces son poco conocidos, pero se supone que cuando dos genomas diferentes forman un cigoto, éste debe sufrir un cambio drástico en los mecanismos de regulación debido a este “choque genómico” (García Guerreiro, 2012).

#### **1.1.7. Elementos transponibles y su relación con el genoma hospedador**

La dinámica de los ETs depende de sus tasas de transposición, de escisión y de los efectos de su inserción en el genoma hospedador. La teoría y las simulaciones han mostrado que las diferentes fuerzas evolutivas que actúan a nivel del hospedador, pueden influenciar la distribución y mantenimiento de los ETs (Venner et al., 2009). Son muchos los trabajos que se han realizado con el fin dilucidar la cantidad de variación de ETs que es promovida por selección y deriva a nivel del hospedador. Sin embargo, no se tiene claro que parte de esa variación se produce a nivel exclusivo de los ETs. Algunos estudios sugieren que las interacciones entre los ETs reducen o incrementan la probabilidad de transposición de los mismos, afectando con ello, la diversidad y el número de los ETs, independientemente, de las fuerzas evolutivas que actúan sobre el hospedador (Venner et al., 2009).

Dentro de la gran diversidad de copias de ETs, algunos de ellos son deletéreos y son eliminados por selección natural, otros, son neutrales con respecto a la selección, y otros, han sido adoptados por el genoma hospedador o regulados en *cis*, y mantenidos por selección natural para desempeñar funciones específicas e indispensables para el genoma hospedador (Venner et al., 2009; Pardue et al., 2005).

Por lo tanto, los ETs en la actualidad no se relacionan únicamente como agentes desestabilizadores de los genomas. Existen muchos reportes que indican que la coevolución de los retrotransposones con el genoma hospedador ha llevado a la integración de retrotransposones en complejos procesos genómicos (Fontdevila, 2011, paginas 93-104; Cordaux y Batzer, 2009; Moutri et al., 2007). Un ejemplo lo constituyen las secuencias Alu, repeticiones más abundantes en humanos, ya que parte de su secuencia es requerida para la activación de la ARN polimerasa III, necesaria para la transcripción de los miRNAs. Por tanto estas secuencias además de ser el blanco de genes miRNA, pueden estar implicadas en la expresión de manera global en los genomas (Borchert et al., 2006). Por otra parte, los elementos L1 están involucrados en la reparación de los télómeros, como un mecanismo ancestral de reparación. Los L1 cuyo dominio EN (endonucleasa) se encuentra inactivo usan el extremo saliente 3' OH, presente en télómeros disfuncionales, como sustrato para iniciar la retrotransposición. Este mecanismo de reparación de DNA mediado por RNA asociado a retrotransposones no-LTR pudo presentarse antes del desarrollo del dominio de la endonucleasa, presentando similitudes con la retrotransposición por EN y la acción de la telomerasa (Morrish et al., 2007).

El elemento SVA, el más joven de los retrotransposones en primates (Xing et al., 2006), es un elemento específico de homínidos que deriva de tres repeticiones más (SINE R, VNTR y *Alu*). Al igual que las secuencias *Alu* no son autónomos, movilizándose en *trans* por la maquinaria de los elementos *L1* (Cordaux y Batzer 2009; Moutri et al., 2007). La movilización de este elemento en el genoma humano es capaz de transducir secuencias genómicas y también puede actuar como un promotor (Moutri et al., 2007; Xing et al., 2006), siendo responsable no solo del "exón shuffling" (Fontdevila et al., 2011, paginas 100 -104), sino también de

proveer un mecanismo para la duplicación de genes y para la evolución de nuevas familias de genes (Xing et al., 2006).

Muchas son las evidencias que sugieren que los ETs pueden dar forma a los genomas a través de la evolución (Muotri et al., 2007). Sin embargo, la implicación de un ETs específico en dicho proceso a veces es difícil de detectar, ya que, por lo general, solo se insertan secuencias cortas de ETs que cambiaran con el tiempo, a la par de la secuencia que lo contiene. Lo que implica que no sería posible observar la totalidad de las secuencias funcionales de los ETs que han sido integradas por los genomas a lo largo del tiempo.

### **1.1.8. Elementos transponibles en estudio**

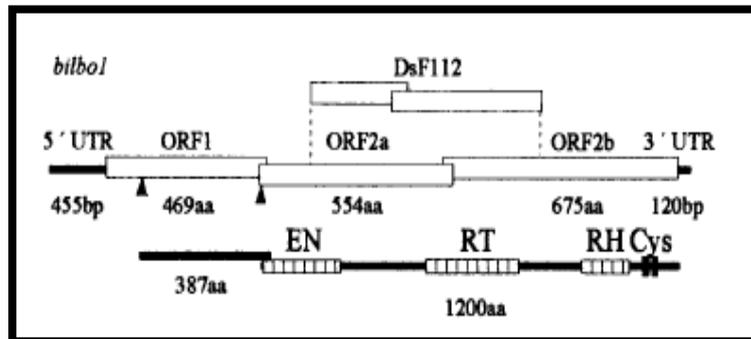
#### **a. Elemento transponible *bilbo***

Blessa y Martínez (1997) describieron en *Drosophila subobscura* una familia de elementos transponibles no LTR, llamada *bilbo*, su nombre fue inspirado en el nombre del personaje principal de la obra literaria “el Hobbit” (Bilbo Bolson) de J.R.R. Tolkien. La secuencia y estructura de *bilbo* son muy parecidas a otros elementos no LTR, particularmente con los elementos TRIM (Terminal-repeat retrotransposons in miniature) de *D. miranda* y LOA de *D. silvestris*. Una de las copias descritas fue *bilbo 1* (5530 pb), que fue definido como un elemento defectuoso, ya que presentaba una delección de dos pares de bases en el ORF2. Esta copia de *bilbo* se encuentra inserta en un gen denominado *genxDs. Bilbo 1* presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2), regiones sin traducir (UTR 5' y 3'), y al igual que otros elementos de *Drosophila* (R1, LOA, TRIM y I) o de otras especies, no presenta colas poli A (figura 2). Por otra parte *bilbo1*, también presenta homología con el factor *I* de *D. teissieri* (con los dominios EN, RT, y RNase H y motivos zinc-finger).

El elemento *bilbo 1* y los elementos TRIM y LOA, posiblemente tienen un ancestro común; las diferencias estructurales que presentan hoy día pueden ser consecuencia de la diferenciación y/ó la especialización de sus mecanismos de transposición. De esta manera, la estructura actual de *bilbo* posiblemente derive de una compleja estructura ancestral de elementos no LTR que fue perdiendo

diferentes dominios. Aunque su origen exacto se desconoce, los análisis filogenéticos y estructurales de diferentes elementos transponibles apoyan esta idea (Blesa y Martínez, 1997).

**Figura 2. Estructura del clon *bilbo1*.**



Las cajas vacías representan los ORFs. Las líneas bajo las cajas hacen referencia a las proteínas posibles de un supuesto elemento activo. Las puntas de flecha en negro indican la posible posición del codón de iniciación. Las cajas verticales en negro indican los motivos zinc-finger (Cys). UTR: regiones sin traducir, ORF: marco de lectura abierto, EN: endonucleasa, RT: transcriptasa reversa, RH: RNasa H. Fuente: Blesa y Martínez (1997).

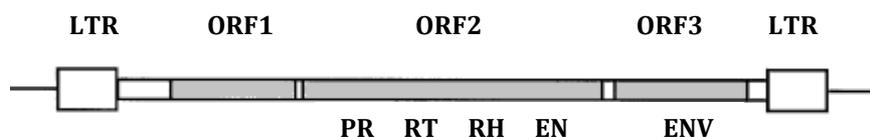
Blesa et al. (2001) determinaron la distribución de *bilbo* en diferentes especies demostrando que está presente en la mayoría de las especies de *Drosophila*, especialmente del grupo *obscura* exceptuando a *D. bifasciata*. La presencia de *bilbo* en las especies basales de la familia *Drosophilidae*, y en las demás especies analizadas en ese estudio, indicaron que un ancestro común de la familia *bilbo* estuvo presente al comienzo de la radiación de *Scaptodrosophila*, lo que sugiere un origen muy antiguo de este elemento. Los descendientes de esta secuencia ancestral han divergido durante los procesos de especiación y en algunas otras especies, e incluso en algunos subgrupos, se han perdido los elementos de esta familia. Blesa et al. (2001) también demostraron que la transmisión de *bilbo* se ha hecho de manera vertical en las especies del grupo *obscura*, en donde ha sido transmitido de padres a hijos desde su aparición.

### **b. Elemento transponible *gypsy***

Los retrotransposones de la familia Gypsy están presentes en una amplia variedad de especies de diferentes grupos tales como: insectos, invertebrados marinos, levaduras, hongos y plantas. El elemento *gypsy* es uno de ellos y se ha descubierto en diferentes especies de *Drosophila* tales como *D. melanogaster* y *D. subobscura* entre otras. En *D. subobscura* este elemento es de 7.522 pb de longitud y

contiene dos LTRs idénticas de 613 pb y tres ORFs (figura 3), su estructura es muy parecida al *gypsy* de *D. melanogaster*. En ambas especies este elemento se encuentra transcripcionalmente activo pero, a diferencia de esta última, en *D. subobscura* no se ha encontrado todavía ninguna copia con un ORF3, codificante para la proteína Env, potencialmente activo (Alberola et al., 1997; Alberola y de Frutos, 1996).

**Figura 3. Estructura del elemento *gypsy* de *D. subobscura*.**



Las cajas vacías de los extremos representan las LTRs: Repeticiones terminales largas; Las cajas grises representan los ORFs, Marco de lectura abierto (1, 2 y 3); PR, Proteasa; RT, transcriptasa inversa; RH, RNasa H; EN, endonucleasa; ENV, proteína de la envoltura. Fuente: modificado de Alberola et al. (1997).

El elemento *gypsy* de *D. melanogaster* ha sido clasificado tradicionalmente como un elemento LTR, no obstante, este pequeño grupo de retrotransposones de insectos, se diferencia de otros porque contiene tres marcos de lectura abiertos (ORFs): los dos primeros corresponden a los genes retrovirales *gag* (ORF1) y *pol* (ORF2), que son necesarios para el movimiento a nivel intracelular, y el ORF3 corresponde en tamaño y localización genómica con el gen *env* que codifica para la envoltura proteica en los virus, necesaria para la infección extracelular.

Los estudios filogenéticos muestran que los retrovirus de vertebrados han evolucionado de los elementos transponibles LTR al adquirir un dominio Env. Esto ocurrió en diferentes grupos de animales y plantas, y en varios casos la adquisición de este dominio ha sido reciente, lo que ha permitido identificar el origen de los genes. El mejor ejemplo estudiado hasta el momento de la adquisición de este dominio es el del elemento *gypsy* de *D. melanogaster*. Varios estudios han demostrado que *gypsy* infecta oocitos de *Drosophila*, y que es el gen *env* el responsable de la infección, por tanto, actúa como un verdadero retrovirus al presentar esta capacidad infecciosa, lo que sugiere que los miembros ancestrales

de estos elementos podrían ser el origen de los retrovirus (Eickbush y Jamburuthugoda, 2008; Alberola et al., 1997; Kim et al., 1994; Song et al., 1994).

Las secuencias homólogas del elemento *gypsy* de *D. melanogaster* se encuentran ampliamente distribuidas en las especies de *Drosophila*, al igual que los retrotransposones *copia* y *1731*. La distribución de los elementos *gypsy* es consistente con la hipótesis de un origen antiguo de estas secuencias presentando, probablemente, un ancestro común cercano a la radiación de *Drosophila*, que fue posteriormente transmitido de manera vertical. No obstante, las complejas relaciones filogenéticas de las secuencias tipo *gypsy* en especies de *Drosophila*, y de otras que no están relacionadas, sugieren que la transferencia de *gypsy* se ha hecho de manera horizontal en los principales grupos taxonómicos, lo que ha contribuido a la generación de la actual familia *gypsy* (Alberola et al., 1997; Alberola y de Frutos, 1996).

Los estudios comparativos entre especies de *Drosophila*, realizados por Alberola y de Frutos, 1996, mostraron que *gypsy* podría estar transcripcionalmente activo en diferentes especies, lo que indicaría que los motivos de las proteínas codificadas por estos ORFs se han conservado a través del tiempo. Las regiones más conservadas las encontraron en el ORF2; sus dominios putativos, PR, RT, RH y EN, son homólogos con los del gen *pol* encontrado en los retrovirus y se encuentran en el mismo orden. El ORF1 presenta muchos más cambios, como la falta del motivo de unión del ARN, aunque presentan regiones ricas en arginina que podrían asumir esta función. En *Drosophila* los genes *gag* y *pol* son funcionales, no obstante en especies como *D. subobscura* y *D. virilis* los motivos necesarios para la producción de una envoltura proteica se encuentran truncados. Aunque la proteína del ORF3 ha perdido su funcionalidad, el mecanismo de *splicing* y el resto de la secuencia se encuentran altamente conservados (Alberola y de Frutos, 1996; Song et al., 1994).

## **1.2. *Drosophila subobscura***

*D. subobscura*, es una especie paleártica que presenta una distribución muy amplia: desde el norte de África, hasta la península escandinava (Prevosti et al., 1988), encontrándose actualmente también en el continente americano. Esta especie

colonizó Suramérica y Norteamérica hace 30 años aproximadamente (Beckenbach y Prevosti, 1986; Brncic et al., 1981). Se detectó por primera vez en Puerto Montt (Chile) en 1978 (Brncic et al., 1981) y hoy día presenta una amplia distribución geográfica en el territorio chileno (desde La Serena hasta Punta Arenas). En Argentina, se detectó por primera vez en 1981 (Fernández et al., 2009; Ayala et al., 1989) y en el noroeste de EEUU (Port Townsend, Washington, EE.UU) en 1982 (Fernández et al., 2009; Ayala et al., 1989).

*D. subobscura* se difundió rápidamente sobre amplias áreas tanto de Suramérica, como de Norteamérica (Fernández et al., 2009; Ayala et al., 1989; Brncic et al., 1981). El escenario de colonización que presenta esta especie ha sido propicio para el estudio del impacto de la colonización en la dinámica y distribución de los ETs en el genoma de esta especie (García Guerreiro et al., 2008).

### **1.3. Estudios de *bilbo* y *gypsy* en poblacionales colonizadoras de *Drosophila subobscura***

*Drosophila* ha jugado un papel muy importante en los estudios sobre la dinámica y divergencia de los ETs, en las poblaciones naturales. Más allá de las diferentes herramientas genéticas disponibles (marcadores, clones de ETs, etc.), *Drosophila* ofrece a los geneticos de poblaciones dos ventajas principales: en primer lugar, en el genoma de *Drosophila* no se han acumulado grandes cantidades de copias ancestrales y fijas de ETs en zonas ricas de genes (el 69 % de este genoma es eucromatina). Este patrón es muy diferente en humanos donde la frecuencia de la mayoría de las inserciones eucromáticas de ETs observadas es alta. Una razón que puede explicar esta discrepancia, es el tamaño efectivo poblacional que en los seres humanos es mucho menor que el de *D. melanogaster*, ya que el tamaño efectivo de la población tiene un papel importante en la teoría de la dinámica poblacional y la distribución de los ETs (Lynch, 2007, paginas 69-100). Y en segundo lugar, la capacidad técnica para mapear físicamente la secuencia del ADN como de ETs en cromosomas politénicos de *Drosophila*, proporciona un eficaz método para caracterizar la variación genética de las posiciones genómicas ocupadas por ETs (Lee y Langley, 2010).

Por otra parte, los procesos de colonización reciente presentan una excelente oportunidad para investigar las consecuencias genéticas del efecto fundador, así como también, los caminos evolutivos que sufren las poblaciones recién establecidas en un nuevo entorno. El éxito de las especies colonizadoras depende de su habilidad de adaptarse a su nuevo ambiente. Esta adaptación puede darse durante su establecimiento inicial, así como también, durante su expansión, en respuesta a presiones de selección. La deriva genética también puede jugar un papel importante y determinante en los procesos de colonización. Por tanto, cuando una especie independiente coloniza varias áreas, el resultado de este proceso y la convergencia de los resultados en diferentes áreas pueden depender del *pool* genético específico de los colonizadores, así como también de la dinámica poblacional y los procesos selectivos asociados a la colonización (Pascual et al., 2007).

Los choques genéticos, los mecanismos epigenéticos y los factores ambientales, pueden afectar la dinámica de los ETs en el genoma. Los procesos de colonización pueden enfrentar el genoma hospedador con algunos de estos aspectos y desencadenar mecanismos de activación y/o supresión de los ETs, que consecuentemente pueden verse aumentados en número, cambiando sus frecuencias y niveles de expresión en el genoma hospedador (García Guerreiro et al., 2008).

Para poder entender con claridad la influencia a nivel evolutivo de los ETs y los mecanismos que favorecen ó detienen su actividad, mediados por procesos de colonización, se han realizado estudios de la distribución de los sitios de inserción de los ETs, en cromosomas extraídos de poblaciones naturales. Los estudios de la distribución, de los sitios de inserción de los ETs *bilbo* y *gypsy* en cromosomas de *Drosophila subobscura*, hacen parte de los trabajos que se han realizado con este fin.

Los resultados de las investigaciones que se han realizado en poblaciones originales vs colonizadoras de *D. subobscura*, particularmente de los ETs *bilbo* y *gypsy* (García Guerreiro et al., 2008), muestran que en las poblaciones colonizadoras existen altas y bajas frecuencias de inserción. La deriva fundadora, es el fenómeno propuesto hasta el momento para explicar esta distribución

bimodal de las frecuencias. Sin embargo, los trabajos realizados en *Drosophila buzzatii* de los ETs *Osvaldo* e *Isis*, no descartan la existencia de puntos calientes de inserción producto de eventos de transposición durante la colonización (García Guerreiro y Fontdevila, 2011, 2007; García Guerreiro et al., 2008; García Guerreiro y Fontdevila, 2001). Estas nuevas evidencias, hacen interesante el estudio a nivel molecular de los lugares de inserción de los ETs, para la determinación de los factores que pueden afectar las frecuencias de estos elementos móviles durante los procesos de colonización. De esta manera, en el presente estudio se planteó el análisis comparativo de los lugares con altas tasas de inserción de los ETs *gypsy* y *bilbo* entre poblaciones originales y colonizadoras. Se esperaba que de existir preferencias de transposición hacia determinadas zonas del genoma las secuencias tanto de *gypsy* como de *bilbo*, así como sus regiones flanqueantes, fueran diferentes en todas las poblaciones, lo que implicaría que existen otras fuerzas evolutivas que están afectando la dinámica y distribución de estos ETs. Por el contrario, si las copias de estos ETs están presentes en las poblaciones y se mantienen en ellas gracias al efecto fundador, generado por la colonización, seguido de un proceso de deriva genética (deriva fundadora), se esperaba que las secuencias de *gypsy* y *bilbo* no presentaran cambios entre ellas y que, además, se encontraran en la misma posición en el genoma.

Por otra parte, se sabe que los procesos de colonización pueden aumentar la tasa de transposición de los ETs. No obstante, hasta el momento no se habían realizado estudios de las tasas de expresión y transposición de *gypsy* y *bilbo* en *D. subobscura*. Por tanto, era necesario desarrollar un estudio comparativo de las tasas de expresión de estos ETs entre poblaciones colonizadoras y originales, con el fin de dilucidar el verdadero efecto de la dinámica poblacional en los procesos de transposición en poblaciones sujetas a eventos de colonización. Por tanto, si existen copias activas de *gypsy* y/o de *bilbo*, en el genoma de estas moscas, y si, además, la tasa de transposición se ve afectada por los procesos de colonización, se observarían patrones diferentes de expresión y transposición en las poblaciones colonizadoras con respecto a las originales. Bajo todos estos preceptos se realizó esta tesis doctoral.

## 1.4. OBJETIVOS

### 1.4.1. Objetivos generales

- 1) Comprobar si los lugares de alta frecuencia de inserción de los ETs *bilbo* y *gypsy* en poblaciones originales y colonizadoras de *Drosophila subobscura* son debidos únicamente a deriva fundadora ó a eventos de transposición hacia determinados lugares cromosómicos.
- 2) Determinar si la colonización modifica los niveles de expresión de estos elementos transponibles a través de su comparación en diferentes poblaciones originales y colonizadoras.
- 3) Determinar en estas mismas poblaciones, por medio del método del transposon display, las tasas de transposición del elemento *gypsy*.

### 1.4.2. Objetivos específicos

Rastrear una genoteca de la población colonizadora de Maipú (Argentina) de *Drosophila subobscura* usando sondas marcadas de los elementos *bilbo* y *gypsy*.

Aislamiento, hibridación *in situ* y posterior secuenciación de clones de *bilbo* y *gypsy* que ocupen sitios definidos en las poblaciones de estudio.

Comparar la ubicación y la secuencia de los clones de alta y baja ocupación entre las diferentes poblaciones (originales y colonizadoras) en estudio.

Extraer RNA mensajero (mRNA) de individuos F<sub>2</sub> de 5 poblaciones originales y 6 colonizadoras.

Realizar PCRs a tiempo real para cuantificar la cantidad RNA mensajero (mRNA) de los elementos transponibles *bilbo* y *gypsy* presente en las poblaciones analizadas.

Analizar los patrones de expresión entre las poblaciones (originales y colonizadoras) en estudio.

Realizar cruces individuales intraespecíficos (1macho x 1hembra) de poblaciones originales y colonizadoras de *D. subobscura*.

Extraer ADN genómico de parentales y de descendientes F1.

Estandarizar la técnica de transposon display y procesar las muestras bajo esta técnica.

Genotipar las muestras a través de la técnica de electroforesis capilar.

Estimar las tasas de transposición en cada población y analizar estadísticamente los datos.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Material biológico

#### Cepa *Ch- cu*

La localización de los clones positivos se realizó en preparaciones cromosómicas de glándulas salivares de individuos de la línea control *ch-cu* de *Drosophila subobscura* mantenida en el laboratorio mediante cruce masal. Esta línea fue usada como cepa control ya que presenta posiciones estándar para los elementos transponibles *gypsy* y *bilbo* (tabla 1) que se mantienen a través de las generaciones. Esta característica es propia de las líneas puras en las que se considera estable la localización de ETs a través del tiempo (Biémont y Aouar, 1987; Pierce y Lucchesi, 1981).

La cepa *ch-cu* es altamente homocigota para los marcadores recesivos del cromosoma O: *ch* (color de ojos *cherry*, rojo brillante), y *cu* (alas *curled*, curvadas cóncavas hacia arriba (García Guerreiro et al., 2008; Thompson, 1997; Koske y Smith, 1954). Además, es homocariotípica para los rearrreglos cromosómicos  $A_{st}$ ,  $J_{st}$ ,  $U_{st}$ ,  $E_{st}$  y  $O_{3+4}$  (García Guerreiro et al., 2008; Fernández Iriarte et al., 2003; Lankinen y Pinsker, 1977). Características útiles para el control de la pureza de la cepa, ya que cambios en los fenotipos y en la estructura cromosómica son indicios de contaminación con individuos de otras cepas. Posibilidad que siempre se considera pese al estricto control con el que se mantienen en el laboratorio.

**Tabla 1. Posiciones cromosómicas estándar de los ETs *bilbo* y *gypsy* en la cepa mutante *ch cu* de *D. subobscura*.**

Cromosoma	Señales estándar de <i>bilbo</i>	Señales estándar de <i>gypsy</i>
<b>A</b>	16A, 3A, 6A, 7A, *	7C
<b>J</b>	29C, 35E, 18A/D, 21A, *	*
<b>U</b>	46A, 46C, 37A, 38B, *	52A
<b>E</b>	56A, 55D, 74D, *	*
<b>O</b>	99C, 91C, 84C, 82A, 78B, *	*

(\*) Señales centroméricas y pericentroméricas. Cada señal de hibridación está denominada con una letra que hace referencia a la región cromosómica y con un número que corresponde al número de la banda a lo largo del cromosoma.

## Poblaciones naturales

Para la primera parte del estudio consistente en la búsqueda por PCR de las copias secuenciadas de *gypsy* y *bilbo*, se usaron individuos conservados en alcohol al 75% a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  e individuos de cepas de laboratorio (tabla 2). Las poblaciones incluidas en esta primera parte del estudio fueron 23 de las cuales 10 eran originales y 13 colonizadoras (ver C en tabla 2 y figuras 4-6).

Para los análisis de tasas de expresión se involucraron individuos vírgenes  $F_1$  de cruces intrapoblacionales fundados con poblaciones recién traídos de la naturaleza de 5 poblaciones originales y 6 colonizadoras (ver Te, en tabla 2, y figura 4 y 6).

Finalmente, para el análisis de tasas de las tasas de transposición se incluyeron individuos vírgenes de cruces intrapoblacionales fundados con individuos que llevaban más de 20 generaciones en el laboratorio, descendientes a su vez de las mismas poblaciones recién traídas de la naturaleza que se incluyeron en el análisis de las tasas de expresión (ver Tt, en tabla 2, figuras 4 y 6). Todos los individuos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a una temperatura constante de  $18^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 2. Poblaciones analizadas.**

Colonizadoras Suramérica	Nº	Poblaciones	Tipo de muestra	Tipo de análisis
Argentina	1	Maipú	Cepa	C
Chile	2	Puerto Montt	Cepa, (*)	C, Te, Tt
	3	Santiago	En alcohol, (*)	C, Te, Tt
	4	La Serena	En alcohol	C
	5	Laja	En alcohol, (*)	C, Te, Tt
	6	Coyhaique	En alcohol	C
	7	Valdivia	En alcohol, (*)	C, Te, Tt
	8	Curicó	(*)	Te, Tt
	9	Chillán	(*)	Te, Tt
<b>Norteamérica</b>	10	Davis	En alcohol	C
Estados unidos	11	Bellingham	En alcohol	C
	12	Salem	En alcohol	C
	13	Port Hardy	En alcohol	C
	14	Eureka	En alcohol	C
	15	Medford	En alcohol	C

## Continuación de la Tabla 2.

Originales Europa	Nº	Población	Tipo de muestra	Tipo de análisis
Portugal	16	Sintra	Cepa	C
	17	Madeira	Cepa, (*)	C; Te
España	18	El Perelló	Cepa	C
	19	Bordils	Cepa	C
	20	Bellaterra	Cepa, (*)	C, Te, Tt
	21	Tenerife	Cepa	C
	22	Bilbao	(*)	C
	23	El Pedroso	(*)	Te
Francia	24	Dijon	Cepa	C
	25	Montpellier	Cepa	C
Países bajos	26	Groningen	Cepa	C
Dinamarca	27	Aarhus	Cepa	C, Te, Tt

(\*): F<sub>1</sub> de cruces fundados con individuos recién traídos de la naturaleza; C: Análisis poblacional de clones de *gypsy* y *bilbo*; Te: tasa de expresión de *gypsy* y *bilbo*; Tt: tasas de transposición de *gypsy*.

**Figura 4. Distribución geográfica de poblaciones colonizadoras suramericanas en estudio.**



**Figura 5. Distribución geográfica de poblaciones colonizadoras norteamericanas.**



**Figura 6. Distribución geográfica de poblaciones originales europeas.**



## 2.2. Extracción de ADN genómico

Todas las extracciones de ADN se realizaron usando el protocolo de extracción de ADN total a partir de un individuo adulto. Para las extracciones de ADN de más de un individuo se modificó este protocolo usando el doble de las soluciones I, II y III anotadas en los pasos 2-4 del protocolo, en estos casos el último paso consistía en

someter el ADN a una purificación con fenol cloroformo isoamílico (25: 24: 1). Los individuos que se conservaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alcohol se dejaban secar al aire para poder iniciar el protocolo.

### 2.2.1. Protocolo de extracción

- Las moscas dormidas con hielo o descongeladas se depositan en un tubo eppendorf.
- Se agrega 160  $\mu\text{l}$  de **Solución I** fría (Trizma base 10 mM; NaCl 60 mM; Sacarosa 5%; EDTA 10mM; pH de 7,8) y se homogeniza suavemente con varilla.
- Se agregan 200  $\mu\text{l}$  de **Solución II** (Trizma base 30 mM; SDS 1,25%; Sacarosa 5%; EDTA 10mM; pH 8), se agita por inversión varias veces y se incuba a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30'.
- Se agregar 60  $\mu\text{l}$  de **Solución III** (60 ml Acetato de Potasio 5M; 11,5 ml Ácido acético glacial; 28,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), se agita por inversión varias veces y se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20'.
- El material congelado se centrifuga durante 15' a 13000 r.p.m. Se recupera el sobrenadante y se transfiere a un nuevo eppendorf; se centrifuga nuevamente 10' y se decanta el sobrenadante a otro eppendorf.
- Se precipita el sobrenadante agregando el mismo volumen de isopropanol (aproximadamente 400  $\mu\text{l}$ ), se agita por inversión y se incuba a temperatura ambiente durante 5'.
- Se centrifuga 10' minutos, y se decanta el sobrenadante; dejando invertido el tubo sobre papel absorbente para eliminar los restos del isopropanol (2' aproximadamente).
- Se lava el precipitado (pellet), con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% frío, desprendiendo el pellet de la pared del tubo (sin resuspenderlo). Se centrifuga 5' y se descarta el sobrenadante.
- Finalmente se deja secar el pellet al aire o al vacío durante 10-15', una vez este seco se debe resuspender en agua bidestilada estéril. El volumen del agua dependerá del tamaño del pellet. Para las extracciones de ADN de más de un individuo se resuspendía el pellet en 100  $\mu\text{l}$  de agua.

#### \* Paso opcional para extracciones de más de un individuo

- Se agrega fenol cloroformo isoamílico (25: 24: 1), (1:1) se debe agitar varias veces invirtiendo el tubo eppendorf, luego se centrifuga 3' a 13000 r.p.m. Posteriormente se recupera la fase acuosa en un nuevo tubo y se agregan 0,1 volúmenes (v) de acetato de sodio y 2,5 v de etanol absoluto frío, se debe invertir varias veces el tubo hasta que se forme un precipitado en forma de algodón, se centrifuga 15' y se decanta el sobrenadante, a continuación se agregan 400  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 %, se centrifuga 5' se decanta el sobrenadante y se deja secar el pellet. Finalmente, el ADN se hidrata con

aproximadamente 50  $\mu$ l de agua estéril bidestilada (el volumen puede variar dependiendo del tamaño del pellet).

### 2.3. Extracción de ADN de fagos lambda

Se utilizó el protocolo de Maniatis et al. (1982) modificado a fin de hacer más eficiente el proceso:

- Para 90 ml del contenido resultante de la lisis de fagos se realizan dos períodos de centrifugación de 10' a 9500 r.p.m. cada uno.
- El sobrenadante se trata con 1 $\mu$ g/ $\mu$ l de RNasa y 20  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNAsa durante 1h a 37°C para degradar el RNA y garantizar que el ADN extraído este limpio.
- Se centrifuga el sobrenadante durante 1h: 30' a 20000 r.p.m.
- Se descarta el sobre nadante y se deja secar muy bien el pellet, aproximadamente 1h a temperatura ambiente.
- Se resuspende el pellet con Tris HCl 50mM pH 8.0.
- Extracción del ADN de fagos lambda siguiendo el método de fenol cloroformo.
- Cuantificación y verificación del ADN a través de electroforesis en geles de agarosa (0.6 %) usando un marcador de peso molecular.

### 2.4. Células competentes

Se usaron dos tipos de células competentes durante el desarrollo de este trabajo: las XL1-Blue MRA (P2) y las TAP 90. Las células XL1-Blue MRA (P2) fueron usadas para la ampliación de la genoteca, y las células TAP 90 se usaron para propagar los fagos Lambda que contenían un clon particular de la genoteca y poder realizar la posterior extracción de ADN del mismo.

Tratamiento de células competentes

Tras la siembra en placa, una única colonia fue escogida para obtener las células componentes, éstas crecieron en medios de LB con maltosa (0.2 % p/v) y MgSO<sub>4</sub> (0.5 mM) a excepción de las TAP 90 que sólo requieren medio LB para su crecimiento. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 4–6 horas ó hasta que se logró una lectura de densidad óptica de OD<sub>600</sub> igual a uno. Se hicieron diluciones de las mismas con medio MgSO<sub>4</sub> (10 mM) hasta lograr una OD<sub>600</sub> de

0.5 que es la óptima para el crecimiento de los fagos con respecto a la concentración agregada de los mismos.

## **2.5. Amplificación de una genoteca de la población de Maipú de**

### ***Drosophila subobscura***

Para la primera parte del presente estudio, se me suministró una genoteca de ADN genómico de la población argentina de Maipú (García Guerreiro et al., 2008), de la cual se aislaron clones mediante la hibridación con sondas específicas de los elementos *gypsy* y *bilbo*, siguiendo los pasos descritos a continuación. Estos clones fueron posteriormente localizados mediante hibridación *in situ* en la cepa de referencia *ch-cu*, con el fin de seleccionar aquellos que correspondieran a posiciones únicas eucromáticas no detectadas previamente en esta cepa. A continuación, cada clon fue secuenciado y amplificado mediante PCR en diferentes poblaciones naturales.

#### **2.5.1. Titulación de la genoteca**

Se realizó una titulación de la genoteca amplificada realizando diluciones de  $10^{-2}$  -  $10^{-9}$  con el fin de comprobar la concentración óptima de crecimiento de los fagos. La concentración óptima fue  $10^{-4}$ ; de esta dilución se tomaron 80  $\mu$ l y se mezclaron con 600  $\mu$ l de células XL1-Blue MRA (P2), después de la incubación se sirvieron en placas de medio NZYM Broth (medio enriquecido con NZ amino A, NaCl, extracto de levadura y  $MgSO_4$ ). Las placas se incubaron de 6 a 8 horas o hasta que se observaron calvas en el medio. Se guardaron las placas a 4°C dos horas mínimo antes de fijar las colonias a los filtros.

#### **2.5.2. Marcaje de sondas**

Se usaron dos tipos de sondas de los elementos: una para rastrear la genoteca y otra para la hibridación *in-situ*. Las sondas de los elementos *gypsy* (2.8 Kb) y *bilbo* (2.6 kb) se obtuvieron mediante PCR, y fueron usadas para el rastreo de la genoteca y como sonda control en las hibridaciones *in-situ*.

Los cebadores utilizados para la obtención de estas sondas amplifican la zona de la reverso transcriptasa de cada uno de los elementos canónicos (García Guerreiro et al., 2008). Los cebadores usados fueron:

#### **Cebadores para *gypsy***

DIRECTO: 5'GCTAAGAACCATAACGCCG3'  
 REVERSO: 5'GATGTTGTCTTGCTGTGC3'

#### **Cebadores para *bilbo***

DIRECTO: 5'CTCGATTTGAGGCGATGTG3'  
 REVERSO: 5'ACGGATTGCTGCCATTTCTG3'

Las demás sondas marcadas para la hibridación *in-situ* se obtenían del ADN resultante de la lisis de fagos de los clones positivos. Las sondas usadas para la hibridación *in-situ* no fueron predigeridas ya que los brazos del fago no presentan homología con el genoma de *Drosophila*.

El marcaje de todas las sondas fue no radiactivo, basado en la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina (Labrador, 1994). El procedimiento de marcaje se hace a través de random primer labelling (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para comprobar que la sonda quedó debidamente marcada, se realizó un Dot Blot en donde se comparan las distintas intensidades de coloración del DNA problema con un control marcado de concentración conocida.

#### **2.5.3. Transferencia de ADN a filtros de nylon**

Una vez se observaron las calvas en las placas de medio NZYM Broth, después de la incubación toda la noche a 37°C y luego de estar dos horas a 4°C, se transfirieron las colonias de fagos a una membrana de nylon durante 2'. Esta membrana fue tratada con una solución de desnaturalización (1.5 M de NaCl, 0,5 M y 0.5 M NaOH) durante 2' y posteriormente con una solución de neutralización (1.5 M de NaCl, y 0.5 Tris - HCl pH = 8) durante 5'. A continuación se realiza un segundo lavado durante 30" con una solución de 0.2 M Tris - HCl (pH = 7.5) y 2xSSC. Posteriormente, se dejan secar los filtros al aire sobre papel whatman (3mm), y

una vez secos se exponen a la radiación ultravioleta durante 5' para fijar el ADN a la membrana.

#### **2.5.4. Hibridación del ADN fijado al filtro**

La hibridación y posterior revelado de los filtros se realizó siguiendo el Manual Lambda DASH II/BamH I de la casa comercial Stratagene, con modificaciones hechas por el Grupo de Biología Evolutiva. Los filtros previamente fijados se lavaron con una solución de 6 x SSC durante 2'. Posteriormente fueron prehibridados a 42 °C toda la noche con la solución de hibridación (SSC x 5, formamida 50 %, N-lauroilsacosina 0.1 %, SDS 0.02 % y agente bloqueante 2.5 %). La hibridación se hizo incubando toda la noche el filtro prehibridado con la sonda previamente desnaturalizada a 95 °C. Después de la hibridación fue necesario lavar los filtros 2 veces durante 5', cada vez, con soluciones de 2 x SSC + 0,1 % SDS. Posteriormente se deben realizar 2 baños de astringencia durante 15', cada vez, a 68 °C con 0,1 x SSC + 0.1 % de SDS. Los filtros se pueden usar de inmediato para la detección del ADN hibridado o bien se pueden secar al aire sobre papel whatman (3mm) y guardarse para una detección posterior.

#### **2.5.5. Detección del ADN marcado**

El revelado de los filtros se realizó para detectar las colonias que contenían clones con los elementos problema. Para ello los filtros se sometieron a diferentes lavados: 2 veces durante 3' con la solución 1 (Tris 100mM + NaCl 150mM, con pH 7,5), 1 vez durante 30' con la solución 2 (Agente bloqueante 0.5 % en solución 1), y 2 veces por 5' con la solución 3 (Tris 100mM + NaCl 100mM + MgCl<sub>2</sub> 50mM, a pH 9,5). Los filtros se incubaron con un anticuerpo (Anti-Digoxigenin - Ap 1:5000 anticuerpo-solución 1) durante 30 minutos. Finalmente se dejaron revelando en ausencia de luz, con una solución tinción (nitro blue tetrazolum chloride (NBT) + 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (X-fosfato)). Una vez se observaron puntos color morado en el filtro, estos fueron lavados con agua destilada y secados al aire libre. La presencia de los puntos coloreados hace referencia a calvas que han hibridado con la sonda marcada (clones positivos).

### **2.5.6. Aislamiento y repurificación de clones de la genoteca**

Las calvas que se tipificaron como clones positivos se enumeraron en el filtro revelado. Con este patrón cada calva escogida fue picada y guardada a 4°C en tubos eppendorf con 250 µl de medio SM. Posteriormente se procedió a la repurificación que es un paso indispensable en el aislamiento de los clones, ya que permitió amplificar la calva y descartar falsos positivos. Se hicieron siembras de células P2 con diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de las calvas individuales recuperadas (picadas), mezclados con Top Agar NZYM y servidas en placas de NZYM Broth. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

Dado que cada placa resultante de la repurificación contenía copias de un único clon, se recuperaron 4 calvas individuales con pipetas Pasteur en 500 µl de solución SM en tubos eppendorf y se dejaron en agitación suave toda la noche a 4°C

### **2.5.7. Lisis del vector (Fago Lambda)**

Se agrega 1 ml de células competentes TAP90 con 100 µl de calvas repurificadas, previamente incubadas durante 20 minutos en hielo, a un Erlenmeyer de 250 ml que contienen 30 ml de medio LB y 150 µl de  $\text{CaCl}_2$ . La mezcla se incubó, agitando vigorosamente (280rpm), a 39°C. La lisis de los fagos se hizo posible al cabo de 6-8 horas de incubación, durante las cuales fue necesario cada dos horas agregar la misma cantidad de LB y  $\text{CaCl}_2$  adicionada al inicio del proceso de lisis. La finalización del proceso de lisis se detecta por la presencia de pequeños hilos que corresponden a restos celulares fácilmente reconocibles y que el medio se torna transparente o menos opaco. Al terminar la lisis se agregan 100 µl de cloroformo y se deja en agitación durante 10' para desproteinizar el ADN resultante.

## **2.6. Hibridación in situ sobre cromosomas politénicos**

Para la obtención de preparaciones de larvas de la cepa *ch cu* se siguió el protocolo descrito en Labrador et al. (1990), y para la hibridación *in situ* los procedimientos descritos en Labrador y Fontdevila (1994). La Prehibridación y posthibridación se hicieron siguiendo el protocolo de Schmidt (1992) publicado por Roche.

### **2.6.1. Obtención de preparaciones de cromosomas**

Se utilizaron larvas de tercer estadio que crecieron a una densidad poblacional óptima, para favorecer una excelente alimentación y por ende obtener glándulas en muy buen estado de desarrollo.

Las glándulas salivares se extrajeron en NaCl al 0.8 % retirando toda la grasa que fue posible y dejándolas 1 minuto en ácido acético al 45 % y luego 4-8 minutos en una solución fijadora 1:2:3 (ácido láctico: agua: ácido acético), que se depositó en un cubreobjetos limpio y previamente siliconizado. Posteriormente se recogieron con un portaobjetos y se extendieron para romper los núcleos, separar y distender los cromosomas. A continuación se observaron al microscopio de contraste de fases, reiterando la extensión de la glándula cuantas veces fuera necesaria hasta lograr separar muy bien los cromosomas. Una vez se observó que los cromosomas estaban bien separados y en óptimas condiciones para la hibridación, se retiró el exceso de solución fijadora. Las preparaciones se guardaron de un día para otro a 4°C retirándoles posteriormente el cubreobjetos con nitrógeno líquido y dejándolas durante dos horas en etanol absoluto frío para que los cromosomas se deshidraten. Finalizado el proceso se procedió a una nueva selección de preparaciones aptas para la hibridación.

### **2.6.2. Prehibridación**

Las preparaciones se incuban a 65 °C en 2xSSC durante 30 minutos y a continuación se sumergieron en etanoles precalentados de 70 % (dos veces) y 95 % durante 10 minutos cada uno. A continuación se dejaron secar al aire libre para

guardarse a 4°C ó bien ser hibridadas de inmediato de acuerdo a la dinámica de trabajo de laboratorio.

### **2.6.3. Hibridación *in situ***

Las preparaciones prehibridadas se sumergieron en una solución 0,1 N de NaOH durante 90 segundos para desnaturalizar el ADN, teniendo mucho cuidado de no dejarlos durante más tiempo ya que el hidróxido de sodio puede quemar los cromosomas y estos no hibridarían ó no se lograría ver el bandeo. De inmediato las preparaciones se lavaron con 2xSSC dos veces durante un minuto cada uno y se deshidrataron con etanoles al 30%, 50%, 70% y 95% durante 5 minutos en cada uno, a temperatura ambiente. La solución de hibridación se preparó minutos antes de su utilización con 50% de formamida, 0,1 % de SDS, 5xSSC, 20 ng de sonda marcada por preparación y agua hasta un volumen final de 20 µl. La cantidad del ADN marcado dependerá de la estandarización para cada sonda, es decir lo que se determine óptimo para evitar que las preparaciones se manchen. En las preparaciones deshidratadas y secas se marcó el lugar en el que se encuentran los cromosomas. Sobre un portaobjetos limpio se agregaron los 20 µl de solución de hibridación recogiénola de inmediato con un portaobjetos e incubando a 37°C, toda la noche a oscuras en una cámara humedecida con 2xSSC.

### **2.6.4. Post-hibridación y revelado**

Se retiraron los cubre objetos sumergiendo las preparaciones en una solución de 2xSSC precalentada a 37°C, de inmediato se lavaron con 2xSSC a 37°C durante 5 minutos y dos más con esta misma solución a temperatura ambiente. Por último se lavaron con una solución de 1xPBS (NaCl + KCl + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, a pH 7,4) dos veces durante cinco minutos.

Para el revelado se incubaron las preparaciones en la solución 1 (Tris 100 mM + NaCl 150 mM, con pH 7) dos veces durante 3 minutos. Se retiró el líquido y de manera horizontal se agregó sobre las preparaciones solución 2 (agente bloqueante 0.5 % en solución 1) durante 30 minutos, se realizaron dos lavados con solución 1 y se volvieron a incubar con el anticuerpo conjugado (1:5000) con la

solución 1, durante una hora. Terminado este tiempo se realizaron lavados con las soluciones 1 y 3 (Tris 100 mM + NaCl 100 mM + MgCl<sub>2</sub>, a pH 9,5) dos veces durante 7 minutos y medio cada uno.

En un ambiente estéril se puso un cubre objetos limpio al que se le agregaron 60 µl de solución de tinción (Para 10 ml: 45 µl de NBT y 35 µl de X-fosfato). De inmediato se recoge la preparación y se pone a oscuras para que el colorante no reaccione con la luz y pueda teñir los cromosomas. Se hicieron chequeos de las preparaciones al microscopio para lavarlas una vez se observe hibridación y evitar que se manchen, en cuyo caso se hace imposible su lectura. Las regiones centroméricas y pericentroméricas sirven como control, ya que son las primeras en teñirse, al igual que las preparaciones hibridadas con una sonda conocida de *gypsy* y *bilbo* cuya hibridación garantiza que el proceso de hibridación se ha realizado en óptimas condiciones.

## **2.7. Localización cromosómica de los clones**

La ubicación de la posición exacta de los clones, en los brazos de los cromosomas, se realizó siguiendo cuidadosamente el mapa estándar (Krimbas, 1993) de cada uno de los cromosomas de *Drosophila subobscura* (tabla 1), en diferentes núcleos en la misma placa y con un mínimo de 4 preparaciones por clon, para evitar falsos positivos.

Los clones de nuestro interés eran los que presentaban las señales estándar para cada elemento (tabla 1) y una única posición de más, de esta manera se intentaba garantizar que el clon presentara una copia del elemento de interés. Las lecturas de los clones que presentaban estas condiciones, también, fueron corroboradas por un experto: el Dr. Joan Balanya de la UB (Universidad de Barcelona) antes de ser secuenciados, tras una cuidadosa lectura realizada por la técnico Montse Peiro, Dra. María del Pilar García Guerreiro y el mío propio, todos integrantes del grupo de genética evolutiva de la UAB (Universidad Autónoma de Barcelona). Una vez secuenciados, sé corroboró su homología con los elementos canónicos *gypsy* y *bilbo*, y se realizó su búsqueda, a través de PCR, en las poblaciones originales y colonizadoras.

## 2.8. Análisis poblacional de los clones de *gypsy* y *bilbo*

Se diseñaron diferentes cebadores (tabla 3), sobre las secuencias editadas de los clones, para realizar la búsqueda, a través de PCR, de las copias de estos clones en las poblaciones originales y colonizadoras. Se usaron múltiples combinaciones de los cebadores diseñados como estrategia para lograr la amplificación de los elementos en las poblaciones y parte de la región flanqueante, como control se usaron cebadores internos de los elemento.

El par de cebadores diseñados sobre la secuencia de *gypsy10* y con los cuales se logró amplificar la LTR de *gypsy*, y secuencia flanqueantes, se encuentra sombreado en la siguiente tabla.

**Tabla 3. Cebadores para análisis poblacional de los diferentes clones secuenciados.**

Cebadores	Secuencia (5'-3')
<b>Clon <i>gypsy1</i></b>	
Directo	ACAACCGATAGTGCCCTTA
Directo	AGCAATCTGTTGCCCTCA
Directo	TTGCTGAGGGTAACAAAGTCCG
Reverso	CCCTCAACGATAGCAAAAG
Reverso	AACGGGAAAGATGCTTGTCG
Reverso	TCATAGCCGAAGAAGGGGTT
Reverso	TTCTCTCTTCTCTCCCTCTC
<b>Clon <i>gypsy10</i></b>	
Directo	TAGGGATAACTGGCTTGTGG
Directo	AGGCAAGGTGTTGTAAGTGG
Directo	ACGGGATAAAGCGACTTTGC
Reverso	AAGGAGAAGGCGAGCATCATTG
<b>Clon <i>bilbo12</i></b>	
Directo	CGTATTGAGCGCAAGAATCA
Directo	GTTCCCCTTCTCTGCATCTC
Directo	TCGATCAAGAACCTCAACCC
Directo	GGGCTGGACTAAGGTTTCATTC
Directo	GCTGGCTGAATACCACAAAC
Reverso	CAACCCAGTTGAGCAGGAC
Reverso	TGAAACTCTTTAGGGGGTGA
Reverso	ACGCTATTCTCTCTGTGCCG
Reverso	CGGTTTATGCGGTTCCAGA
Reverso	ACAACCGAAGAGGCAACGAT

La reacción usada en todas las PCRs del análisis poblacional de los clones se detalla en la tabla 4.

**Tabla 4. Material usado en la mezcla para reacción PCR, amplificación de clones en poblaciones.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (25 µl)</b>
Buffer 10 X con Mg	1x	2,5
dNTPs (2mM)	200µM	2,5
Cebador 1 (16 mM)		0,625
Cebador 2 (16 mM)		0,625
Agua		17,65
Taq (5U/ml)	1U	0,1
ADN*		1

(\*) ADN de las poblaciones en estudio.

### **Protocolo de amplificación:**

5' 94°C; 29 veces (45" 94°C; 45" TM\*; 1':30" 72°C); 10' 72°C; 4º

(\*) La TM dependía de los pares de cebadores usados en cada reacción.

### **2.9. Secuenciación y análisis bioinformáticos**

La secuenciación nucleotídica de los clones *gypsy 1*, *gypsy 10* y *bilbo 12*, así como de la copia de *gypsy 10* encontrada en las poblaciones se realizó a través de la empresa Macrogen inc (Corea). La edición de las secuencias, y posterior alineamiento para el análisis de homología entre los clones y las secuencias canónicas, de cada uno de los elementos, así como también lo correspondiente al análisis poblacional de *gypsy 10* se realizó con el programa Bioedit v7.1. 11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>). La edición de las secuencias también se realizó con la ayuda de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por su sigla en inglés) que se encuentra en la pagina del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por su sigla en inglés. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con esta herramienta también se realizó la búsqueda de las homologías de las regiones flanqueantes con diferentes secuencias de diversos organismos consignada en la base de datos del NBCI.

## 2.10. Transposon display

Esta técnica (Waugh et al., 1997; Zampicinini, 2004) tiene como principio la amplificación de un extremo del elemento transponible mediante el uso de cebadores específicos tras una previa digestión con enzimas de restricción que no corten la región del elemento a amplificar (Vela, 2012). El desarrollo de esta técnica presenta diferentes etapas limitantes como:

1. El análisis del mapa de restricción del elemento: se escoge una enzima que no corte el extremo del elemento que será analizado. Para *gypsy* la enzima escogida fue *HpaII*, la cual no cortan el extremo 5' de la LTR, región analizada.
2. Diseño de dos cebadores específicos del elemento: uno externo que amplifique 300 pb, aproximadamente y uno interno que no amplifique más de 200 pb, tamaño que depende de la posición de la primera diana de restricción de la enzima (Waugh et al., 1997). En algunos casos puntuales el fragmento sobre el que se diseñan los cebadores puede ser menor de 150 pb.
3. Marcaje del cebador interno: se debe usar un fluorocromo que permita la diferenciación de copias del elemento en estudio.

Una vez se ha digerido el ADN genómico se realiza la ligación de los fragmentos con adaptadores específicos de la enzima usada para las digestiones. La reacción digestión-ligación se usa como molde para la una amplificación externa (cebador externo del elemento + cebador complementario a los adaptadores de la enzima) y de este producto de PCR se realiza una dilución (1/20) que sirve de molde para la amplificación interna con el cebador marcado con el fluorocromo (cebador interno del elemento marcado + cebador complementario a los adaptadores de la enzima). El producto de esta última amplificación es el que se analiza por electroforesis capilar.

### 2.10.1. Digestiones de ADN

Bajo la técnica del transposon display el ADN se debe digerir con una única enzima, para el caso de *gypsy* la enzima con la que se digirió fue la **HpaII**. La reacción de digestión está detallada en la tabla 5.

**Tabla 5. Material usado en la reacción de digestión en el transposon display.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (20 µl)</b>
Buffer enzima 10X	1x	2
Enzima ( <b>HpaII</b> ) 1U	1U	1
DNA		<b>1</b>
H <sub>2</sub> O		16

Se realizaron diferentes pruebas con el fin de definir la cantidad de ADN y el tiempo de digestión que se requería para una óptima reacción de digestión, tras múltiples pruebas se estandarizaron estos parámetros. La cantidad de ADN usado en cada una de las reacciones es de 1 µl y el tiempo de digestión fue de 6 horas a 37°C.

### 2.10.2. Ligación de los adaptadores

Se deben preparar previamente una mezcla de adaptadores específicos para la enzima de la digestión HpaII, la mezcla está detallada en la tabla 6.

**Tabla 6. Mezcla de adaptadores.**

<b>Adaptadores</b>	<b>Volumen final (100 µl)</b>
HhaI (+) (10 µM)	10
HpaII (-) (10 µM)	10
H <sub>2</sub> O	80

- Se denaturalizan los adaptadores sometiendo la mezcla a 100°C durante 10', y luego se dejan renaturalizar dejando enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante 10'.

La secuencia de los adaptadores ligados a los fragmentos de restricción de la enzima **HpaII**:

Adaptador HhaI (+): 5' AAC AGC TGG ACG ATG AGT CCT GAG ATA **CG** 3'

Adaptador HpaII (-): 5' **CGC** GTA TCT CAG GAG TGT A 3'

**Reacción de ligación:****Tabla 7. Materiales para la mezcla de la reacción de ligación de adaptadores.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (42 µl)</b>
Buffer Ligasa 5X	1x	8
T4 DNA Ligasa 1U	2.5 U	2,5
Mix Adaptadores	0.2 µM	0,8
H <sub>2</sub> O		10,7
Producto digestión		20

**Amplificación por PCR****1) Amplificación externa:**

Cebador externo para *gypsy*: 5' GACTGCTGGCTGCAGAAAAT 3'

Cebador MseI: 5' AACAGCTGGACGATGAGT 3'

**Reacción de amplificación externa:****Tabla 8. Materiales para la mezcla usada para la PCR externa.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (25 µl)</b>
Buffer 10X	1x	2,5
dNTPs (10mM)	0.2 µM	0,5
Cebador MseI (10mM)	0.4 µM	1
Cebador <b>Externo</b> (20µM)	2 µM	1
DNA polimerasa 5U	0.625 U	0,125
H <sub>2</sub> O		17,875
Producto digestión-ligación		2

**Programa de amplificación (termociclador):**

2' a 94°C, 25 ciclos de (1' a 94°C, 1' a 58°C, 1' a 72°C), 4' a 72°C.

**2) Amplificación interna:**

Para esta amplificación se realiza una dilución 1/20 del producto de amplificación externa y se usa un cebador marcado con el fluorocromo: 4, 7, 2', 4', 5', 7', hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX).

El cebador interno para *gypsy* fue: 5' (Hex) GTCAATGCATCACGCCATTC 3'

La reacción de la amplificación interna esta detalla en la tabla 9.

**Tabla 9. Materiales para la mezcla usada para la PCR externa.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen final (20 µl)</b>
Buffer 10X	1x	2
dNTPs (10mM)	0.2 µM	0,5
Cebador MseI (10mM)	0.4 µM	0.4
Cebador <b>interno</b> (20µM)	0.25 µM	0.25
DNA polimerasa 5U	1.25 U	0,25
H <sub>2</sub> O		15.1
Producto dilución amplificación		1.5

**Protocolo de amplificación (termociclador):**

1' a 94°C, 35 ciclos de (45'' a 94°C, 45'' a 58°C, 45'' a 72°C), 3' a 72°C.

El tamaño mínimo de los fragmentos amplificados en la amplificación externa es de 158 pb para *gypsy*.

**2.10.3. Cruces para el transposon display**

Se realizaron cruces intraespecíficos: hembra vs machos de una misma población. En total se realizaron tres cruces por población, y de cada una de ellos se analizaron los dos parentales y 10 individuos F<sub>1</sub> (5 hembras y 5 machos) para un total de 36 individuos analizados por población. Los individuos con las que se inició cada cruce se habían mantenido en el laboratorio por más de 20 generaciones a una temperatura constante de 18 °C, y alimentados con un medio de cultivo a base de harina de trigo y levadura. Los individuos analizados tenían 8 días de edad con el fin de analizar individuos adultos, que fueron separados por sexos una vez emergieron con el fin de analizar individuos vírgenes que representaran únicamente la segregación individual del genoma parental.

**2.10.4. Secuenciación del ADN por electroforesis capilar**

La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de Biofidal (<http://www.biofidal.com/>) en Lyon (Francia). Las lecturas de los resultados se realizaron usando el programa Peak Scanner v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), en total se realizaron 288 lecturas individuales. Los parámetros que se ajustaron en el programa para la correcta lectura de las secuencias fueron:

## Peak detection

- Peak smoothing      Smoothing: None
- Range                      Analyses: Full range
- Peak characteristics: default
- Sizing calling method: local
- Baseling window size: 51
- Minimum peak heights: Green

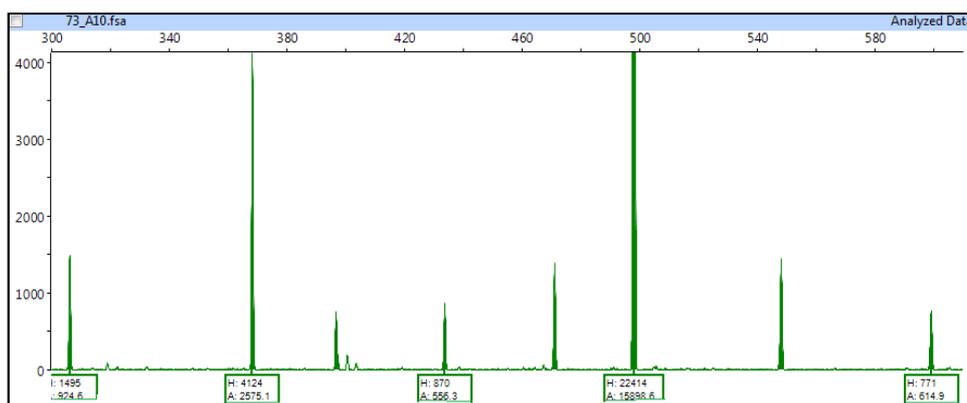
## Quality flags

- Sizing quality      Pass range: from, 0.75 to 1.0

### 2.10.5. Lecturas de genotipos:

Las lecturas se realizaron mediante la visualización de picos mostrados en electroferograma (figura 7), se realizó una cuidadosa selección de los picos para evitar los falsos positivos. Los datos fueron consignados en tablas de Excel en las que se especificaba el tamaño del fragmento y se asignaba un cero (0) para la ausencia de dicho fragmento y un uno (1) para la presencia, realizando con ello las matrices para cada familia (Anexos 1-24). Estos datos se usaron para el cálculo de las tasas de transposición.

**Figura 7. Electroferograma en el programa Peak Scanner.**



### 2.10.6. Cálculos de las tasas de transposición:

La tasa de transposición se define como el número de transposiciones por elemento por generación (Labrador et al., 1999). Se calcularon teniendo en cuenta: el número de inserciones nuevas por generación (en individuos F<sub>1</sub>) para cada

pareja, el número de posiciones fijas de los parentales y el número de genomas que contribuyen en la descendencia (2: genoma diploide), tomando como referencia los cálculos realizados por Labrador et al. (1999). De esta manera, la tasa de transposición es: el cociente del número de nuevos eventos de transposición, dividido por el número de genomas parentales, por el número de posiciones fijas, y por el número de individuos analizados ( $F_1$ ), como se consigna en la siguiente fórmula:

$$T = N_1 / 2 \cdot N \cdot A$$

Donde:

**T** = Tasa de transposición; **N<sub>1</sub>** = Número de nuevos eventos de transposición; **2** = Número de genomas; **N** = Número de individuos  $F_1$  analizados; y **A** = Número de posiciones fijas.

Los cálculos se realizaron a partir de las matrices resultantes de las lecturas de cada genotipo.

## **2.11. PCR a tiempo real (qRT-PCR)**

Para el análisis de las tasas de expresión se realizaron qRT-PCR a partir de cDNA sintetizado a partir del RNAm total de 10 individuos, de ocho días de edad, por réplica. Se realizaron 3 réplicas por sexo y por población lo que implica un total de 60 individuos por población para el análisis de individuos completos. Para la línea germinal se procesaron por separado los ovarios de 10 hembras por réplica, y los testículos de 10 machos, por réplica. Al igual que en el caso anterior, se realizaron tres réplicas por sexos y un total de 60 muestras por población.

### **2.11.1. Extracción de ovarios y testículos**

La disección se realizó haciendo presión sobre el primer tercio del abdomen con una aguja de disección y un movimiento hacia afuera con la segunda aguja ubicada en la parte terminal del abdomen. Este procedimiento se realizó sobre una gota de PBS al 1X. Una vez se extrajeron las gónadas se retiraron las glándulas accesorias, dejando únicamente los ovarios o los testículos, que fueron posteriormente

depositados en un tubo eppendorf con Trizol para preservar su buena conservación hasta el proceso de extracción del RNA.

La extracción de RNA se realizó mediante el método del Trizol como se describe a continuación.

### **2.11.2. Protocolo de extracción de ARN con trizol**

Para evitar contaminación de la muestra se debe usar agua libre de RNAsa (agua con 0.01 % de DEPC (v/v) embasada en botellas de vidrio). El etanol al 75% también debe prepararse con agua DEPC.

- 1- Se pesan las moscas a procesar (10 individuos), usando la diferencia entre un tubo eppendorf vacío y el que contenía el material a procesar. En el caso de las gónadas no es necesario este paso.
- 2- Se congelaron las moscas a procesar sumergiendo en nitrógeno líquido el tubo eppendorf que las contiene. Esto se hace para evitar que se degrade el RNA.
- 3- Se homogeniza la muestra de tejido en 1ml de Trizol por cada 50-100 mg de tejido usando un homogeneizador de vidrio. Las muestras no pueden exceder el 10% del volumen del Trizol usado para la homogenización.
- 4- El homogenizado se incuba 5' a 15-30 °C (temperatura ambiente) para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agrega 0,2 ml de cloroformo por 1 ml de trizol. Se agita vigorosamente con la mano durante 15'' y se incuba 2-3' a 15-30°C y se centrifuga a no más que 13000 r.p.m. durante 15' a 2-8 °C. Luego de la centrifugación, las mezclas se separan en una fase inferior roja, una interface y una fase superior incolora acuosa. El RNA permanece en la fase superior acuosa y supone alrededor del 60% del volumen de Trizol usado para la homogenización.
- 5- Se transfiere la fase superior a un tubo nuevo precipitando el RNA de la fase acuosa con isopropanol (0,5 ml alcohol isopropílico por 1 ml de TRIZOL). Se incuba entre 15-30 °C (temperatura ambiente) durante 10 minutos y se centrifugar a 13000 r.p.m. 10' a 4 °C. El RNA a menudo se precipita sin que se vea antes de la centrifugación, formando un pellet gelatinoso al lado y fondo del tubo.
- 6- Se decanta el sobrenadante y se lava el pellet de RNA una vez con etanol al 75%, (adicionando 1 ml de etanol al 75% por cada 1 ml de Trizol). Se mezcla con vortex y se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C.
- 7- Se decanta el sobrenadante y se deja secar brevemente el pellet al aire 10' aproximadamente. Es importante no dejar que el pellet se seque completamente para evitar que disminuya su solubilidad. Una vez esté seco se debe hidratar en agua MQ libre de RNAsa (la cantidad de agua dependerá del tamaño del pellet, usando la misma relación que la usada cuando se resuspende DNA).

- 8- Finalmente, el RNA se debe someter a un tratamiento con DNasa para eliminar el DNA que pueda haber en la muestra. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

Cantidades para una reacción de 50  $\mu$ l:

- a. Al volumen final agregar 0.1 volumen de 10X DNasa I Buffer y 1  $\mu$ l de rDNasa I (2 U/ $\mu$ l).
- b. Incubar 30', 1h:30', 3h ó 4h (dependiendo del tejido) a 37°C. Para el caso particular de las muestras aquí procesadas fueron necesarias 3-4 horas de digestión.
- c. Al volumen final agregar 0.1 volumen de DNasa Unactivation Reagent (hacer vortex a este reactivo antes de usar).
- d. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente ó a 4°C, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (hacer vortex durante 1').
- e. Centrifugar 2' a 4°C a 13000 rpm, decantar el sobrenadante, secar el RNA al aire y resuspender siguiendo los mismos parámetros anotados en el paso nº 7 del protocolo de extracción de RNA.

9- Cuantificación del RNA.

10- Síntesis del cDNA.

### 2.11.3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se deben realizar una primera reacción cuyo producto se usa para la segunda reacción. En tubos estériles, libres nucleasas y en hielo, se preparan las mezclas para un total de 20  $\mu$ l de reacción agregando los componentes a las concentraciones descritas en las tablas 10 y 11 (controles negativos sin cDNA).

a. Primera reacción

**Tabla 10. Materiales para mezcla usada en el control positivo en primera reacción.**

Reactivos	Volumen final 13 $\mu$ l	Concentración final
RNA total		1 $\mu$ g de ARN total (Máximo 5 $\mu$ g).
Cebador oligo (dT) 50 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
Agua tratada con DEPC	variable	Hasta completar 13 $\mu$ l.

**Tabla 11. Materiales para mezcla usada en el control negativo en primera reacción.**

Reactivos	Volumen final 13 $\mu$ l	Concentración final
RNA total		1 $\mu$ g de ARN total (Máximo 5 $\mu$ g).
Cebador oligo (dT) 50 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
Agua tratada con DEPC	variable	Hasta completar 13 $\mu$ l.

- Se denaturalizan los cebadores y la estructura secundaria del RNA calentando a 65 °C durante 10 minutos (programar el termociclador). Al terminar se debe enfriar de inmediato en hielo.

#### b. Segunda reacción

**Tabla 12. Materiales para mezcla usada en el control positivo en segunda reacción.**

Componentes	Concentración final	Volumen
5X Transcriptor Reverso Transcriptasa buffer	1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )	4 µl
Protector inhibidor RNasa, 40 U/µl.	20 U	0.5 µl
Mezcla de Deoxinucleotido, 10 mM cada uno.	1 mM cada uno	2 µl
Transcriptor Reverso Transcriptasa, 20 U/µl	10 U	0.5 µl
Volumen final		7 µl

**Tabla 13. Materiales para mezcla usada en el control positivo en segunda reacción.**

Componentes	Concentración final	Volumen
5X Transcriptor Reverso Transcriptasa buffer	1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )	4 µl
Protector inhibidor RNasa, 40 U/µl.	20 U	0.5 µl
Mezcla de Deoxynucleotido, 10 mM cada uno.	1 mM cada uno	2 µl
H <sub>2</sub> O del kit o auto clavada con DEPC		0.5µl
Volumen final		7.0 µl

- Se mezclan en frío los componentes de la reacción 1 con el producto de la reacción 2 completando con esto un volumen final de 20µl.
- Se somete esta mezcla a un ciclo térmico adecuado para la síntesis de cDNA, incubando a 50 °C durante 1 h. Una vez terminado este ciclo la muestra se somete a 85°C durante 5' para inactivar la reverso transcriptasa. Se enfría la muestra y el cDNA sintetizado se puede conservar durante largos periodos de tiempo a -20 °C.

#### 2.11.4. RTPCR

Se diseñaron 2 juegos de cebadores sobre la región de la transcriptasa reversa (RT) de *D. subobscura* de los elementos *gypsy* y *bilbo*, usando la secuencia canónica de cada uno de ellos. Además, se utilizaron dos cebadores para el gen constitutivo *rp49* de *D. subobscura*. La descripción del conjunto de cebadores se encuentra en la tabla 14.

**Tabla 14. Secuencia de cebadores usados en la RT PCR.**

Gen	Cebador directo	Cebador reciproco
<i>rp49</i>	5'CCCAACATCGGTTATGGCTC 3'	5'CTTGAGAACGCAGACGTCCA 3'
<i>gypsy</i> (RT)	5' CATTTCGCGACAGACACAAGA 3'	5' CGAAGTGATGGTCTCGGAAT 3'
<i>bilbo</i> (RT)	5' GAGGCAGGGTCTGTGGATTA 3'	5' ATCTTGCGAACGAGGTCACT 3'

Los tres pares de cebadores fueron probados para verificar la amplificación de los mismos. El producto de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa (0.6 %), usando un marcador de banda para verificar si el tamaño del fragmento que se esperaba para cada par de cebadores (*rp49*: 231; *gypsy*: 205 pb; *bilbo*: 231 pb) correspondía con el esperado. El detalle de los reactivos y concentraciones se describe en la tabla 15.

**Tabla 15. Materiales para la mezcla usada en RT PCR.**

Reactivos	Concentración final	Volumen final (25 µl)
Buffer 10 X con Mg	1x	2,5
dNTPs (2mM)	200µM	2,5
Cebador 1 (16 mM)		0,625
cebador 2 (16 mM)		0,625
Agua		17,65
Taq (5U/ml)	1U	0,1
cDNA *		1

(\*) También se comprobaron los controles negativos de la síntesis de cDNA. Se realizaron pruebas con una cepa de laboratorio y con individuos recién traídos de la naturaleza.

La mezcla se sometió al siguiente programa de amplificación:

5' 94°C; 29 veces (45" 94°C; 45" TM\*; 1':30" 72°C); 10' 72°C; 4°

(\*) La Tm dependía de los pares de cebadores usados en cada reacción.

### 2.11.5. PCR a tiempo real (qRT-PCR)

Para las reacciones de qRT-PCR se tuvo especial cuidado en trabajar bajo condiciones estériles para evitar contaminación de la muestra y con bajos niveles de luz, evitando con ellos que el fluorocromo usado en la reacción (sybergreen) no reaccionara con la luz y perdiera su eficacia. El detalle de la reacción se especifica en la tabla 16.

**Tabla 16. Materiales usados en la mezcla para PCR a tiempo real**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen final (10 <math>\mu</math>l)</b>
Primer 1 16 $\mu$ M	0,3
Primer 2 16 $\mu$ M	0,3
H <sub>2</sub> O DEPC	3,4
Sybergreen	5
cDNA	1

La mezcla (9 $\mu$ l) era depositada en cada pozo de la placa de reacción y seguidamente la muestra de cDNA correspondiente. Se utilizó el termociclador facilitado por el servicio de la empresa BIORAD a través del Dpto. de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Barcelona. El programa utilizado para las amplificaciones fue el siguiente:

3' 95°C; 39 veces (10" 95°C; 10" 58°C; 20" 72 °C); 10" 95 °C; cada 5" incremento de la T° de 65°C a 95°C.

#### **2.11.6. Cálculos de las tasas de expresión:**

Las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo*, se cuantificaron de forma relativa respecto al gen de referencia *rp49* de *Drosophila subobscura*, cuya expresión es constitutiva y constante, mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Bajo este método se calcularon las tasas de expresión, a partir de los incrementos de los valores, umbral del ciclo, (*Ct*: Cycle threshold, por sus siglas en inglés) de amplificación del gen de la reverso transcriptasa de *gypsy* y *bilbo*, con respecto al gen de referencia.

Para la determinación del método a utilizar para el análisis de datos, fue muy útil la previa calibración de las curvas de expresión que se hizo para cada gen. Para ello se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  ng –  $10^{-6}$  ng de ADN de una población que presentaba una concentración de 1ng/ $\mu$ l. Se realizó la Real Time para los tres genes usando los mismos reactivos anotados para este tipo de reacción. Una vez obtenidos los resultados se determinó la eficiencia de la amplificación para cada gen: *rp49*: E=94,2 %, para *gypsy*: E=99, 5%, y para *bilbo*: E = 86, 6 %.

Por otra parte, para la interpretación de las tasas de expresión se consideró que una población presentaba diferencias en su expresión cuando el valor de la tasa era mayor o igual 1,8.

#### **2.11.7. Análisis estadísticos de los datos de expresión**

Se realizaron los análisis de datos con pruebas no paramétricas, ya que los datos no presentaban una distribución normal. Los análisis de datos se realizaron con los datos de expresión (valores de diferencias de Ct: Ct de *gypsy*, Ct de *bilbo* y Ct de *rp49*) y transposición (datos de ausencia y presencia de nuevos eventos de transposición). Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics (SPSS: Statistical Product and Service Solutions, por sus siglas en inglés (<http://www-01.ibm.com/software/es/analytics/spss/products/statistics/>)).

**Las pruebas no paramétricas** para muestras independientes que se llevaron a cabo fueron: Kruskal Wallis (<https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/kruskal-wallis-h-test-using-spss-statistics.php>) para comparaciones pareadas entre múltiples poblaciones, y la prueba de Mann Whitney para comparaciones entre dos poblaciones (<https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/mann-whitney-u-test-using-spss-statistics.php>).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estudio de la estructura molecular de los elementos transponibles *bilbo* y *gypsy* en poblaciones originales y colonizadoras de *Drosophila subobscura*.

El análisis poblacional incluyó un total de 23 poblaciones de las cuales 10 eran originales: Sintra, Madeira, Tenerife, El Perelló, Bordils, Bellaterra, Dijon, Montpellier, Aarhus y Groningen (figura 6) y 13 colonizadoras: Maipú, Puerto Montt, Santiago, La Serena, Laja, Coyhaique, Valdivia, Davis, Bellingham, Salem, Port Hardy, Eureka y Medford (figura 4 y 5).

##### 3.1.1. Elemento Transponible *gypsy*

Se aislaron 46 colonias de fagos de una genoteca de la población argentina de Maipú de *D. subobscura* de las cuales 26 se consideraron clones positivos, a través de hibridación *in situ* en preparaciones cromosómicas de *ch-cu*. Dos de estos clones: *gypsy* 1 (clon de baja ocupación) y *gypsy* 10 (clon posiblemente de alta ocupación) cumplían con los criterios de selección mencionados en la metodología siendo secuenciados y caracterizados a nivel molecular.

##### 3.1.1.1. Clon *gypsy* 1

El clon llamado *gypsy* 1, se encontró insertado en el cromosoma E en la región 70B (E70B). Esta posición cromosómica (figura 8) es considerada de baja ocupación, ya que en un trabajo poblacional anterior (García Guerreiro et al., 2008), se encontró en una frecuencia de ocupación del 3,8 % en la población de Bordils (Girona, España).

**Figura 8. Hibridación *in-situ* del clon *gypsy1* en la cepa *ch-cu*, en el cromosoma E.**

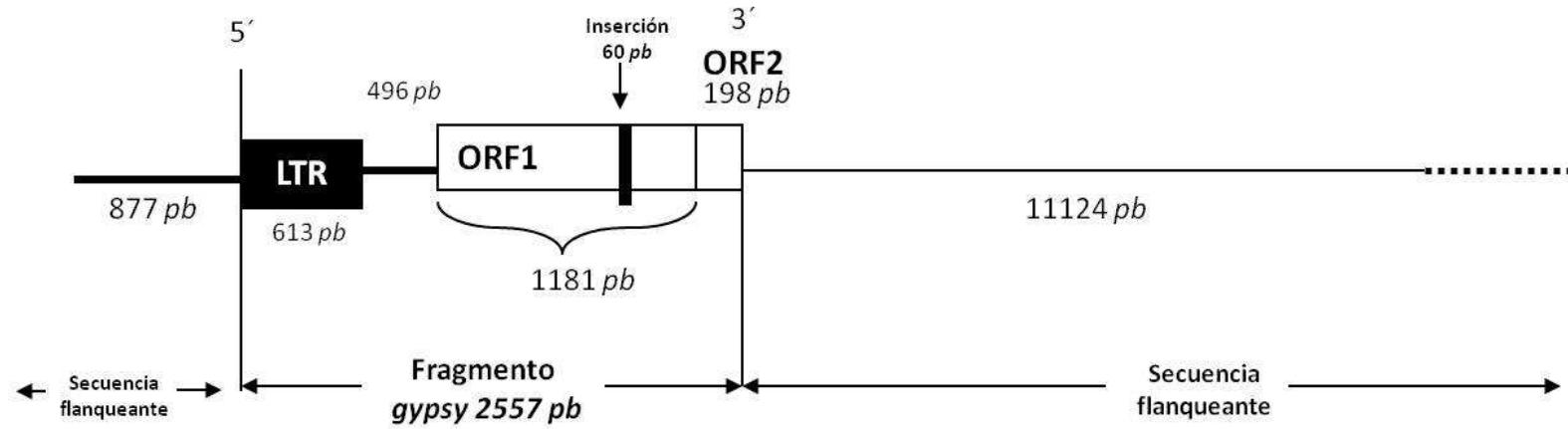


La flecha indica la región cromosómica hibridada.

### **Estructura molecular del clon *gypsy 1***

La secuencia del clon *gypsy1*, tiene un tamaño de 14.557 *pb* e incluye una copia incompleta de *gypsy* (figura 9). La zona homóloga con el elemento canónico *gypsyDs*, descrito por Alberola y de Frutos, 1996, es de 2.479 *pb*. La secuencia de nucleótidos de *gypsy*, incluida en este clon, contiene la LTR 5' (613 *pb*) y el ORF1 (1.181 *pb*) completos con una inserción de 60 *pb* en el ORF1. Además se encontraron una parte del ORF2 (198 *pb*) y dos zonas no codificantes de 260 y 227 *pb*. Este clon además de no tener la región ORF2 completa carece del ORF3 y de la LTR 3'. Esta secuencia incompleta de *gypsy* presenta dos regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' de 877 y 11.124 *pb* respectivamente.

Figura 9. Estructura molecular del clon *gypsy1* de *Drosophila subobscura*.



**LTR:** repeticiones terminales largas; **ORF:** marco de lectura abierto.

La región flanqueante del extremo 5' está constituida por tres regiones duplicadas de 257 *pb*, de las cuales 65 *pb* son homólogas con genes del RNA ribosomal de *Drosophila virilis*. La región flanqueante del extremo 3' presenta homología con una región del cromosoma 2R de *Drosophila melanogaster* que es el homólogo al cromosoma E de *D. subobscura*. En su parte 3' se halla flanqueada por el gen Rgk3 (posiblemente involucrado en procesos catabólicos: FlyBase símbolo Dmel\Rgk3; <http://flybase.org/reports/FBgn0085426.html>). Por otra parte, la secuencia de 60 *pb*, insertada en la ORF1, presentó homología con un gen codificante de proteína no determinado de *D. persimilis* y con el gen de la endonucleasa /transcriptasa inversa de *gypsy* de *D. virilis*. Un resumen de las homologías encontradas de este clon se encuentra en la tabla 17.

### **Análisis poblacional del clon *gypsy1***

Se realizó la búsqueda de este clon en las 23 poblaciones en estudio: 10 originales (europeas) y 13 colonizadoras (de América del norte y del sur), a través de PCR. Para ello se diseñaron un total de 7 secuencias cebadoras, realizando con ellas 11 combinaciones distintas, con el fin de amplificar la secuencia completa de *gypsy* (incluida en el clon *gypsy1*), o parte de ella, mediante la utilización de secuencias cebadoras dentro del elemento y de su región flanqueante. Ninguna de las combinaciones logró amplificar las secuencias de interés, a pesar de que los cebadores diseñados se mostraron eficientes en la amplificación directa del clon *gypsy1*. Por otra parte, se realizaron hibridaciones *in situ*, en algunas de las poblaciones en estudio (Dijon, Sintra, Madeira, Bellaterra y El Perelló), con el fin de corroborar la posición de este clon y se observó que la señal de hibridación estaba en el cromosoma E región 70B (E70B), como se había observado en la cepa *ch-cu* de *D. subobscura* (figura 8). Lo que también nos indicó que *gypsy1* a pesar de no amplificar por PCR está presente en las poblaciones. Esto se puede explicar si *gypsy1* no se encuentra exactamente en la misma posición a nivel nucleotídico en las poblaciones analizadas, pese a observarse la misma posición citológica de *ch-cu*.

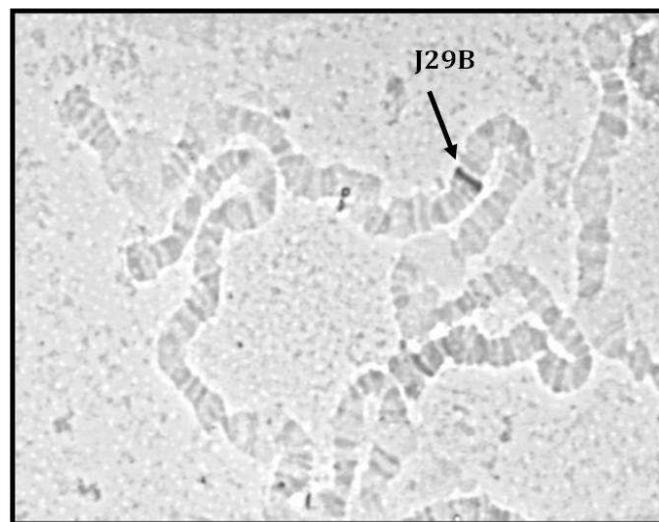
**Tabla 17. Homologías del clon *gypsy1*.**

Región	Tamaño pb	Nº regiones homologas	pb homologas	Región homologa	Nombre de la región	homología %	Especie
Flanqueante 5'	877	2	65	Gen ribosomal	18S (extremo 5')	83	<i>D. virilis</i>
			65	Gen ribosomal	28S (extremo 3')	83	<i>D. virilis</i>
Flanqueante 3'	11124	12	531 - 1527	Cromosoma 2R	sin identificar	79-100	<i>D. melanogaster</i>
		3	51 - 72	Sec. Microsatélite	Microsatélite	95	<i>D. ananassae</i>
inserción	60	1	56	Gen- dominio	mRNA	96	<i>D. persimilis</i>
		1	56	Gen - ET <i>gypsy</i>	endonucleasa/transcriptasa inversa	95	<i>D. virilis</i>

### 3.1.1.2. Clon *gypsy10*

El clon *gypsy10*, mapeó en la región 29B del cromosoma J (J29B), como se puede observar en la figura 10. En el trabajo poblacional realizado por García Guerreiro *et al.*, (2008), no se reportaron inserciones de *gypsy* en esta región cromosómica. No obstante, dado que el número de copias de *gypsy* en los brazos cromosómicos es baja y que en el presente estudio se encontró en 14 de las 25 poblaciones analizadas, fue considerado de alta ocupación.

**Figura 10. Hibridación *in situ* del clon *gypsy10*, en el cromosoma J.**



La flecha señala el sitio de inserción

### **Estructura molecular del clon *gypsy10***

Este clon, posee una extensión de 5.283 *pb* correspondiente a una copia incompleta de *gypsy*. La secuencia homologa con el elemento canónico (Alberola y de Frutos, 1996) es de 3128 *pb* y comprende la región ORF2 incompleta (1005 *pb*), la ORF3 y la LTR3' completas, más una región flanqueante en el extremo 3' de 2155 *pb* (figura 11). La presencia del ORF3 completo junto con la inexistencia de codones stop en esta región podría indicar que esta copia podría codificar para la proteína de la envoltura viral (Env).

Los análisis de la zona flanqueante mostraron que 677 *pb* de de esta secuencia (región homologa que se encuentra aproximadamente a 876 *pb* de la LTR 3'), presenta un 99% de identidad con el gen de los RNA ribosomales (RNAr) 2S, 5, 8S,

18S, y 28S de *D. melanogaster*: en el caso del RNAr 28S también presentó homología con el de *D. persimilis*, *D. pseudoobscura* y *D. virilis*, entre otras. En la tabla 18 se encuentran las homologías encontradas, consignando tan solo algunas de las especies que presentan el gen ribosomal 28S homólogo a esta secuencia flanqueante.

### **Análisis Poblacional de *gypsy10***

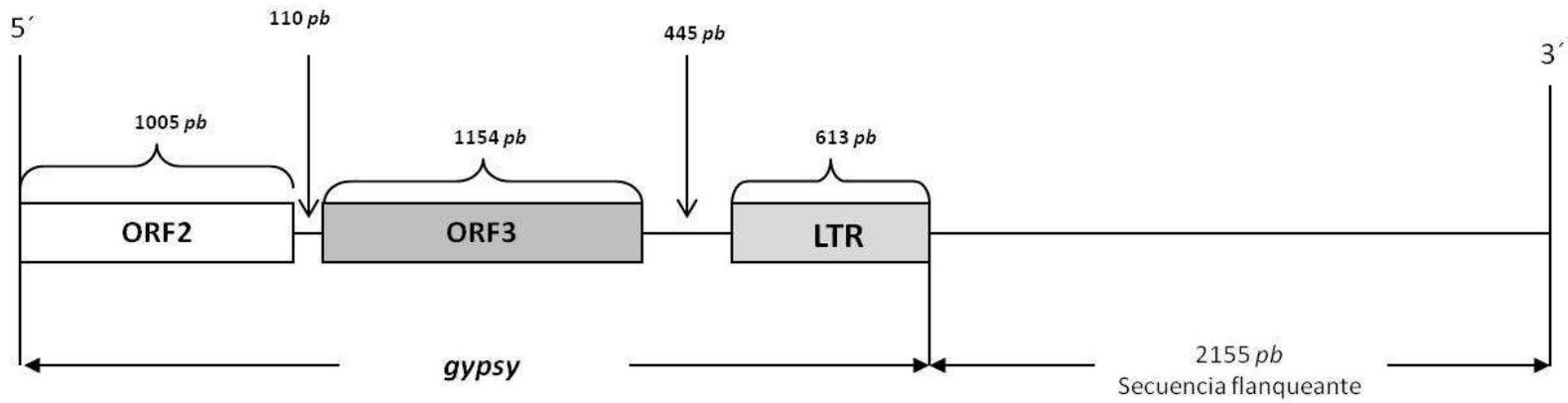
El clon *gypsy10* se buscó en el genoma de las 23 poblaciones analizadas, usando tres combinaciones de cebadores distintas. Con una de ellas, se logró amplificar un fragmento de 769 pb en 14 poblaciones: 4 originales (Tenerife, El Perelló, Dijon y Montpellier) y 10 colonizadoras (Santiago, Coyhaique, Laja, Valdivia, Bellingham, Davis, Medford, Port Hardy, Salem y Eureka). En el resto de poblaciones en estudio, no se observó amplificación indicando la posibilidad de que la copia de este clon se haya perdido ó no estuviera presente en los individuos analizados. Una vez secuenciadas cada una de las copias de *gypsy10*, en las poblaciones antes mencionadas, se realizó la comprobación de la secuencia usando la herramienta BLAST. Cada una de las secuencias resultó homóloga con el elemento *gypsy* (canónico) y con su copia denominada *gypsy10*.

Las 769 pb amplificadas, en las 14 poblaciones mencionadas anteriormente, corresponden a 613 pb de la LTR 3' completa de *gypsy* más 156 pb de ADN flanqueantes. Todas las copias de esta región genómica del elemento se encuentran en la misma región a nivel nucleotídico en todas las poblaciones analizadas. Las comparaciones muestran que la LTR 3' del clon *gypsy10* es casi idéntica a la del elemento canónico a excepción de 4 sustituciones y una inserción de un solo nucleótido. Asimismo, todas las poblaciones analizadas comparten estos mismos cambios con excepción de algunas variaciones puntuales que, como se observa en la tabla 19, están mayoritariamente concentrados en la población de Tenerife. Cabe aclarar que la calidad de la secuencia amplificada de la población de Valdivia no fue óptima en su totalidad, por esta razón, tan solo se tuvo en cuenta para el análisis de los cambios nucleotídicos 339 pb, de los cuales 302 corresponden a la LTR.

**Tabla 18. Homologías de las secuencias flanqueantes del elemento transponible *gypsy10*.**

Región	Tamaño pb	pb homologas	Región homologa	Genes - símbolos	homología %	Especie
Flanqueante 3'	2155	677	genes ribosomales	2S	99	<i>D. melanogaster</i>
				5,8S	99	<i>D. melanogaster</i>
				18S	99	<i>D. melanogaster</i>
				28S	99	<i>D. melanogaster</i>
					99	<i>D. seudoboscuro</i>
					98	<i>D. virilis</i>
					99	<i>D. persimilis</i>
					99	<i>D. aracataca</i>
					97	<i>D. novamexicana</i>
					99	<i>Zaprionus sepsoides</i>
					98	<i>Hirtodrosophila sp.</i>
					95	<i>Toxoneura superba</i>
					96	<i>Scaptodrosophila dorsocentralis</i>
					95	<i>Physocephala marginata</i>
					95	<i>Melanina sp</i>
94	<i>Musca domestica</i>					
93	<i>Chalarus pughi</i>					

Figura 11. Estructura molecular del clon *gypsy10* de *Drosophila subobscura*.



**ORF:** marco de lectura abierta; **LTR:** repeticiones terminales largas.

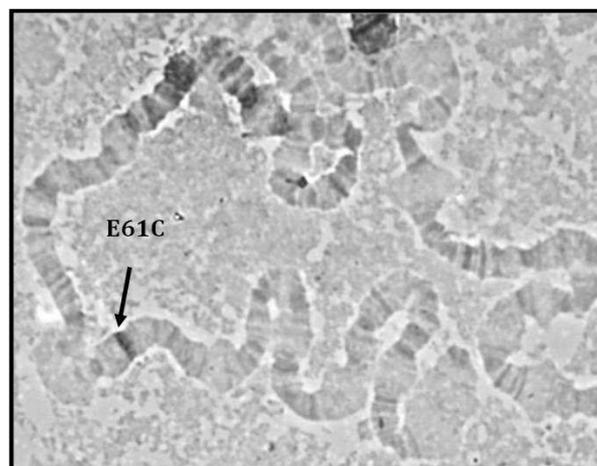
Por otra parte, la secuencia flanqueante (155 pb) en las distintas poblaciones es idéntica a la del clon *gypsy10*, lo que indica que esta copia de *gypsy* se encuentra inserta en la misma región nucleotídica en todas las poblaciones. Cabe destacar que las poblaciones de El Perelló y Tenerife presentan mayor homología entre ellas que con el resto y también presentan una gran cantidad de sustituciones nucleotídicas comparadas con el clon *gypsy10* aislado de la genoteca. Dado que además la calidad de la secuenciación no fue óptima, estas secuencias ni la región flanqueante de la población de Valdivia no se han incluido en el alineamiento global del conjunto de las poblaciones.

Los intentos de búsqueda de homologías de la zona flanqueante, presente en las poblaciones, con secuencias conocidas en la base de datos han sido infructuosos, dado que esta secuencia no alinea con ninguna secuencia conocida.

### 3.1.2. Elemento transponible *bilbo*

Se aislaron 68 clones de la genoteca de los cuales tan sólo uno (*bilbo 12*) se encontró en una nueva posición (61C) del cromosoma E (figura 12). La ocupación de esta región cromosómica no fue reportada en el trabajo poblacional publicado por García Guerreiro et al., 2008 y tampoco se logró amplificar en ninguna población, por tanto se consideró un clon de baja frecuencia de ocupación realizado en este estudio y del cual se hablará más adelante.

**Figura 12. Hibridación *in situ* del clon *bilbo12* en el cromosoma E.**



La flecha señala el sitio de inserción.

**Tabla 19. Comparación de los cambios nucleotídicos, deleciones e inserciones del clon *gypsy10* en las diferentes poblaciones naturales y el *gypsy* canónico.**

Canónico (pb)	<i>gypsy10</i> (pb)	Canónico	<i>gypsy10</i>	POBLACIONES				Mutación
				Montpellier	Tenerife	Dijon	El Perelló	
7513	2165	A	A	G	G			Sustitución
7512	2166	A	A		T			Sustitución
7388	2290	C	C		T			Sustitución
7374	2304	C	C		T			Sustitución
7339	2339	C	C		T			Sustitución
7249	2429	T	A			T		Sustitución
7212	2467	(-)	A		(-)		(-)	Inserción/Delección
7190	2489	C	A					Sustitución
7172	2507	C	A		C			Sustitución
7171	2508	T	A		T			Sustitución

Los números representan el nº de la base nucleotídica en la que se observa el cambio;(-): delección. Todos los cambios que se observan en la columna de *gypsy10*, con respecto al canónico, son comunes a todas las poblaciones secuenciadas excepto en aquellos casos en los que se especifica.

### Estructura molecular del clon *bilbo12*

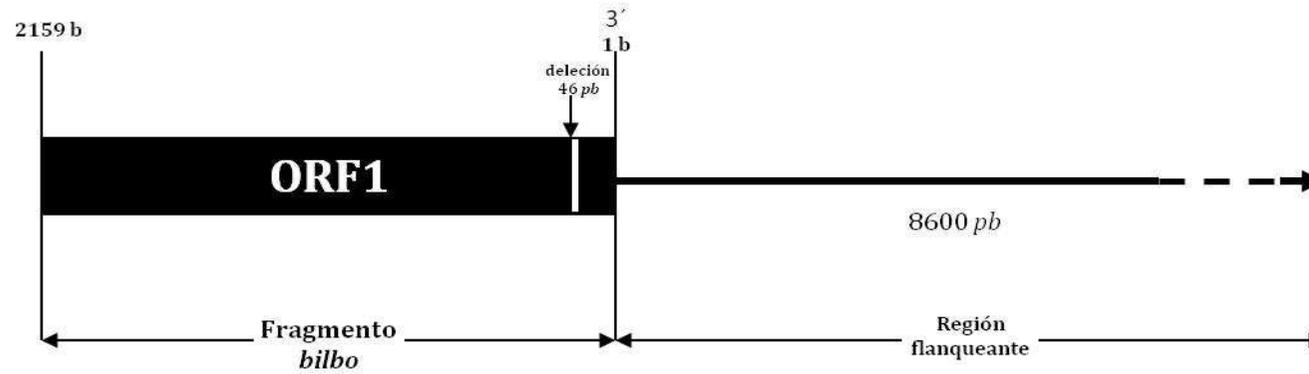
El clon *bilbo 12* contiene dos elementos *bilbo* incompletos y degenerados que probablemente corresponden a copias muy antiguas de este ET. Estas dos copias fueron denominadas *bilbo 12a* (figura 13) y *bilbo 12b* (figura 14). El clon *bilbo 12a*, contiene una secuencia invertida de 2041 pb homologa con la región ORF1 del *bilbo* canónico (Blesa y Martínez, 1997). La región de la ORF1 de la copia canónica del elemento presenta una extensión de 2400 pb, por lo que la copia encontrada está incompleta. *Bilbo 12a* presentó una región flanqueante en su extremo 3' de 8600 pb que la separa de *bilbo 12b*.

*Bilbo 12b*, contiene una copia incompleta de *bilbo* de 965 pb, correspondiente al ORF1 y a una región flanqueante en su extremo 3' de 3291 pb. Al contrario de *bilbo 12a*, esta copia de *bilbo* no se encuentra invertida. Tanto *bilbo12a*, como *bilbo 12b*, son copias de *bilbo* muy degeneradas; los alineamientos con el elemento canónico muestran gran cantidad de deleciones y sustituciones nucleotídicas. Las deleciones pequeñas incluyen entre 1 y 6 nucleótidos seguidos y además se observó una deleción de 46 pb en el dominio del gen que codifica para la enzima transcriptasa inversa en *bilbo12a* (242-197 pb) y *bilbo12b* (124-168 pb). La región de la ORF1 está determinada en el elemento canónico: entre el nucleótido 1 - 279 (Blesa et al., 1997).

Los análisis de las zonas flanqueantes mostraron que la secuencia flanqueante de la copia *bilbo12a* presenta homología con el gen RpII215 de *D. subobscura* y *D. madeirensis* (gen responsable de codificar la subunidad mayor del complejo RNA polimerasa II). Así como también, con una región del cromosoma de *D. subobscura* y con un gen codificante de proteína de esta misma especie. Además, presentó homología con el elemento *P* anotado para las especies *D. ambigua*, *D. pseudoobscura* y *D. guanche*, entre otras diferentes secuencias de ADN repetitivo, de las cuales algunas están referenciadas en la tabla 20. La región flanqueante de *bilbo 12b* es homologa con un gen codificante de proteína no determinado, anotado en *Anopheles gambiae* y en diferentes especies de *Drosophila*.

En las tablas 20 y 21, se encuentran anotadas, a modo de resumen, las homologías encontradas en estas dos copias de *bilbo*.

Figura 13. Estructura molecular del clon *bilbo12a* de *Drosophila subobscura*.



ORF: marco de lectura abierto.

Figura 14. Estructura molecular del clon *bilbo12b* de *Drosophila subobscura*.



Tabla 20. Homologías de la secuencia flanqueante 3' del clon *bilbo12a*.

Región <i>bilbo 12a</i>	Tamaño pb	Nº H	pb homologas	Región homologa	Nombre de la región	%H	Especie
Flanqueante 3'	8600	2	143 y 592	Gen	gen codificante de proteína	88 - 90	<i>D. pseudoobscura</i> <i>pseudoobscura</i>
		5	254 - 1695	Gen	RpII215	81 - 89	<i>D. madeirensis</i>
		7	96 - 1912	Gen	RpII215	81-89	<i>D. subobscura</i>
		2	225 - 368	Gen	mRNA	88 y 91	<i>D. persimilis</i>
		2	185 - 377	Genes	adh y adh-dup	91 y 93	<i>D. madeirensis</i> y <i>D. pseudoobscura</i>
		1	152	pseudogen	proteína heat shock Hsp70c	86	<i>D. lummei</i>
		4	81-808	Clon gpst2	Secuencia microsatélite	85 - 89	<i>D. guanche</i>
		2	207 - 398	Clon 6A-K/L	ADN repetitivo	80-86	<i>D. guanche</i>
		6	354 - 1659	Clon B49	ADN repetitivo	83-92	<i>D. pseudoobscura</i>
		3	241-814)	retrosecuencia ADN	adh 812	86-90	<i>D. pseudoobscura</i>
		6	61-669	ET	elemento <i>P</i>	80-92	<i>D. pseudoobscura</i>
		2	104 - 259	ET	elemento <i>P</i>	83 y 90	<i>D. guanche</i>
		7	132- 2071	Mapa cromosomal 12A	inversión A2 región P275	79-91	<i>D. subobscura</i>

NºH: número de regiones homologas; %H: porcentaje de homología.

**Tabla 21. Homologías de la secuencia flanqueante 3' del clon *bilbo12b*.**

Región <i>bilbo12b</i>	Tamaño pb	Nº H	pb homologas	Región homologa	Nombre de la región	%H	Especie
Flanqueante 3'	3291	2	152	Gen	mRNA: gen codificante de proteína	95	<i>D. pseudoobscura pseudoobscura</i>
		1				93	<i>D. ananassae</i>
		1				92	<i>Anopheles gambiae</i>
		1				91	<i>D. erecta</i>
		1				97	<i>D. persimilis</i>
		1				90	<i>D. mojavensis</i>

NºH: número de regiones homologas; %H: porcentaje de homología.

### **Análisis poblacional**

Se diseñaron cinco pares de cebadores distintos, con el objetivo de buscar las copias de *bilbo* (*bilbo12*), que pudieran estar presentes en el genoma de las 23 poblaciones en estudio. Previamente, se realizaron las pruebas con dos pares de cebadores usando como ADN molde el correspondiente al clon *bilbo12*. Estas pruebas dieron como resultado amplificación de dos bandas de interés de 834 y 1219 *pb*. Estos mismos cebadores probados en las 23 poblaciones en estudio no mostraron amplificación demostrando la ausencia de esta copia en las poblaciones señaladas. Como se mencionó anteriormente, la ocupación cromosómica de esta copia de *bilbo* en el cromosoma E en la región 61C (E61C), no fue reportada en el trabajo poblacional realizado por García Guerreiro et al., 2008. Por tanto se puede decir, dado los resultados de este estudio y la secuencia del elemento, que *bilbo12* es un clon de baja ocupación y corresponde probablemente a una copia antigua del elemento, ya que se encuentra incompleto y degenerado.

Una vez analizada la distribución de los ETs *bilbo* y *gypsy* en poblaciones originales y colonizadoras, se realizó el análisis de la expresión de estos elementos en poblaciones europeas (originales) y suramericanas (colonizadoras) recién traídas de la naturaleza y cuyos resultados se consignan a continuación.

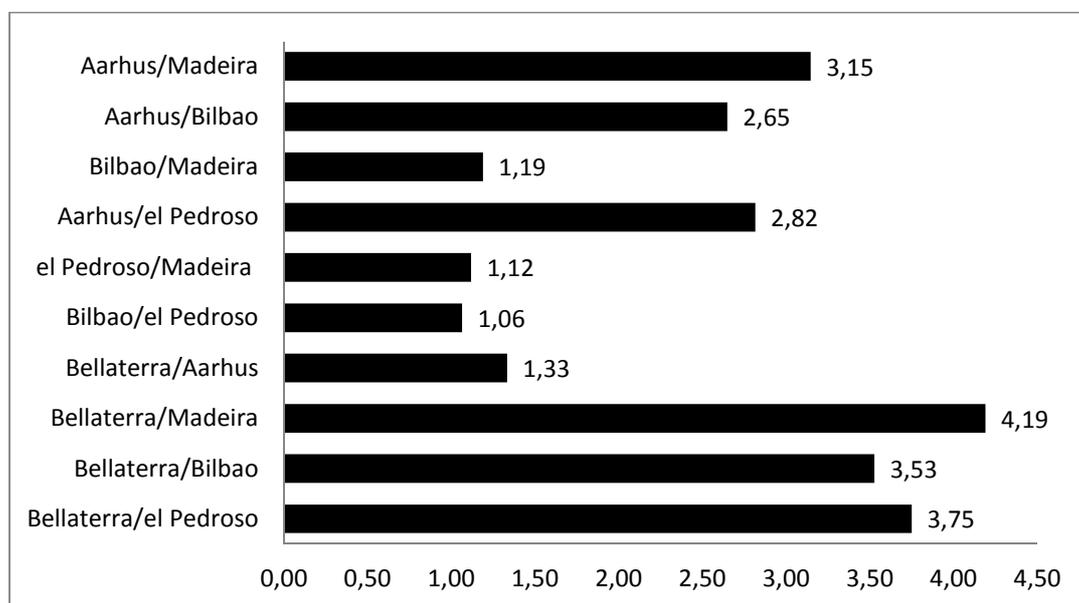
### **3.2. Estudio de las tasas de expresión de los elementos transponibles *gypsy* y *bilbo* en poblaciones colonizadoras vs originales**

Se analizaron a través de la amplificación por PCR a tiempo real cinco poblaciones originales: Bellaterra, Bilbao, El Pedroso, Madeira y Aarhus (figura 6), y seis poblaciones colonizadoras: Santiago, Chillán, Curicó, Valdivia, Puerto Montt y Laja (figura 4). Este primer análisis de las tasas de expresión se realizó en individuos completos.

### 3.2.1. Tasas de expresión de *gypsy* en poblaciones originales

Los cálculos de las tasa de expresión de *gypsy*, partiendo de los promedios del incremento de *Ct* del total de la población (hembras y machos), mostraron que Bellaterra y Aarhus son las poblaciones europeas en donde hay una mayor expresión de *gypsy* (figura 15). Por otra parte, las poblaciones de Bilbao, El Pedroso y Madeira presentaron niveles de expresión muy bajos (figura 15). Pese a que las datos de las tasas de expresión, mostraron claramente que existen diferencias de expresión de *gypsy* a nivel inter poblacional, la prueba de Kruskal-Wallis no logró detectar dichas diferencias ( $P=0.15$ ). Sin embargo, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencias significativas al comparar la población de Bellaterra con Madeira y El Pedroso ( $P= 0,023$  y  $P= 0.036$ , en este orden), que son las que presentan respectivamente mayor y menor tasa de expresión promedio de *gypsy* en las poblaciones originales. Indicando con ello que en la población de Bellaterra, *gypsy*, se expresa más que en Madeira y El Pedroso.

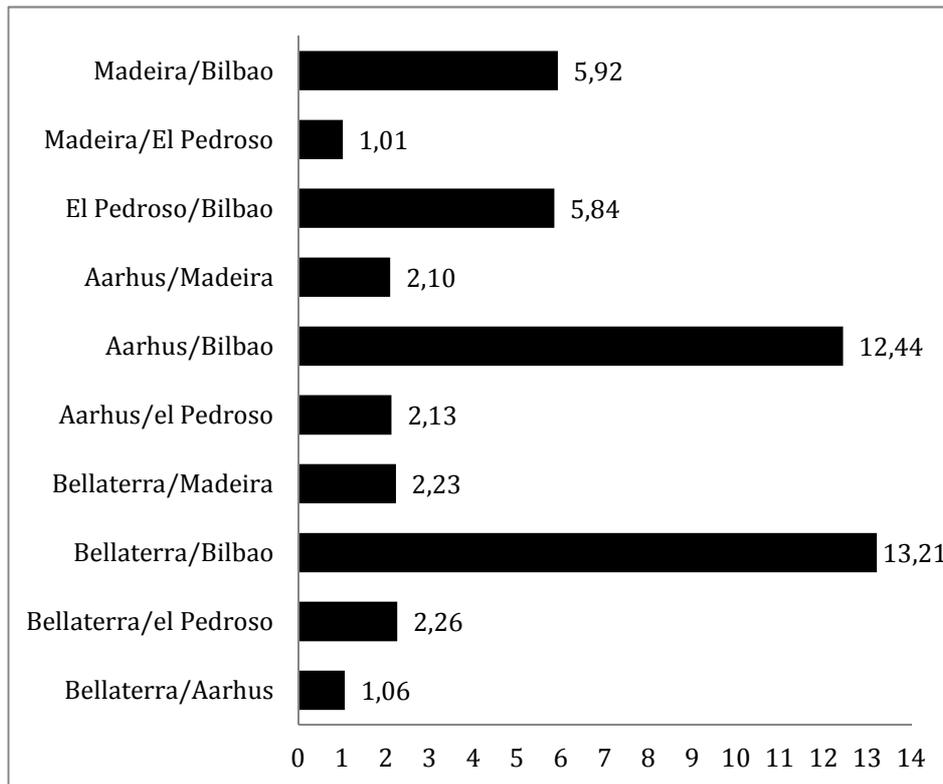
**Figura 15. Tasas de expresión de *gypsy* en las poblaciones originales.**



Posteriormente se realizó un estudio de la tasa de expresión de *gypsy* analizando por separados los incrementos de *Ct* de hembras y machos. En las hembras (figura 16) de las poblaciones de Bellaterra y Aarhus *gypsy* no presenta diferencias en los niveles de expresión entre ellas (1,06), siendo a su vez éstas dos poblaciones en

donde se observaron las tasas de expresión más altas entre las poblaciones originales (figura 16). En las poblaciones de Madeira, El Pedroso y Bilbao, los niveles de expresión observados decrecieron drásticamente, siendo Bilbao la población de menor expresión comparada con el resto.

**Figura 16. Tasas de expresión de *gypsy* en las hembras de las poblaciones originales.**



La prueba de Kruskal-Wallis, apoya de manera contundente que existen diferencias significativas entre las hembras de las diferentes poblaciones originales en estudio ( $\chi^2= 11,80$ ;  $P=0,001^{**}$ ). No obstante, pese a la alta significación estadística, encontrada con la prueba de Kruskal-Wallis, al realizar la prueba Mann-Whitney, no se encontraron diferencias significativas, en ninguna de las comparaciones realizadas (tabla 22). Sin embargo, cabe mencionar que haciendo el test unilateral se observa en la mayoría de las comparaciones que el valor crítico se encuentra al límite de la significación estadística de 0,05 (tabla 22). Estos resultados parecen indicar que existe una tendencia a una mayor tasa de expresión de *gypsy* en las hembras de Bellaterra vs Bilbao y Madeira; de Aarhus vs Bilbao, Madeira y El Pedroso; y de El Pedroso vs Bilbao.

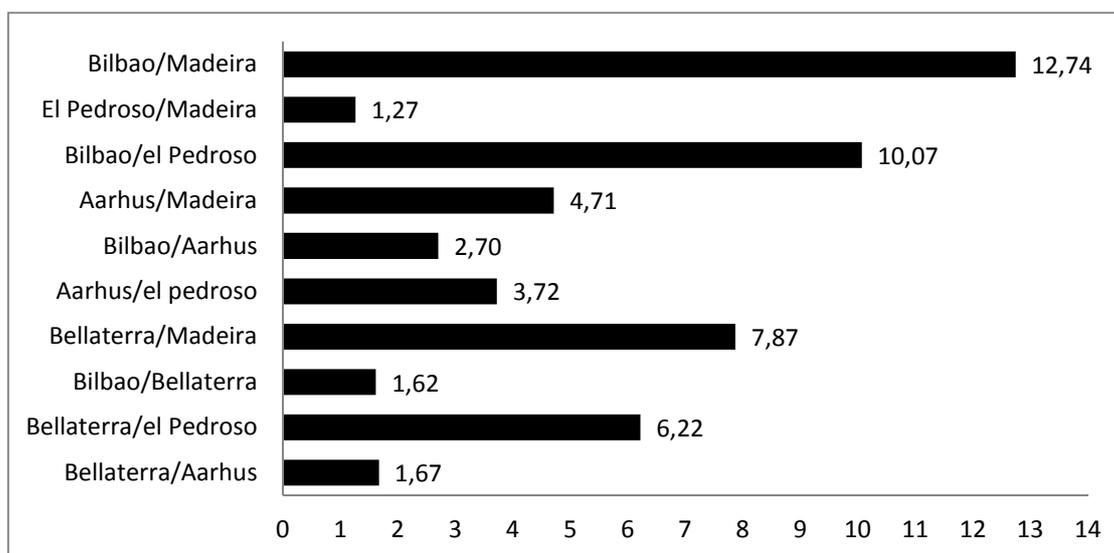
**Tabla 22. Comparaciones de las tasas de expresión de *gypsy* entre las hembras de las poblaciones originales.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Bellaterra/Aarhus	30/30	3	-0,655	0.35
Bellaterra/Bilbao	30/30	0,0	-1,964	0.05
Bellaterra/Madeira	30/30	0,0	-1,964	0.05
Bellaterra/El Pedroso	30/30	0,0	-1,964;	0,5
Aarhus/Bilbao	30/30	0,0	-1,964	0.05
Aarhus/Madeira	30/30	0,0	-1,964	0.05
Aarhus/El Pedroso	30/30	0,0	-1,964	0.05
Bilbao/Madeira	30/30	1	-1,528	0.1
Bilbao/El Pedroso	30/30	0,0	-1,964	0.05
Madeira/El Pedroso	30/30	4	-0,218	0.5

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: Valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig. exacta: valor crítico unilateral.

En los machos las tasas de expresión más altas se encontraron en Bilbao, a diferencia de lo observado en las hembras en donde *gypsy* se expresa mucho menos, que en el resto de las poblaciones. En los machos de Bellaterra y Aarhus, *gypsy*, se expresa de manera muy parecida entre ellas (1,67), presentando tasas de expresión considerablemente altas (figura 17).

**Figura 17. Tasas de expresión de *gypsy* en machos de las poblaciones originales.**



La prueba estadística de Kruskal-Wallis, en la que se compararon los incrementos de  $Ct$ , demuestra que existen diferencias de las tasas de expresión entre los machos de las poblaciones originales ( $\chi^2= 11,35$ ;  $P= 0,023^*$ ). Sin embargo, para tratar de determinar cuáles eran las poblaciones que se expresaban significativamente diferente, se realizó la prueba de Mann-Whitney de las poblaciones dos a dos. Con esta prueba estadística, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones (tabla 23). No obstante, vale la pena tener en cuenta, que al igual que en el caso de las hembras; las comparaciones de las población de Bellaterra y Aarhus, con las poblaciones de el Pedroso y Madeira, se encuentran en el límite de la significancia estadística ( $P = 0,05$ ), análisis que pueden sustentar las tendencias de mayores niveles de expresión en los machos de las poblaciones de Bellaterra y Aarhus, que en las demás poblaciones originales analizadas.

**Tabla 23. Comparaciones de las tasas de expresión entre machos de las poblaciones originales.**

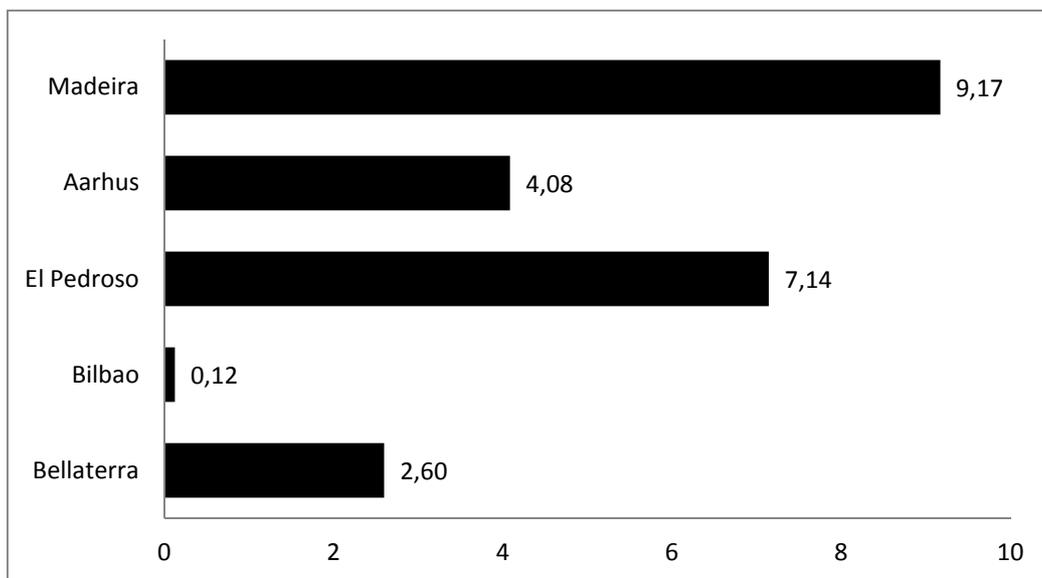
Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Bellaterra/Aarhus	30/30	1,50	-1,328	0,15
Bellaterra/Bilbao	30/30	0,0	-1,732	0,10
Bellaterra/Madeira	30/30	0,0	-1,964	0,05
Bellaterra/El Pedroso	30/30	0,0	-1,964	0,05
Aarhus/Bilbao	30/30	0,0	-1,732	0,10
Aarhus/Madeira	30/30	0,0	-1,964	0,05
Aarhus/El Pedroso	30/30	0,0	-1,964	0,05
Bilbao/Madeira	30/30	0,0	-1,732	0,10
Bilbao/El Pedroso	30/30	0,0	-1,732	0,10
Madeira/El Pedroso	30/30	4	-0,218	0,5

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (Aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

Una vez caracterizados los niveles de expresión de este ET, en hembras y machos por separado, se realizaron comparaciones entre sexos encontrándose que las tasas de expresión son más altas en las hembras que en los machos de su misma población. Por ejemplo, se observaron aumentos de tasas de expresión de más del doble (2,6), en la población de Bellaterra, hasta nueve veces más, en las hembras de la población de Madeira (9,17). La única excepción la constituye la población de Bilbao en donde dicha tendencia está invertida, como se puede observar en la figura 18.

Los análisis de Kruskal-Wallis, muestran diferencias altamente significativas cuando se compararon los incrementos de  $Ct$  de ambos sexos en todas las poblaciones originales en estudio ( $\chi^2=24,467$ ;  $P= 0.004^{**}$ ).

**Figura 18. Comparación de las tasas de expresión entre hembras vs machos de las poblaciones originales.**



Teniendo en cuenta que las hembras presentan, en la mayoría de los casos, tasas de expresión más alta que en los machos, se realizó el test de Mann-Whitney para hacer una comparación entre sexos para cada población independientemente. Los resultados esta prueba, mostraron que el valor crítico de las comparaciones de los incrementos de  $Ct$ , entre machos y hembras de las poblaciones de Bellaterra, El Pedroso, Madeira y Aarhus, se encontraban al límite de la significación estadística ( $P = 0,05$ ), como se puede observar en la tabla 24. Este nivel de significación, parece apoyar la tendencia de mayor expresión de *gypsy* en las hembras de las poblaciones originales, que en los machos.

**Tabla 24. Comparaciones entre hembras (H) y machos (M) de cada una de las poblaciones originales.**

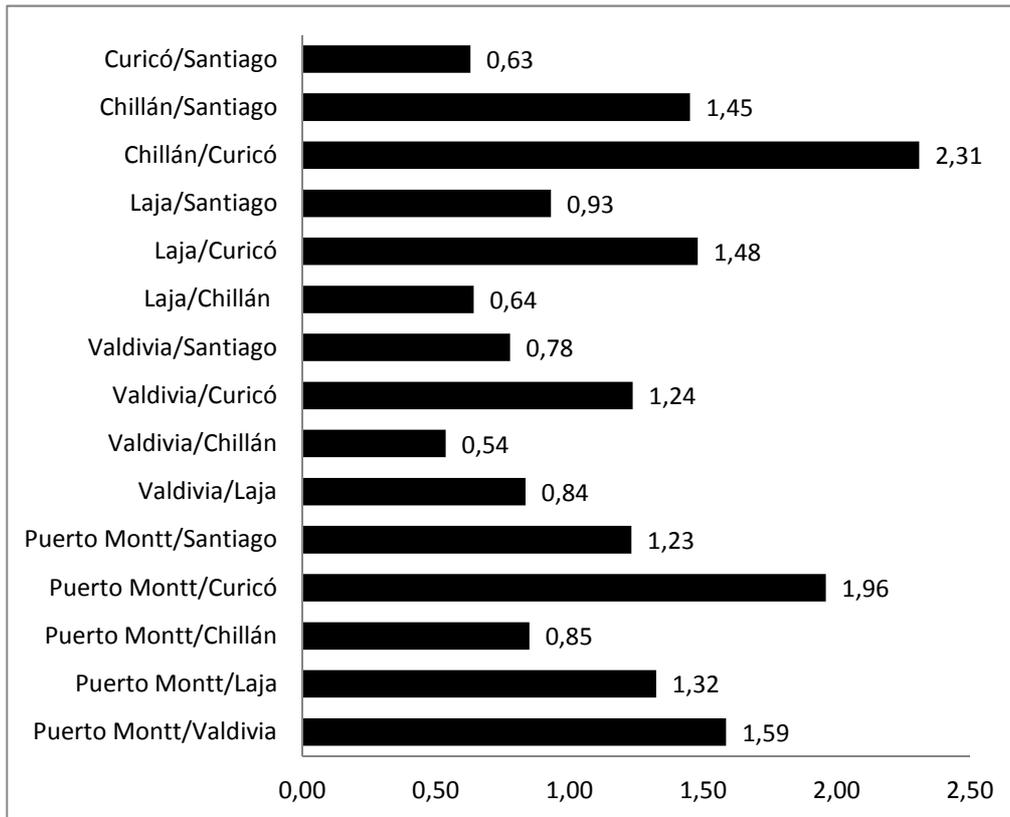
Comparación	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
H/M Aarhus	30/30	0,00	-1,96	0,05
H/M Bellaterra	30/30	0,00	-1,96	0,05
H/M Bilbao	30/30	0,00	-1,73	0,1
H/M Madeira	30/30	0,00	-1,96	0,05
H/M el Pedroso	30/30	0,00	-1,96	0,05

N: Tamaño poblacional a; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

### 3.2.2. Caracterización de los niveles de expresión de *gypsy* en poblaciones colonizadoras.

Se analizaron las tasas de expresión de seis poblaciones colonizadoras chilenas: Santiago, Chillán, Curicó, Valdivia, Puerto Montt y Laja. Los cálculos de las tasas de expresión, partiendo de los promedios del incremento de *Ct* del total de la población (hembras y machos juntos), mostraron que los niveles de expresión de *gypsy* son muy parecidos entre todas las poblaciones chilenas (figura 19). Los niveles más altos se observaron en las comparaciones entre las poblaciones de Chillán/Curicó (tasa de expresión=2,31) y Puerto Montt/Curicó (tasa de expresión =1,96). Las poblaciones en donde *gypsy* se expresa menos, son Valdivia y Curicó. En general se observa que las diferencias de los niveles de expresión entre las poblaciones colonizadoras son menores (figura 19), que los observados entre las poblaciones originales (figura 15).

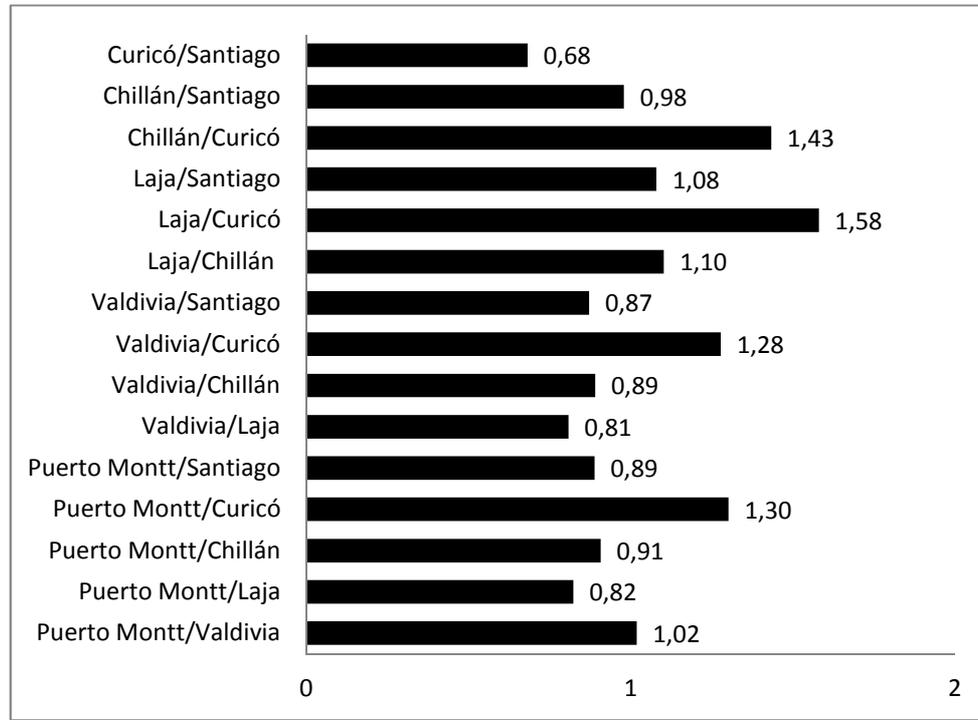
**Figura 19. Tasas de expresión de *gypsy* en poblaciones colonizadoras chilenas.**



La prueba de Kruskal-Wallis, no mostró diferencias significativas ( $\chi^2=2,743$ ;  $P=0,740$ ) entre las poblaciones colonizadoras, cuando estas se compararon como 6 grupos de datos independientes (hembras y machos juntos de cada una de las 6 poblaciones analizadas), en un mismo análisis. Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de los incrementos de *Ct*, tomando como categorías distintas las hembras de los machos, de cada una de las poblaciones colonizadoras, se encontraron diferencias altamente significativas entre los datos ( $\chi^2=30.649$ ;  $P=0.001^{**}$ ). Esto sugiere que existen niveles de expresión diferentes entre hembras y/o entre machos y, por lo tanto, se hizo un análisis por separado. Según este análisis, las tasas de expresión de *gypsy* en hembras (figura 20) no muestran diferencias muy marcadas entre las poblaciones colonizadoras; las tasas de expresión mostraron que *gypsy* se expresa casi de la misma manera entre ellas. Las poblaciones de Valdivia y Curicó son las poblaciones con las menores tasas de expresión, siendo esta última en la que *gypsy* se expresa menos. Bajo la prueba estadística de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas en los

niveles de expresión de *gypsy* ( $\chi^2=5,016$ ;  $P= 0,414$ ), a diferencia de lo encontrado en las hembras de las poblaciones originales.

**Figura 20. Tasas de expresión de *gypsy* en hembras de las poblaciones colonizadoras chilenas.**

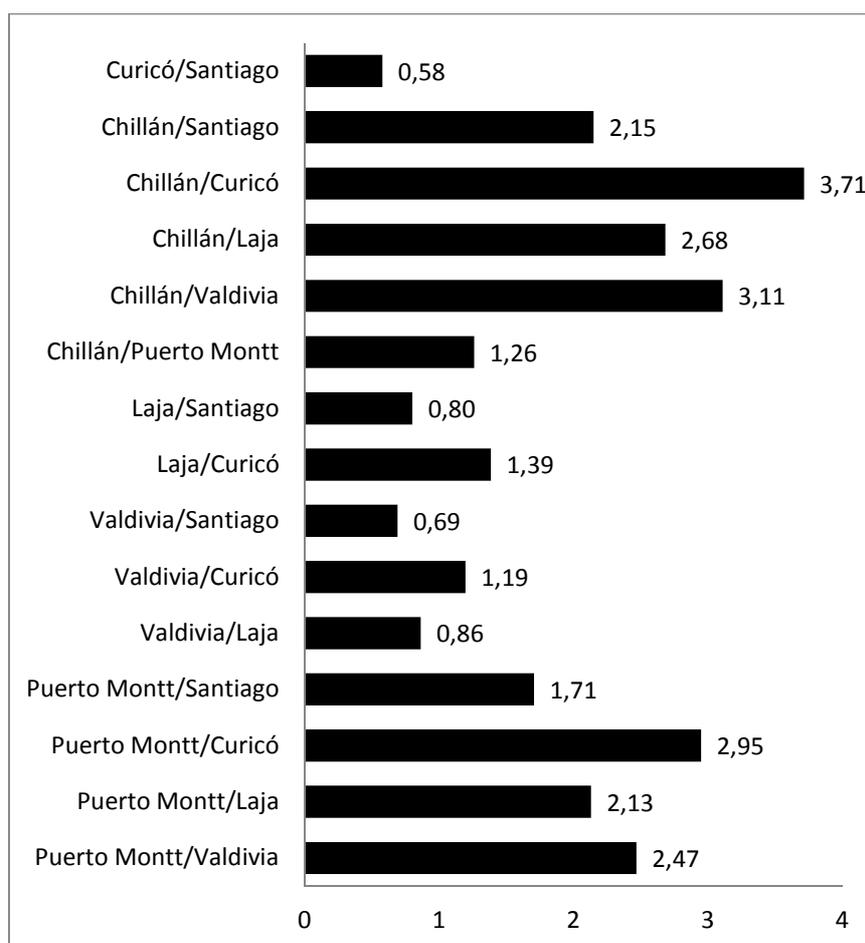


En los machos de las poblaciones colonizadoras, se observaron diferencias importantes de los niveles de expresión de *gypsy* en algunas poblaciones (figura 21). Por ejemplo, la población de Puerto Montt se expresa casi el doble que las de Curicó, Valdivia, Laja y Santiago. Lo mismo se observa cuando comparamos las poblaciones de Chillán y Santiago. Las tasas de expresión más altas, se encontraron en la población de Chillán, seguida de Puerto Montt y la más baja se observó, al igual que en las hembras, en la población de Curicó.

Al comparar los incrementos de *Ct*, de los machos de todas las poblaciones colonizadoras bajo la prueba estadística de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $\chi^2=12,018$ ;  $P = 0,035^*$ ), dado que Chillán y Puerto Montt fueron las que presentaron las mayores tasas de expresión, se realizaron pruebas de este estadístico bajo diferentes niveles de expresión con el fin de determinar su influencia en este resultado: 1) Agrupando estas dos poblaciones como una sola variable, comparándola con las demás, lo que también

mostró diferencias significativas ( $\chi^2 = 11,97$ ;  $P = 0,018^*$ ), y 2) eximiéndolas del análisis, lo que confirmó que las diferencias encontradas entre los machos de las poblaciones colonizadoras estaban determinadas por Chillán y Puerto Montt, ya que bajo esta prueba no se observaron diferencias significativas ( $\chi^2 = 1,31$ ;  $P = 0,727$ ). Este resultado confirmó, a su vez, que estas dos poblaciones presentan diferencias significativas en las tasas de expresión frente al resto.

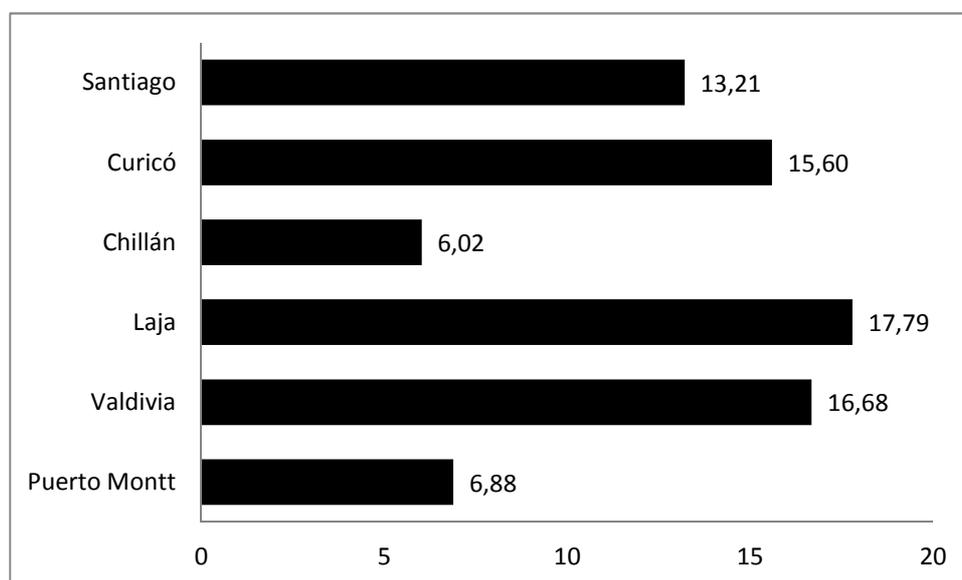
**Figura 21: Tasas de expresión de *gypsy* en machos de poblaciones colonizadoras.**



En las comparaciones intrapoblacionales, entre hembras vs machos, se observó un mayor incremento de la expresión de *gypsy* en las hembras (figura 22), de todas las poblaciones analizadas. Por ejemplo, las poblaciones de Valdivia, Laja, Curicó y Santiago, presentan incrementos de hasta 10 veces más que en los machos. En Puerto Montt y Chillán el incremento es menor, pero sigue siendo muy alto (6,88 y 6,02 respectivamente).

La prueba de Mann-Whitney, no mostró diferencias significativas de niveles de expresión de hembras con respecto a los machos (tabla 25). Pese a ello, vale la pena tener en cuenta que todas las comparaciones se encontraban en el límite de su significación estadística ( $P=0,05$ ) y, que además, cuando se compararon todas las hembras vs la totalidad de los machos se encontraron diferencias altamente significativas (tabla 25). A la luz de estos resultados, se podría considerar que *gypsy*, presentó una marcada tendencia de mayor expresión en las hembras que en los machos.

**Figura 22. Comparación de las tasas de expresión de *gypsy* en hembras vs machos de cada una de las poblaciones colonizadoras.**



**Tabla 25. Comparaciones de las tasas de expresión entre hembras y machos para cada población colonizadora.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Colonizadoras	180/180	0,0	-5,126	0,0
Puerto Montt	30/30	0,0	-1,964	0,05
Valdivia	30/30	0,0	-1,964	0,05
Laja	30/30	0,0	-1,964	0,05
Chillán	30/30	0,0	-1,964	0,05
Curicó	30/30	0,0	-1,964	0,05
Santiago	30/30	0,0	-1,964	0,05

H: hembras; M: Machos; N: Tamaño poblacional analizado; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: Valor de la tipificación de U (Aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

### 3.2.3.1. Comparación de las tasas de expresión de *gypsy* entre poblaciones colonizadoras y originales

Una vez analizada la expresión de *gypsy* en las poblaciones originales y colonizadoras de manera individual, se realizaron comparaciones entre estas dos categorías de poblaciones. Uno de los principales objetivos de este estudio era el de indagar sobre la influencia de los procesos de colonización sobre los niveles de expresión del ET *gypsy*.

Se realizaron comparaciones de las tasas de expresión a nivel poblacional, y entre sexos, teniendo en cuenta los *Ct* promedios de las tres réplicas de cada población. Los resultados mostraron: que las poblaciones colonizadoras presentan tasas de expresión más altas que las originales de El Pedroso, Bilbao y Madeira, en algunos casos estos incrementos son de hasta cuatro veces más (figura 23).

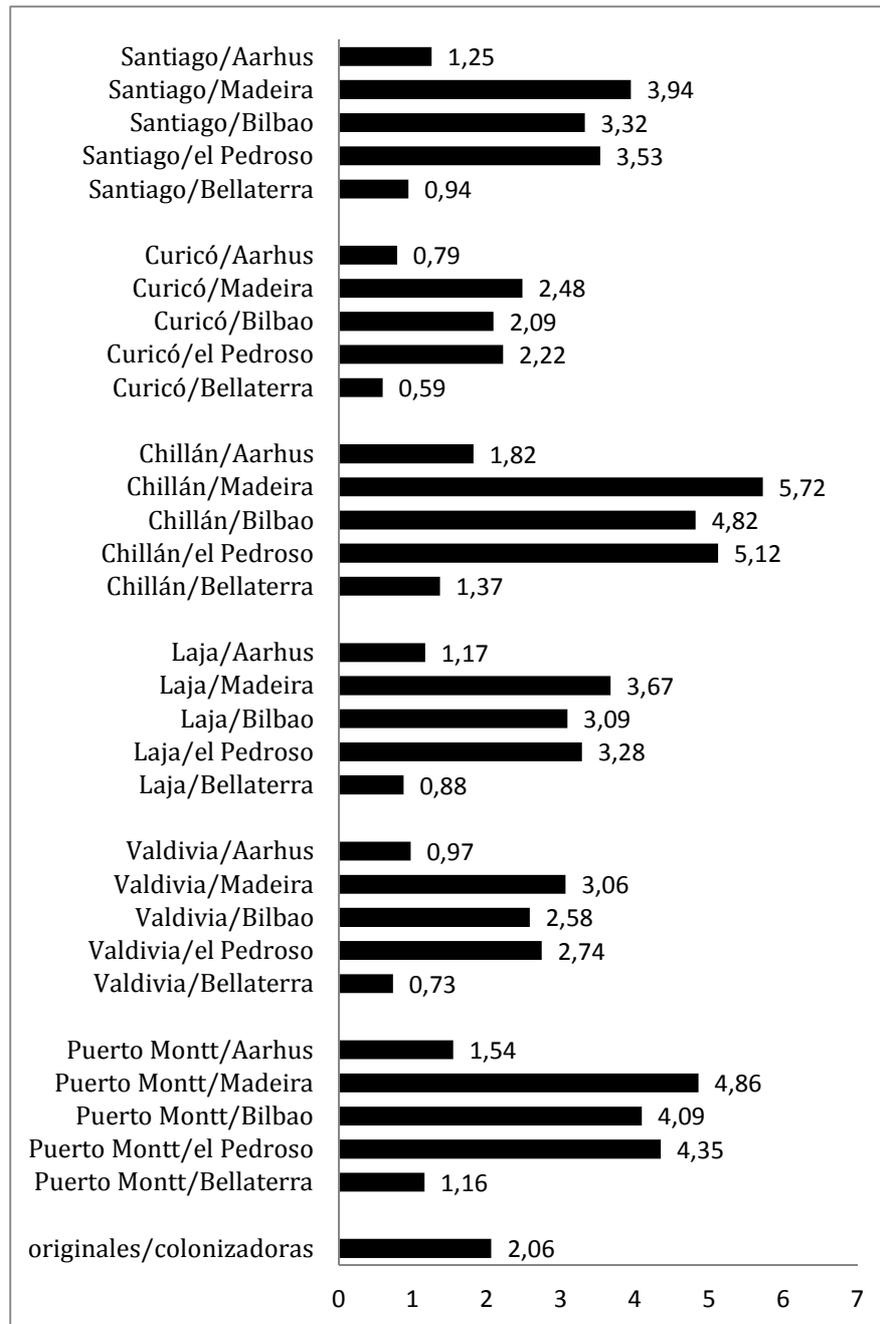
Por otra parte, se encontró que en las poblaciones de Puerto Montt, Chillán y Santiago los niveles de expresión de *gypsy* son aproximadamente iguales a los de las poblaciones europeas de Bellaterra y Aarhus, poblaciones originales en las que *gypsy* presentó mayores tasas de expresión, con excepción de la comparación entre Chillán/Aarhus, en donde la tasa de expresión es mayor (1,82). En las poblaciones de Valdivia y Laja la expresión de *gypsy*, es aproximadamente igual que en la población danesa de Aarhus (figura 23).

En términos generales, las comparaciones entre las poblaciones colonizadoras vs las originales mostraron un incremento de la expresión de *gypsy*, dos veces más en las primeras respecto a las segundas (tasa de expresión colonizadoras/originales = 2,06).

La prueba estadística de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ( $\chi^2=11,118$ ;  $P= 0,348$ ) entre las poblaciones colonizadoras vs originales, no obstante, cuando se realizó esta prueba estadística sin las poblaciones de Bellaterra y Aarhus, se encontraron diferencias altamente significativa ( $\chi^2=47,59$ ;  $P<0,01$ ). Este nivel de significación también se observó cuando se analizaron los datos tomando como categorías distintas las hembras de los machos ( $\chi^2=59,724$ ;

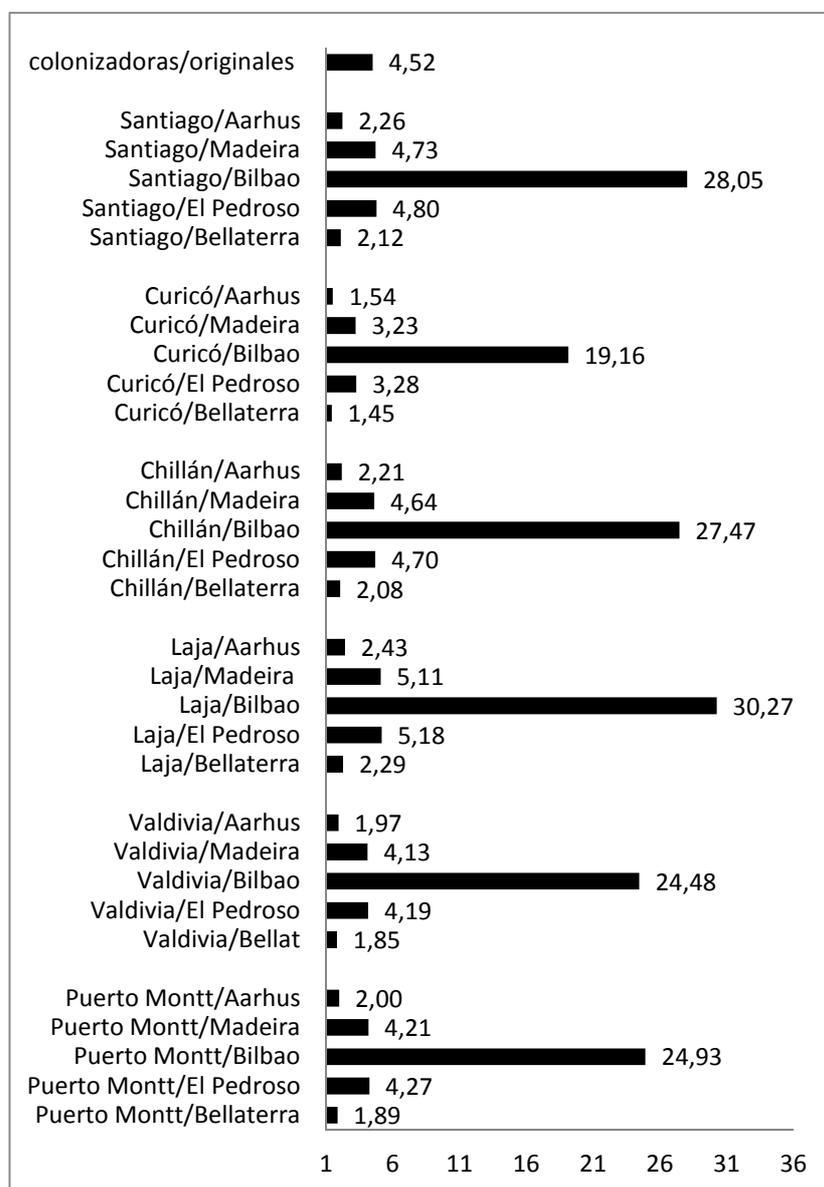
$P < 0.01$ ). Los resultados de las diferentes pruebas estadísticas indicarían que el nivel de expresión de *gypsy* en las poblaciones originales de Aarhus y Bellaterra no se diferencia del encontrado en las poblaciones colonizadoras. Y por otra parte, confirman que las colonizadoras presentan tasas de expresión significativamente más altas con respecto al resto de las poblaciones originales.

**Figura 23. Tasas de expresión de *gypsy* en poblaciones colonizadoras vs originales.**



Las comparaciones, entre las hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales (figura 24), mostraron que en las colonizadoras *gypsy* presenta un incremento de las tasas de expresión del doble con respecto a la mayoría de las poblaciones europeas. Los mayores niveles de expresión se observaron, en las comparaciones con la población de Bilbao, cuyo nivel de expresión es el más bajo entre las poblaciones originales. Sin embargo, la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias entre las tasas de expresión en hembras de poblaciones colonizadoras vs originales ( $\chi^2=16,229$ ;  $P=0,093$ ). No obstante, con la prueba de Mann-Whitney se pudo constatar que sí existen tales diferencias y que son altamente significativas ( $U=4$ ;  $Z= -4,73$ ;  $P<0,01$ ).

**Figura 24. Comparación de las tasas de expresión entre hembras de las poblaciones colonizadoras vs hembras de las poblaciones originales.**



En los machos, la mayoría de las poblaciones colonizadoras presentaron una drástica disminución en las tasas de expresión con respecto a las poblaciones originales (figura 25). En las comparaciones de las colonizadoras con respecto a las poblaciones originales de Madeira y El Pedroso se observa, claramente, un mayor incremento de las tasas de expresión. En la población de Curicó se observó que *gypsy* se expresa aproximadamente igual que la población de El Pedroso, lo mismo se observa cuando se comparan las poblaciones de Chillán vs Aarhus. Estos resultados difieren notablemente de lo encontrado en las hembras en donde el incremento de expresión se observaba en el conjunto de las poblaciones colonizadoras.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias altamente significativas en las comparaciones entre machos de poblaciones colonizadoras vs originales ( $\chi^2=23,994$ ;  $P=0,008^{**}$ ). No obstante, tales diferencias no fueron igualmente detectadas a través de la prueba de Mann-Whitney ( $U=119$ ;  $Z= -0,266$ ;  $P= 0,4$ ).

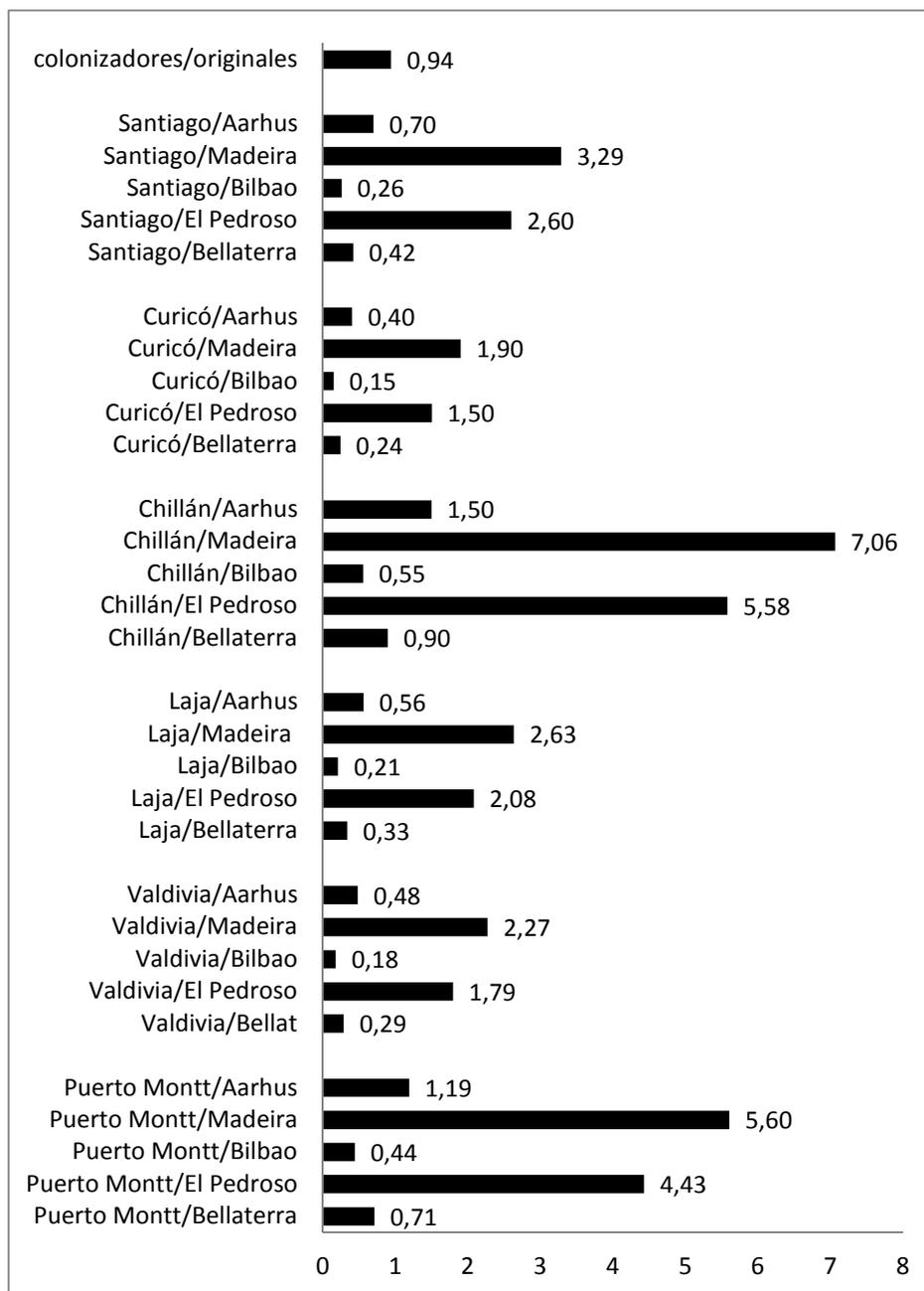
### **3.3. Tasas de expresión de *bilbo***

Las tasas de expresión de *bilbo* en las poblaciones originales y colonizadoras, mostraron ser menores que las encontradas para el ET *gypsy*.

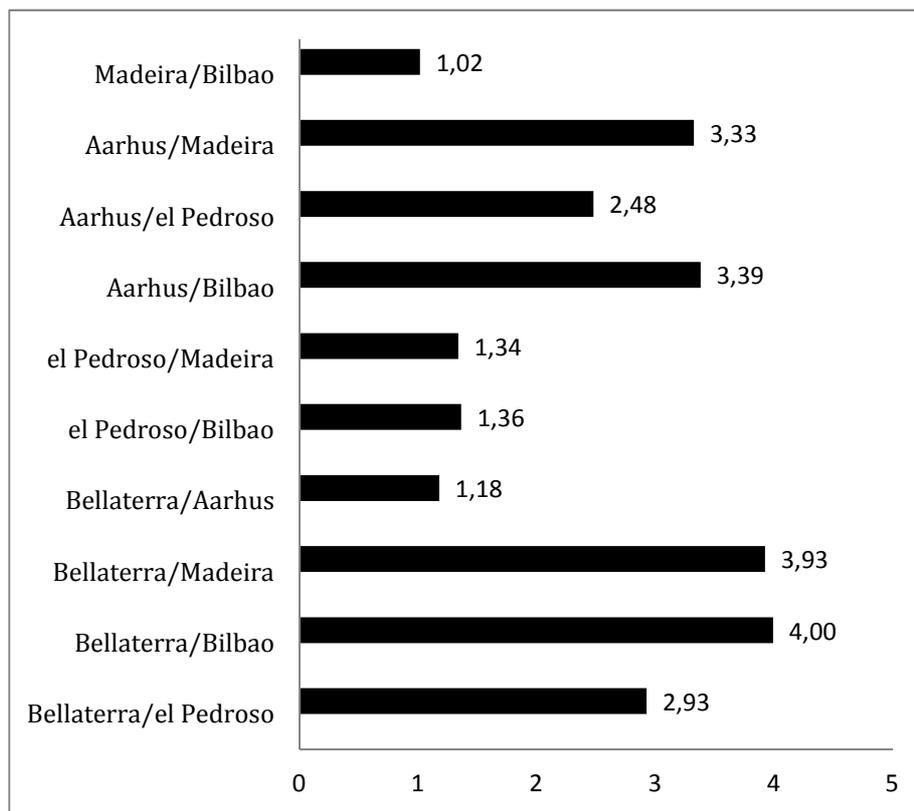
#### **3.3.1. Caracterización de los niveles de expresión de *bilbo* en poblaciones originales**

Las comparaciones, entre poblaciones originales (figura 26), mostraron que Bellaterra y Aarhus presentan mayores tasas de expresión con respecto a las demás, no obstante, entre ellas los niveles de expresión son casi iguales (1, 18). Las poblaciones de El Pedroso, Bilbao y Madeira mostraron también niveles de expresión casi iguales.

**Figura 25. Comparación de las tasas de expresión entre machos de las poblaciones colonizadoras vs machos de las poblaciones originales.**



**Figura 26. Tasas de expresión de *bilbo* entre las poblaciones originales.**



Los análisis de Kruskal-Wallis, comparando los incrementos de *Ct* de cada una de las poblaciones, como 5 grupos de datos independientes, mostraron diferencias significativas de las tasas de expresión de estas poblaciones ( $\chi^2=12,503$ ;  $P=0,014^*$ ). Con el fin de determinar qué comparaciones influyen sobre este nivel de significación, se realizaron análisis estadísticos por pares de poblaciones utilizando la prueba de Mann-Whitney (tabla 26), se observaron diferencias significativas cuando se comparan las poblaciones de mayores niveles de expresión (Bellaterra y Aarhus) con las de niveles más bajos (Bilbao y Madeira).

**Tabla 26. Prueba de Mann Whitney para comparaciones de tasas de expresión de *bilbo* entre poblaciones originales.**

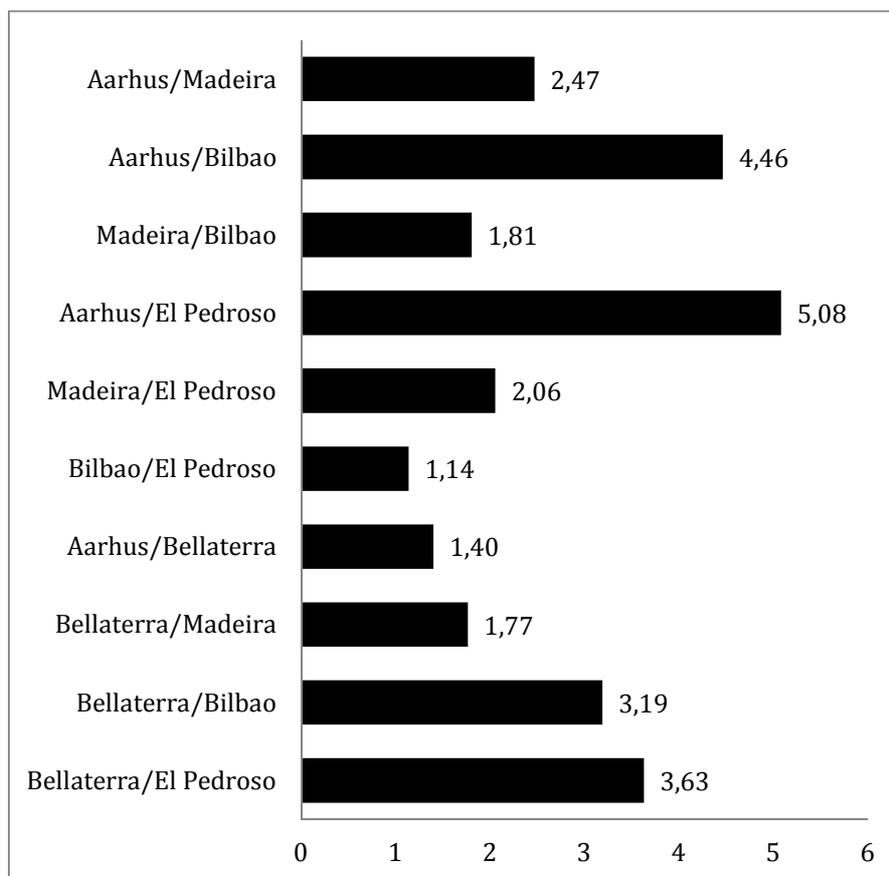
Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Bellaterra/el Pedroso	60/60	10,0	-1,281	0,12
Bellaterra/Bilbao	60/60	3,0	-2,191	0,015*
Bellaterra/Madeira	60/60	1,0	-2,722	0,002**
Bellaterra/Aarhus	60/60	17,0	-0,160	0,469
el Pedroso/Bilbao	60/60	11,0	-0,730	0,268
el Pedroso/Madeira	60/60	16,0	-0,320	0,409
el Pedroso/Aarhus	60/60	11,0	-1,121	0,155
Bilbao/Madeira	60/60	13,0	-0,365	0,396
Bilbao/Aarhus	60/60	1,0	-2,556	0,004**
Madeira/Aarhus	60/60	0,0	-2,882	0,001**

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig.exacta, valor crítico unilateral.

Teniendo en cuenta que los mecanismos de regulación de los ETs pueden ser diferentes entre sexos, se realizaron comparaciones de los niveles de expresión de hembras y machos por separado. Los análisis de las tasas de expresión en las hembras (figura 27) mostraron que *bilbo* tiene una tasa similar en las poblaciones de Aarhus y Bellaterra (1,40). Sin embargo, cuando comparamos estas poblaciones con el resto, son las que más se expresan. Las poblaciones que presentaron las tasas más bajas fueron Bilbao y El Pedroso, que a su vez, presentan niveles de expresión similares, cuando se comparan entre ellas.

Las pruebas de Kruskal-Wallis, demostraron que existen diferencias altamente significativas, en los niveles de expresión entre las hembras de las poblaciones originales ( $\chi^2=11,233$ ;  $P=0.002^{**}$ ). Sin embargo, cuando se analizaron los incrementos de *Ct* por pares de poblaciones, usando la prueba estadística de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias significativas (tabla 26). Es importante tener en cuenta, en este caso, que el valor crítico se encontró en el límite de la significación estadística ( $P=0,05$ ). A pesar de ello, se observa una tendencia a mayores niveles de expresión en Bellaterra y Aarhus, que en el resto de las poblaciones originales en estudio.

**Figura 27. Tasas de expresión de *bilbo* en hembras de las poblaciones originales.**



**Tabla 27. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre hembras de poblaciones originales.**

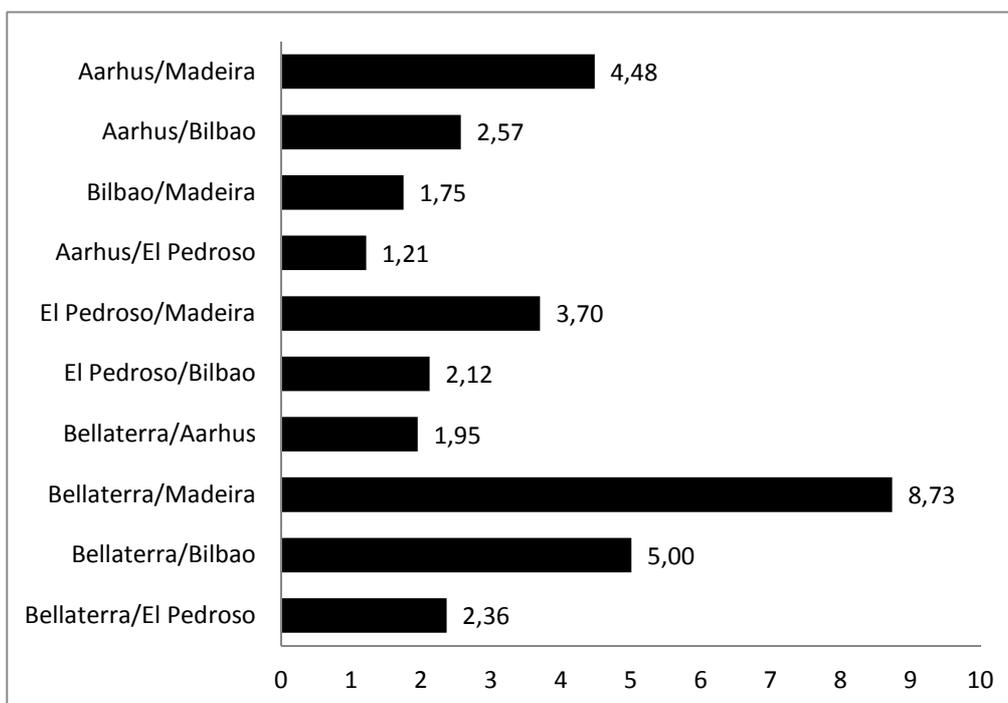
Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
<b>Bellaterra/el Pedroso</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05
<b>Bellaterra/Bilbao</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05
<b>Bellaterra/Madeira</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05
<b>Bellaterra/Aarhus</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>El Pedroso/Bilbao</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>El Pedroso/Madeira</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>El Pedroso/Aarhus</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05
<b>Bilbao/Madeira</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Bilbao/Aarhus</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05
<b>Madeira/Aarhus</b>	30/30	0,00	-1,964	0,05

N: Tamaño poblacional analizado; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig exacta: valor crítico unilateral.

Con respecto a los machos (figura 28), *bilbo*, también, presentó una mayor expresión en las poblaciones de Bellaterra y Aarhus, en este caso es en Bellaterra donde se expresa dos veces más que en Aarhus (Bellaterra/Aarhus= 1,95). La población de El Pedroso presentó tasas de expresión altas, a diferencia de lo encontrado en las hembras de esta población. En Bilbao la tasa de expresión es baja, sin embargo, los niveles más bajos de expresión se observaron en Madeira.

Los análisis estadísticos, prueba de Kruskal-Wallis, mostraron la existencia de diferencias significativas, entre los machos de las poblaciones originales ( $\chi^2= 10,61$ ;  $P= 0,03^*$ ).

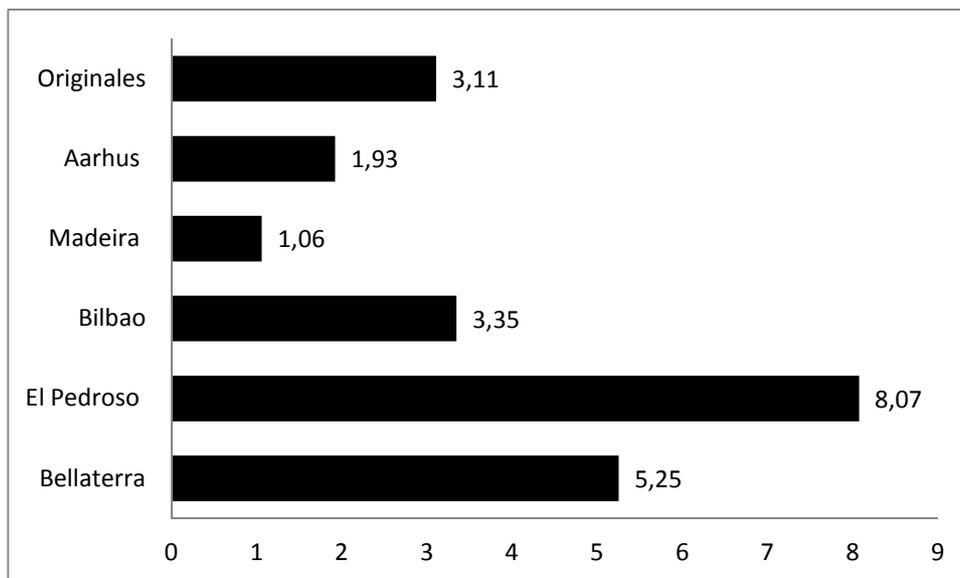
**Figura 28. Tasas de expresión de *bilbo* en machos de las poblaciones originales.**



Para determinar si existe una diferencia real de la expresión de *bilbo* entre sexos, se realizaron comparaciones intrapoblacionales entre machos y hembras. En estas comparaciones se observó, en cuatro de las cinco poblaciones originales en estudio, que en los machos *bilbo* tiende a expresarse mucho más que en las hembras. En El Pedroso fue donde se encontraron mayores diferencias de tasas de expresión de *bilbo* entre machos y hembras (8,07), No obstante, en Bellaterra, Bilbao y Aarhus, también se observaron incrementos importantes en las tasas de

expresión. Madeira fue la única población que mostró una tasa de expresión similar entre machos y hembras (1,06), como se muestra en la figura 29.

**Figura 29. Comparación de las tasas de expresión de *bilbo* entre machos y hembras de las originales.**



La prueba de Kruskal-Wallis, en la que se compararon machos y hembras de todas las poblaciones, agrupando las replicas por sexos para cada población, mostraron que existen diferencias altamente significativas, entre las medias de los diferentes grupos de datos ( $\chi^2= 25,464$ ;  $P= 0,002^{**}$ ). Es decir, que los niveles de expresión entre los machos y hembras tienden a ser diferentes, tal y como lo muestran las tasas de expresión (figura 29). Teniendo en cuenta que también se encontraron diferencias significativas entre las hembras, y que esto pudo condicionar los resultados de la prueba estadística, se realizaron análisis agrupando todos los machos y las hembras en dos categorías mediante la prueba de Mann-Whitney. El análisis estadístico mostró que existen diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), entre los incrementos de *Ct* de machos vs Hembras, como se puede observar en la primera comparación anotada en la tabla 28, ver también la comparación (M/H) originales.

Con el fin de detallar las comparaciones que pudieron influenciar estos niveles de significación, se realizaron las comparaciones, por pares, entre los machos vs hembras de las originales en estudio (tabla 28). Los resultados de esta prueba no mostraron diferencias significativas, entre sexos. Sin embargo, a excepción de las comparaciones con los machos de Bilbao y Madeira, el resto de las comparaciones poblacionales mostraron un valor crítico que está en el límite de la significación estadística.

**Tabla 28. Prueba de Mann Whitney para las comparaciones entre machos (M) vs hembras (H) de poblaciones originales.**

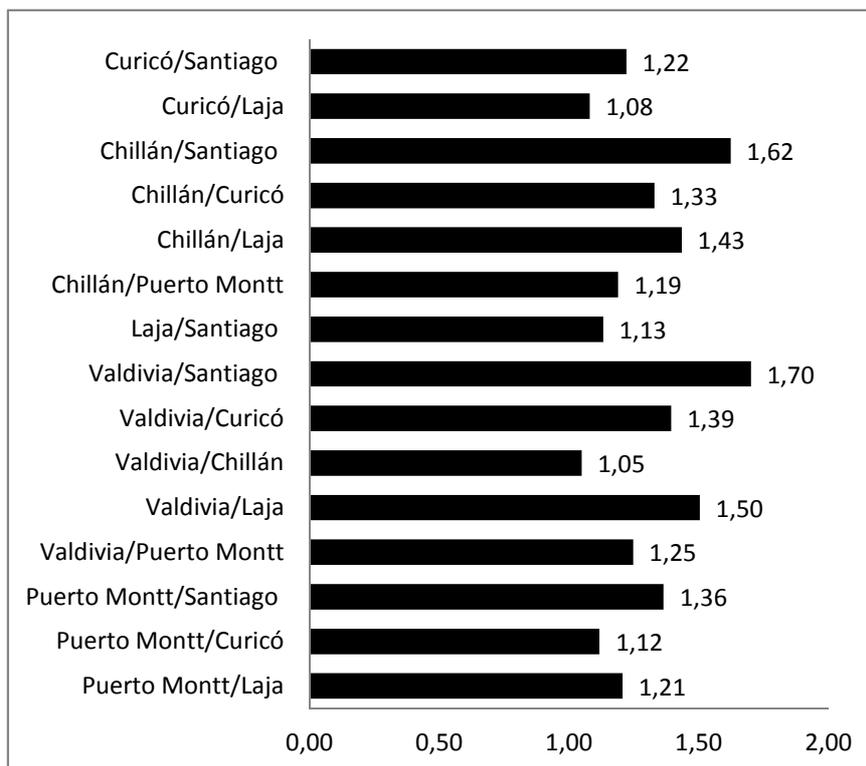
Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
<b>Originales</b>	150/150	32	-3,333	0
<b>Bellaterra</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>El Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Madeira</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Aarhus</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

### 3.3.2. Caracterización de los niveles de expresión de *bilbo* en poblaciones colonizadoras chilenas.

La expresión de *bilbo* en las poblaciones chilenas (figura 21) es muy similar entre ellas, al igual que lo encontrado para *gypsy* en estas mismas poblaciones. La tasa más alta de expresión se presentó en Valdivia y la menor en Santiago, de ahí, que al compararlas, se observe la mayor tasa de expresión (1,70). Como se mencionó anteriormente entre las poblaciones colonizadoras, *bilbo* no presenta diferencias marcadas en los niveles de expresión, con los análisis de Kruskal-Wallis se confirmaron estos resultados ( $\chi^2= 2,574$ ;  $P= 0,765$ ).

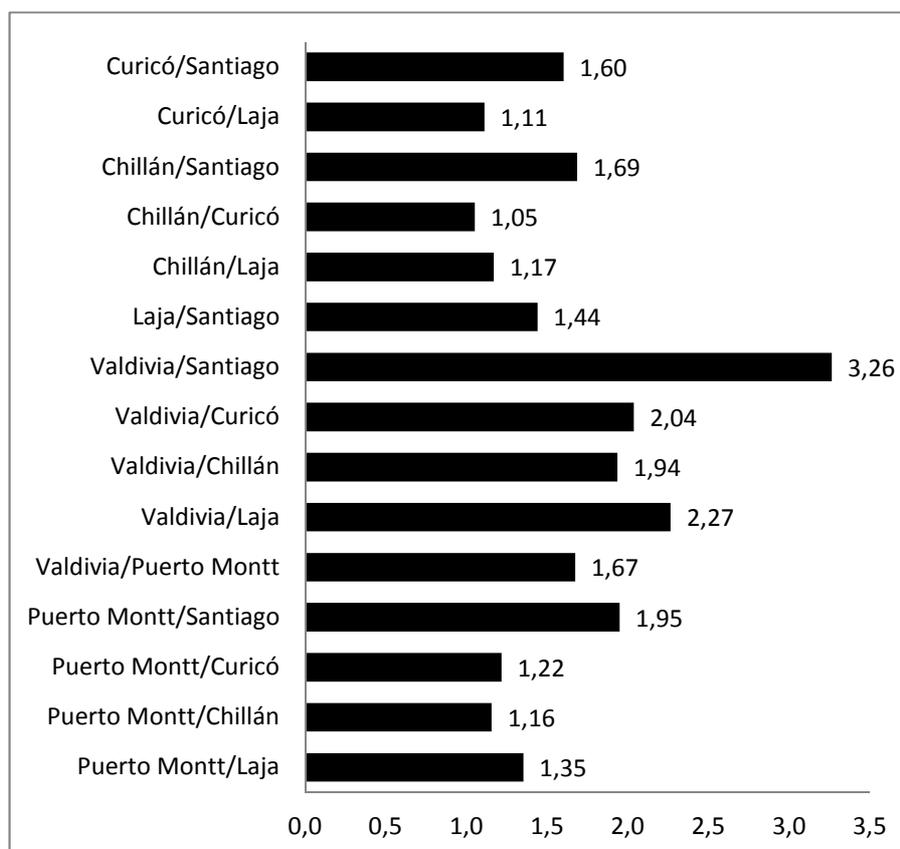
**Figura 30. Tasas de expresión de *bilbo* en las poblaciones colonizadoras.**



A continuación, se realizaron comparaciones entre estas poblaciones separadas por sexos, para dilucidar si existen diferencias de expresión a ese nivel. En las hembras (figura 31) la mayor tasa de expresión de *bilbo* se encontró en la población de Valdivia y la menor en Santiago. Las mayores tasas expresión se observaron cuando se comparó Valdivia con el resto de las poblaciones. También en Puerto Montt, *bilbo*, se expresa casi dos veces más que en la población de Santiago (1,95). Salvo contadas excepciones, la expresión de *bilbo* en las hembras de las poblaciones chilenas es bastante similar.

Los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal-Wallis, no mostraron diferencias significativas de la expresión de *bilbo*, entre las hembras de las poblaciones colonizadoras ( $\chi^2= 8,125$ ;  $P= 0,149$ ). No obstante, cuando se compararon las hembras de Valdivia vs Santiago y Laja, a través de la prueba de Mann-Whitney; el valor crítico se encontraba en el límite de la significación estadística. Este resultado indica que existe una tendencia a una tasa de expresión mayor de *bilbo* en la población de Valdivia con respecto a Santiago y Laja.

**Figura 31. Tasas de expresión de *bilbo* en las hembras de las poblaciones colonizadoras.**

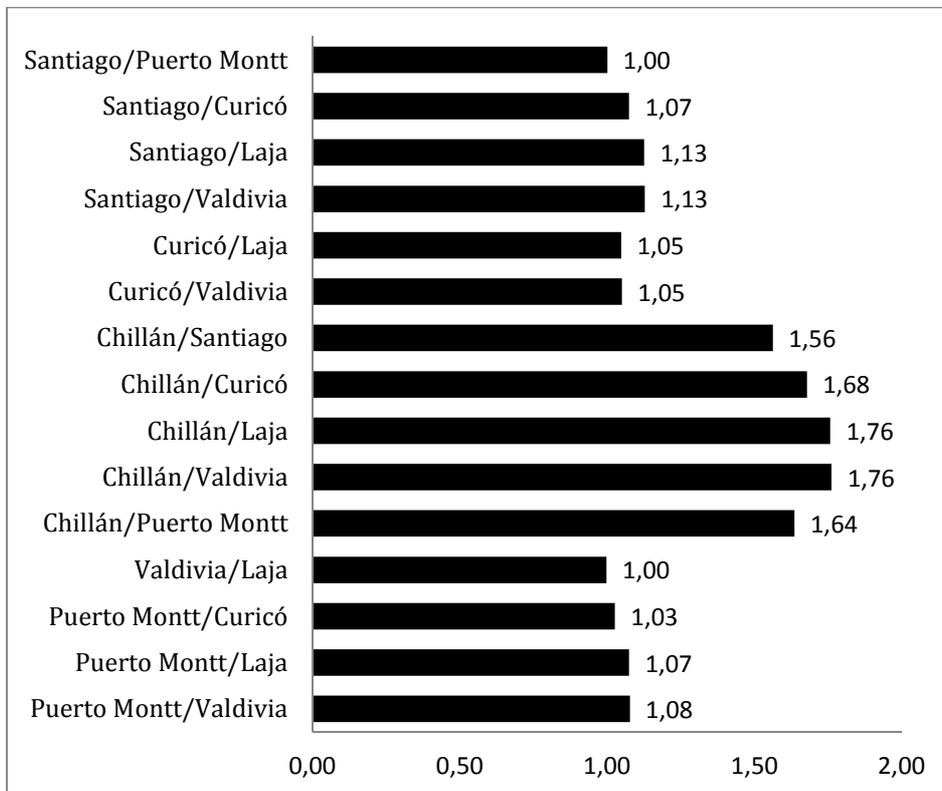


En los machos de Chillán, *bilbo*, presentó las mayores tasas de expresión al compararlas con el resto de las poblaciones (figura 32). Este resultado difiere al encontrado en las hembras, en ellas *bilbo* se expresó mucho más en esta población, que en el resto de colonizadoras. A pesar de estas puntualizaciones las tasas de expresión en machos son bastante similares en el conjunto de las poblaciones colonizadoras. Además, esta observación fue confirmada por la prueba de Kruskal-Wallis que no mostró diferencias significativas ( $\chi^2 = 6,065$ ;  $P = 0,3$ ).

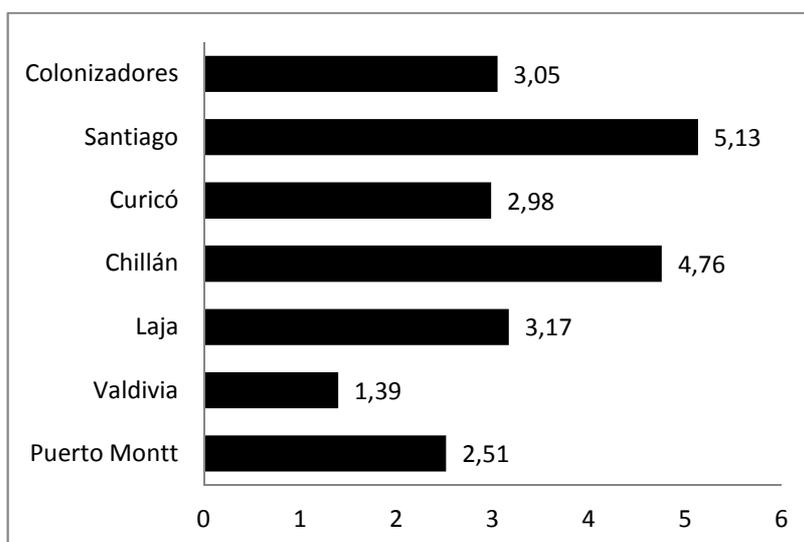
En la figura 33 se presentan los resultados de las comparaciones de tasas de expresión en machos con respecto a hembras. Los valores, en la mayoría de los casos, son de más de dos veces mayores en machos con respecto a las hembras. Santiago es la población que presenta mayor diferencia de expresión entre sus machos y hembras. Los machos de las poblaciones chilenas de Laja, Curicó y Puerto Montt, presentaron tasas de expresión más bajas con respecto a las hembras, pero no menos importantes (3,17; 2,98; 2,51 respectivamente). Uno de los resultados

que más difiere, con respecto a los encontrados para *gypsy*, es la tendencia de expresión que *bilbo* presentó entre sexos donde los niveles de expresión son más altos en los machos que en las hembras.

**Figura 32. Tasas de expresión de *bilbo* en los machos de poblaciones colonizadoras.**



**Figura 33. Relación de tasas de expresión de *bilbo* entre los machos vs hembras de las poblaciones colonizadoras.**



La prueba Kruskal-Wallis, mostró que las diferencias de tasas de expresión de machos y hembras son altamente significativas ( $\chi^2= 27,455$ ;  $P= 0,004^{**}$ ).

La comparaciones, en la que se agruparon en una sola categoría a los machos, y de igual manera las hembras, mostró que entre sexos existen diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ; primera comparación de la tabla 29). Apoyando con ello, que en los machos *bilbo* presentan niveles de expresión más altos que las hembras. Cuando se realizaron las comparaciones entre machos y hembras dentro de una misma población, los resultados no lograron mostrar diferencias significativas. Pese a ello es importante mencionar que el valor crítico, de dicha prueba, estaba al límite de su significación estadística, con excepción de la población de Valdivia, lo que puede apoyar las tendencias de *bilbo* a expresarse más en los machos que en las hembras en las poblaciones chilenas. Tendencia que también se observó en los machos de las poblaciones originales.

**Tabla 29. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre machos vs hembras, de las poblaciones colonizadoras.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Colonizadoras	180/180	16	4,62	<0.01
Puerto Montt	30/30	0	-1,964	0,05
Valdivia	30/30	3,0	-0,655	0,35
Laja	30/30	0	-1,964	0,05
Chillán	30/30	0	-1,964	0,05
Curicó	30/30	0	-1,964	0,05
Santiago	30/30	0	-1,964	0,05

M: Machos; H: Hembras; N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta: valor crítico unilateral.

### 3.3.3. Comparación de las tasas de expresión de bilbo entre poblaciones originales y colonizadoras

En los apartados anteriores se han consignado, por separado, los análisis de expresión de *bilbo* de las poblaciones originales y colonizadoras. Con el fin de indagar sobre la posible influencia de los procesos de colonización, sobre los

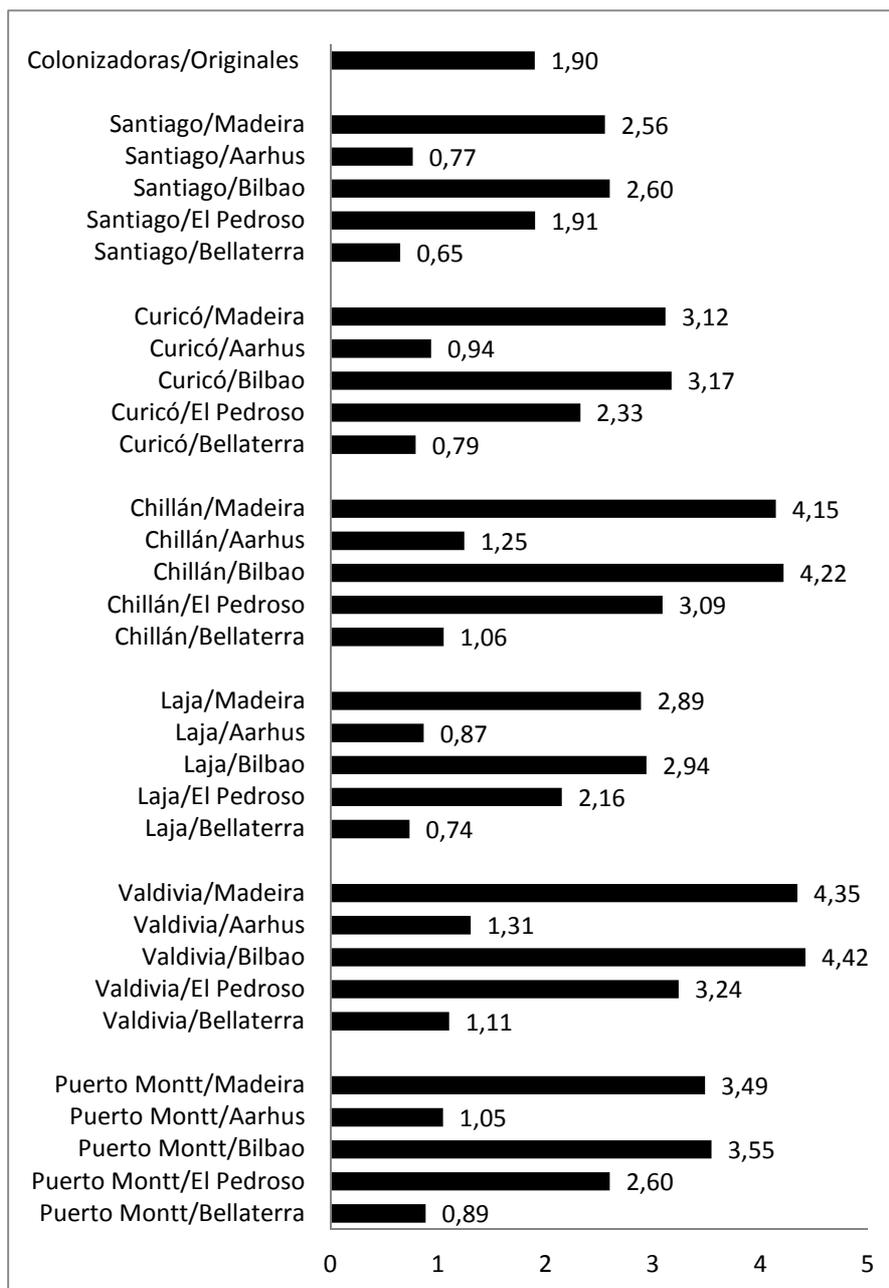
niveles de expresión del ET *bilbo*, se realizaron comparaciones de las tasas de expresión entre estos dos tipos de poblaciones, a diferentes niveles.

Los cálculos de las tasas de expresión de poblaciones colonizadoras vs originales (figura 34), mostraron un incremento en las colonizadoras de casi dos veces superior a las originales (colonizadoras/originales= 1,90). Esta tendencia se confirmó, en algunas de las colonizadoras, cuando se realizaron las comparaciones con las originales por pares. Por ejemplo, las poblaciones colonizadoras mostraron niveles de expresión más altos que las poblaciones originales de El Pedroso, Bilbao y Madeira, llegando a ser cuatro veces mayor en algunos casos. Sin embargo, esta tendencia no se observó, con las poblaciones de Bellaterra y Aarhus cuyo nivel de expresión es similar al de las poblaciones chilenas.

11 grupos de datos independientes (6 poblaciones colonizadoras y 5 originales), agrupando en un mismo conjunto de datos; machos y hembras en cada población ( $\chi^2= 23,063$ ;  $P= 0,011^*$ ). 2) Cuando se analizaron en una misma prueba, como datos independientes las hembras de los machos de cada una de las poblaciones colonizadoras, y originales ( $\chi^2= 56,25$ ;  $P < 0,01$ ). 3). Con la prueba de Mann-Whitney agrupando en un solo conjunto de datos todas las poblaciones colonizadoras y en otro todas las poblaciones originales (primera comparación tabla 30).

Con el fin de determinar los grupos de datos que pudieron influenciar en los niveles de significación encontrados, en los análisis estadísticos antes mencionados, se realizaron todas las comparaciones posibles entre poblaciones colonizadoras vs originales mediante la prueba de Mann-Whitney (tabla 30). Los resultados mostraron que, a excepción de la población de Santiago, todas las poblaciones colonizadoras presentan mayores niveles de expresión que las originales de Bilbao y Madeira (tabla 30).

**Figura 34. Tasas de expresión de *bilbo* entre poblaciones colonizadoras vs poblaciones originales europeas.**



En términos generales, se puede decir que las poblaciones de Valdivia y Chillán, presentaron los niveles más altos de expresión, seguidas de las poblaciones de Puerto Montt, Curicó y Laja. Por otra parte, en Santiago se observaron los niveles de expresión más bajos del conjunto de poblaciones colonizadoras.

Los análisis estadísticos (prueba de Kruskal-Wallis) mostraron que existen diferencias significativas en los niveles de expresión entre poblaciones colonizadoras y originales, bajo diferentes niveles de comparación: 1) Comparando

En las comparaciones entre Valdivia/El Pedroso; Chillán/El Pedroso y Chillán/Madeira, se observó que el valor crítico, se encontraba al límite de la significación estadística. Este resultado apoya la observación de una tendencia hacia una tasa de expresión de *bilbo* mayor en las poblaciones colonizadoras.

**Tabla 30. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre las poblaciones colonizadoras y las originales.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Colonizadoras/Orientales	360/300	310,5	-2,791	0,002**
Puerto Montt/Bellaterra	60/60	17,0	-0,160	0,469
Puerto Montt/El Pedroso	60/60	10,0	-1,281	0,12
Puerto Montt/Bilbao	60/60	2,0	-2,373	0,009**
Puerto Montt/Madeira	60/60	0,0	-2,882	0,001**
Puerto Montt/Aarhus	60/60	16,0	-0,320	0,409
Valdivia/Bellaterra	60/60	16,0	-0,320	0,409
Valdivia/El Pedroso	60/60	7,5	-1,684	0,051
Valdivia/Bilbao	60/60	1,0	-2,556	0,004**
Valdivia/Madeira	60/60	0,0	-2,882	0,001**
Valdivia/Aarhus	60/60	12,0	-0,961	0,197
Laja/Bellaterra	60/60	15,0	-0,480	0,35
Laja/El Pedroso	60/60	11,0	-1,121	0,155
Laja/Bilbao	60/60	4,0	-2,008	0,026*
Laja/Madeira	60/60	0,0	-2,882	0,001**
Laja/Aarhus	60/60	14,0	-0,641	0,294
Chillán/Bellaterra	60/60	18,0	0,000	0,531
Chillán/El Pedroso	60/60	0,0	-1,964	0,05
Chillán/Bilbao	60/60	2	-2,373	0,009**
Chillán/Madeira	60/60	0,0	-1,964	0,05
Chillán/Aarhus	60/60	17	-0,160	0,469
Curicó/Bellaterra	60/60	15,0	-0,480	0,35
Curicó/El Pedroso	60/60	10,0	-1,281	0,12
Curicó/Bilbao	60/60	2,0	-2,373	0,009**
Curicó/Madeira	60/60	2,0	-2,562	0,004**
Curicó/Aarhus	60/60	16,0	-0,320	0,409
Santiago/ Bellaterra	60/60	13,0	-0,801	0,242
Santiago/El Pedroso	60/60	11,0	-1,121	0,155
Santiago/Bilbao	60/60	7,0	-1,461	0,089
Santiago/ Madeira	60/60	8,0	-1,601	0,066
Santiago/Aarhus	60/60	15,0	-0,480	0,35

N: Tamaño poblacional analizado; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig. exacta: valor crítico unilateral.

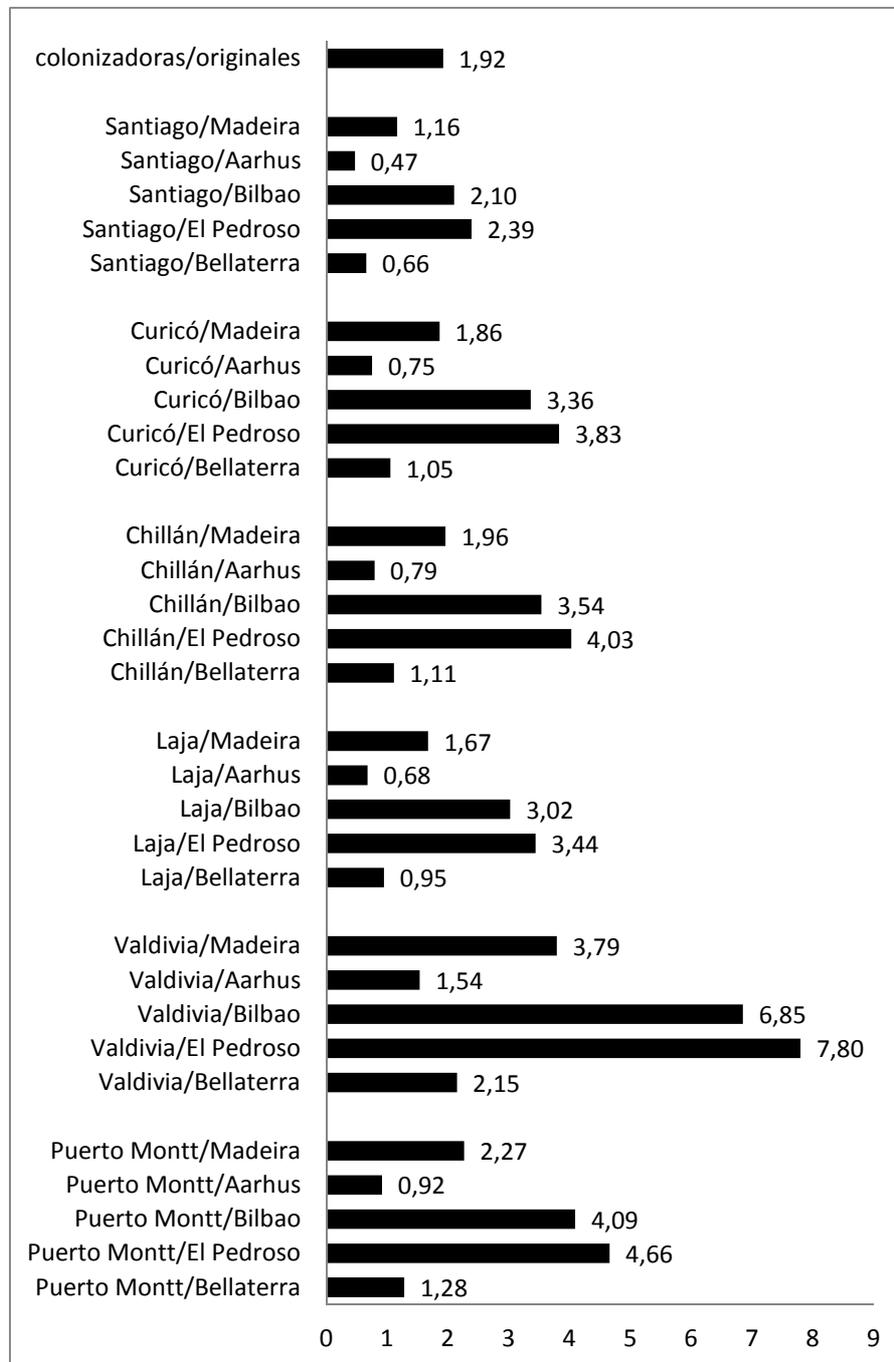
Una vez se analizados los niveles de expresión de *bilbo*, por poblaciones, se realizaron los cálculos de las tasas de expresión comparando las colonizadoras y originales separadas por sexos. Las comparaciones mostraron (figura 35) que en las hembras de las colonizadoras, *bilbo*, se expresan casi el doble con respecto a las originales (1,92), incremento que es mucho mayor cuando se analizan las poblaciones por separado, salvo algunas excepciones: en Bellaterra *bilbo* presenta una expresión similar a las poblaciones colonizadoras, excepto en la comparación con la población de Valdivia en la que se observa una tasa dos veces más alta con respecto a Bellaterra (2,17). Y en la población de Aarhus se encontró una mayor expresión de *bilbo* que en la mayoría de las poblaciones colonizadoras, a excepción de Puerto Montt y Valdivia con las cuales presenta un nivel de expresión similar (figura 35).

Las poblaciones colonizadoras mostraron una tendencia de mayor tasa de expresión, de *bilbo*, con respecto a El Pedroso, Bilbao y Madeira. Por otra parte, las hembras de Valdivia y Puerto Montt presentaron un mayor nivel de expresión, cuando se comparan con las poblaciones originales, que el resto de las poblaciones colonizadoras.

El análisis de Kruskal-Wallis, mostró que existen diferencias altamente significativas de las tasas de expresión entre las hembras de las poblaciones en comparación ( $\chi^2= 24,184$ ;  $P= 0,007$  \*\*). Este resultado permite considerar que existen diferencias en los niveles de expresión entre las hembras de las colonizadoras y originales. Con el fin de determinar qué poblaciones presentaban este nivel significativamente más alto en las colonizadoras, se realizaron dos comparaciones diferentes a través de las prueba de Mann-Whitney: 1) Comparación en dos bloques de datos independientes; hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales. El resultado de esta prueba, mostró diferencias altamente significativas (primera comparación tabla 31) entre los dos grupos de datos. 2) Comparación entre las hembras de las poblaciones en estudio (demás comparaciones tabla 31). Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguna de estas últimas comparaciones pero, cabe anotar, que las comparaciones con las originales de El Pedroso, Bilbao y Bellaterra estaban al límite de la

significación estadística, lo que sugiere que en las colonizadoras existe una tendencia de mayores tasas de expresión con respecto a estas poblaciones originales.

**Figura 35. Tasas de expresión entre las hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales.**



**Tabla 31. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre las hembras de poblaciones colonizadoras y originales.**

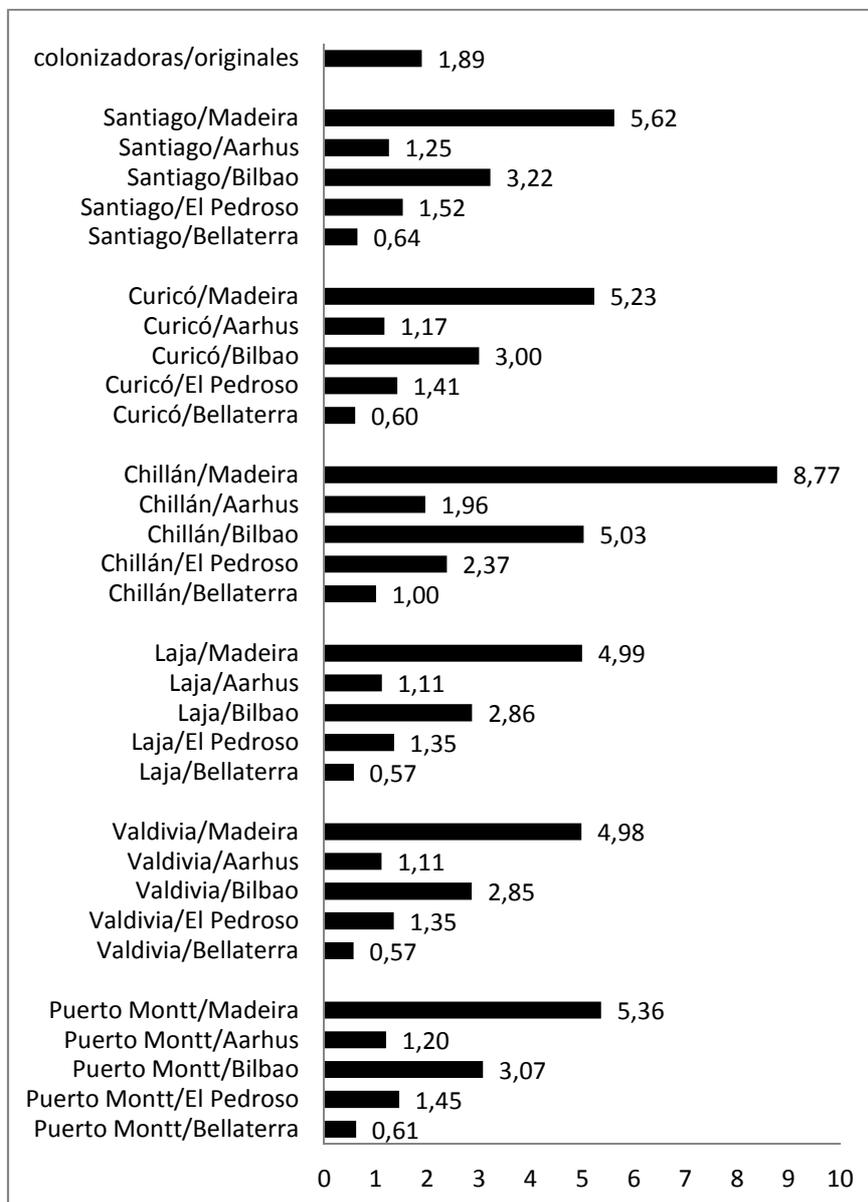
Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
<b>Colonizadoras/ Originales</b>	180/150	70	-2,35	0,009**
<b>Puerto Montt/Bellaterra</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Puerto Montt/el Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Puerto Montt/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Puerto Montt/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Puerto Montt/Aarhus</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Valdivia/Bellaterra</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>Valdivia/el Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Valdivia/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Valdivia/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Valdivia/Aarhus</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Laja/Bellaterra</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Laja/el Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Laja/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Laja/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Laja/Aarhus</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Bellaterra</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Chillán/el Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Aarhus</b>	30/30	1	-1,528	0,1
<b>Curicó/Bellaterra</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Curicó/el Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Curicó/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Curicó/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Curicó/Aarhus</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Santiago/ Bellaterra</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Santiago/el Pedroso</b>	30/30	1	-1,528	0,1
<b>Santiago/Bilbao</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Santiago/ Madeira</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Santiago/Aarhus</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05

N: Tamaño poblacional analizado; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

La tendencia general observada, cuando se analizan los machos (figura 36), es hacia un incremento de casi el doble de la tasa de expresión en las poblaciones colonizadoras respecto a las originales (1,89), los incrementos son más altos en las comparaciones por población, con excepción de Bellaterra. En los machos de esta

población se observó un nivel de expresión de *bilbo* más alto que en las poblaciones colonizadoras, a excepción de los machos de las población de Chillán, en donde el nivel de expresión es igual entre estas dos poblaciones.

**Figura 36. Tasas de expresión entre los machos de poblaciones colonizadoras y originales.**



Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, en las que se analizaron los machos de cada población como grupos independientes, mostró diferencias significativas, en los niveles de expresión entre las poblaciones ( $\chi^2= 19,72$ ;  $P= 0,032^*$ ). De la misma manera, se observaron diferencias significativas cuando se analizaron los machos de las originales vs colonizadores mediante la prueba de Mann-Whitney (tabla 32). Sin embargo, cuando se realizaron todas las comparaciones posibles,

no se encontraron diferencias significativas en ninguna de ellas. No obstante, se observó una tendencia de mayor expresión en los machos de las poblaciones chilenas que en los machos de Madeira. A su vez, en los machos de Chillán, se observó esta tendencia con respecto a las poblaciones del Pedroso y Aarhus (véanse los valores al límite de significación en la tabla 32).

**Tabla 32. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre los machos poblaciones colonizadoras vs originales.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
<b>colonizadoras/originales</b>	180/150	65,5	-2,299	0,010*
<b>Puerto Montt/Bellaterra</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Puerto Montt/El Pedroso</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Puerto Montt/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Puerto Montt/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Puerto Montt/Aarhus</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Valdivia/Bellaterra</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Valdivia/El Pedroso</b>	30/30	2,5	-0,886	0,25
<b>Valdivia/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Valdivia/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Valdivia/Aarhus</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35
<b>Laja/Bellaterra</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>Laja/El Pedroso</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Laja/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Laja/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Laja/Aarhus</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Chillán/Bellaterra</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Chillán/El Pedroso</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Chillán/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Chillán/Aarhus</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Curicó/Bellaterra</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Curicó/El Pedroso</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>Curicó/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Curicó/Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Curicó/Aarhus</b>	30/30	4,0	-0,218	0,5
<b>Santiago/ Bellaterra</b>	30/30	2,0	-1,091	0,2
<b>Santiago/El Pedroso</b>	30/30	1,0	-1,528	0,1
<b>Santiago/Bilbao</b>	30/30	0,0	-1,732	0,1
<b>Santiago/ Madeira</b>	30/30	0,0	-1,964	0,05
<b>Santiago/Aarhus</b>	30/30	3,0	-0,655	0,35

N: Tamaño poblacional analizado; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig. exacta: valor crítico unilateral.

Los resultados de esta parte del trabajo doctoral, mostraron que las diferencias de los niveles de expresión del *gypsy* son más altas que las encontradas en *bilbo*. Otro resultado a destacar es la diferencia de los niveles de expresión encontrados en estos elementos a nivel de sexos: *gypsy* se expresa más en hembras, mientras que *bilbo* en machos. También, se encontró que las poblaciones colonizadoras en su gran mayoría presentaron mayores niveles de expresión de ambos elementos, con respecto a las originales de El Pedroso, Bilbao y Madeira.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente mencionados se realizaron los análisis de la línea germinal ya que, como se aclaró en el apartado de materiales y métodos, en la primera parte de los análisis de las tasas de expresión tanto de *gypsy* como de *bilbo*, no se podía discriminar entre la línea somática y la germinal, porque el mRNA se extrajo de individuos completos.

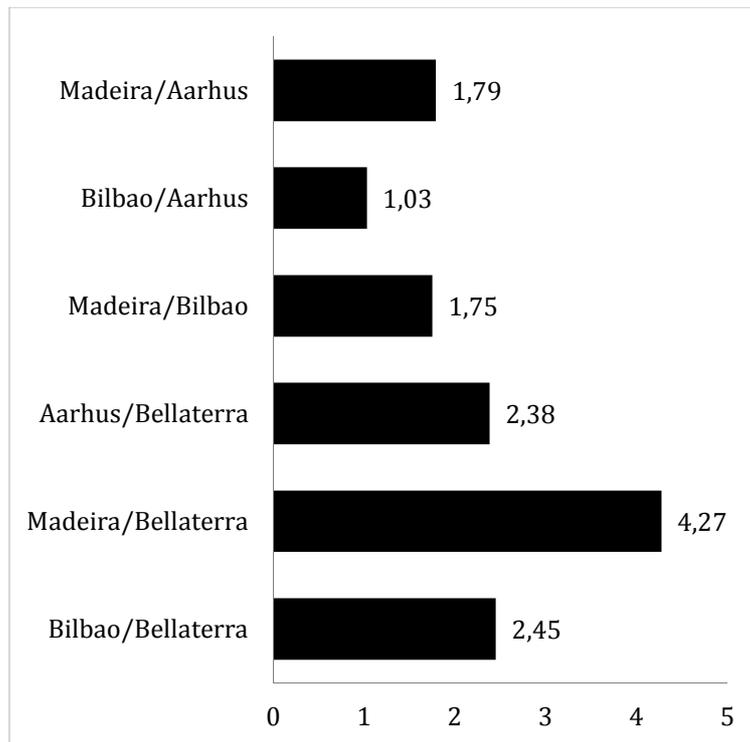
### **3.4. Análisis de las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo* en línea germinal de poblaciones originales y colonizadoras**

Para esta segunda parte del análisis de las tasas de expresión, el mRNA se extrajo de ovarios y testículos de individuos adultos de 4 poblaciones originales: Bellaterra, Bilbao, Madeira y Aarhus, y de seis poblaciones colonizadoras: Puerto Montt, Valdivia, Laja, Chillán, Curicó, y Santiago.

#### **3.4.1. Tasas de expresión de *gypsy* en línea germinal de poblaciones originales.**

Los cálculos de las tasas de expresión, partiendo del promedio de *Ct* del total de la población (línea germinal de machos y hembras juntos), mostraron que Madeira fue la población con los mayores niveles de expresión de *gypsy*, seguida de Bilbao y Aarhus. Por el contrario, en Bellaterra se observaron las tasas de expresión más bajas de todas las poblaciones originales (figura 37).

**Figura 37. Relación de tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de poblaciones originales.**

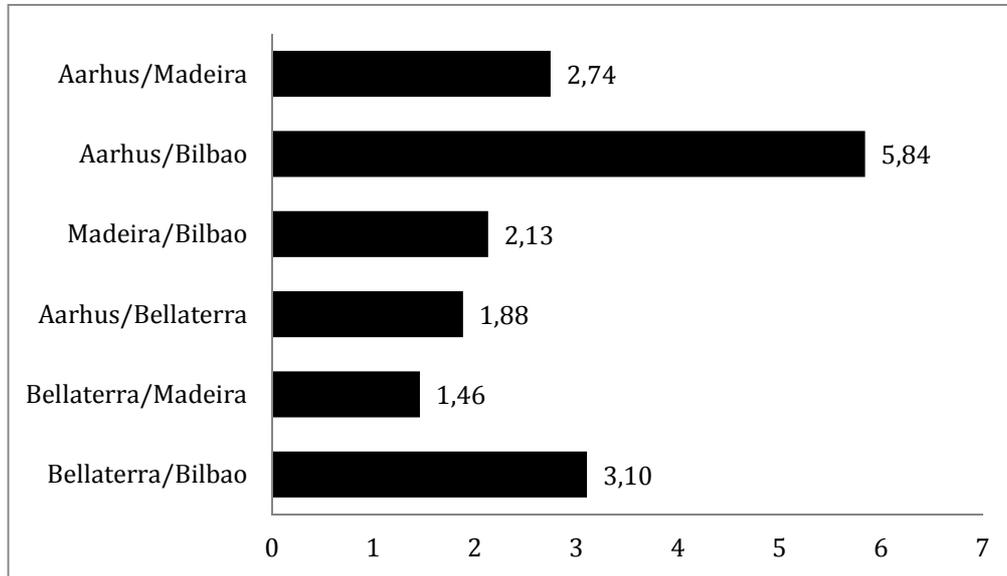


El análisis de Kruskal-Wallis, comparando los incrementos de *Ct* de cada una de las poblaciones, como 4 grupos de datos independientes, no mostró diferencias significativas entre la línea germinal de las poblaciones originales ( $\chi^2= 4,65$ ;  $P=0,19$ ). No obstante, cuando se realizó esta prueba teniendo en cuenta los datos de la línea germinal de hembras y machos por separado, con 8 grupos de datos independientes, se detectaron diferencias significativas entre ellos ( $\chi^2= 16,964$ ;  $P=0,018^*$ ). Este resultado puede indicar que existen diferencias en las tasas de expresión a nivel de sexos, motivo por el cual se realizaron comparaciones inter e intrapoblacionales de las tasas de expresión de la línea germinal tanto de hembras como de machos por separado.

En las hembras se observó (figura 38) que *gypsy* presenta tasas de expresión más altas en la población de Aarhus que en el resto de poblaciones originales. Bellaterra y Madeira no presentan, entre ellas, diferencias en las tasas de expresión (1,46), mientras que con el resto de poblaciones se observaron incrementos de más del doble. Por otra parte, en Bilbao se observaron tasas muy bajas como se

puede observar a través de las comparaciones con cada una de las poblaciones restantes.

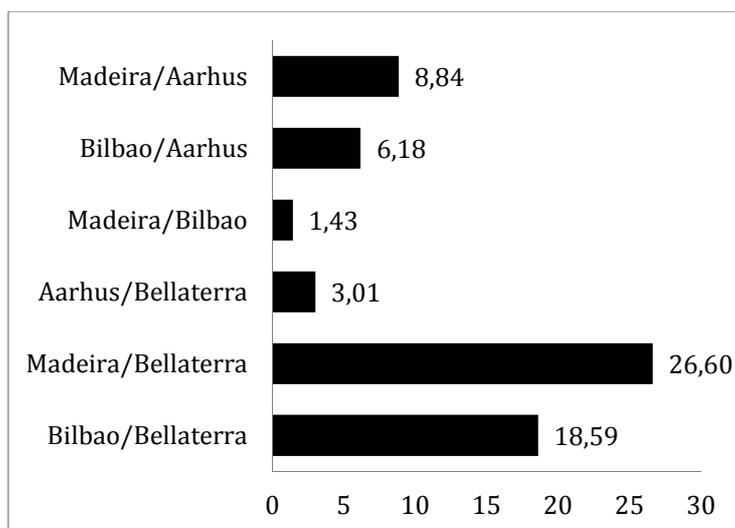
**Figura 38. Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de hembras de las poblaciones originales.**



La prueba de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias altamente significativas entre la línea germinal de las hembras originales ( $\chi^2= 10,385$ ;  $P < 0,01$ ). Por otra parte, se realizaron comparaciones, dos a dos, para determinar las poblaciones que pudieron influenciar el resultado de la prueba anterior. Los resultados de la prueba de Mann-Whitney mostraron que todas las comparaciones presentes en la figura 38 se encontraban en el límite de la significación estadística ( $U= 0$ ;  $Z= -1,964$ ;  $P= 0,05$ ), sin embargo, bajo la corrección de Bonferroni ( $P > 0,0083$ ) ninguna de las comparaciones presentarían esta tendencia de mayores tasas de expresión.

En los machos se observó que los patrones de expresión (figura 39) son muy parecidos a los encontrados a nivel del total de la población (figura 37). No obstante, los incrementos son considerablemente más altos. Madeira presentó los niveles más altos, seguida de las poblaciones de Bilbao y Aarhus. Los machos de Bellaterra presentan las tasas de expresión de *gypsy* más bajas de todas las poblaciones originales (figura 39).

**Figura 39. Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.**



La prueba de Kruskal- Wallis no mostró diferencias significativas entre la línea germinal de machos de las poblaciones originales ( $\chi^2= 4,12$ ;  $P= 0,277$ ). Las comparaciones dos a dos corroboraron los resultados encontrados en la prueba anterior, sin embargo, las comparaciones de Madeira y Aarhus con respecto a Bellaterra se encuentran al límite de la significación estadística, lo que indicaría que estas dos poblaciones presentan una tendencia a mayor expresión con respecto a Bellaterra (tabla 33). Cabe anotar aplicando la corrección de Bonferroni que dicha tendencia desaparecería ( $P > 0,0083$ ).

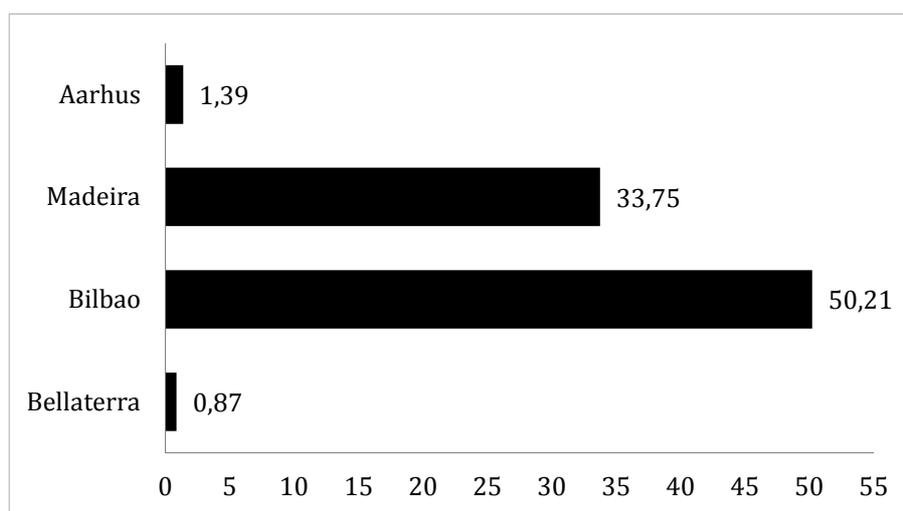
**Tabla 33. Comparaciones de las tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Bilbao/Bellaterra	30/30	3	-0,65	0,35
Madeira/Bellaterra	30/30	0	-1,964	0,05
Aarhus/Bellaterra	30/30	0	-1,964	0,05
Madeira/Bilbao	30/30	4	-0,218	0,5
Bilbao/Aarhus	30/30	3	-0,655	0,35
Madeira/Aarhus	30/30	3	-0,655	0,35

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

Una vez caracterizados los niveles de expresión, tanto de hembras como de machos, por separado, se realizaron las comparaciones entre sexos. Se observó que no existen diferencias entre las tasas de expresión de la línea germinal de *gypsy* de machos vs hembras de Bellaterra y Aarhus (figura 40, 0,87 y 1,39, respectivamente). Sin embargo, en Madeira y Bilbao el incremento de las tasas de expresión en los machos con respecto a las hembras es considerablemente alto, como se puede observar en la figura 40. No obstante, cuando se calculó la significación estadística de estas dos poblaciones, la prueba de Mann-Whitney tan solo logra detectar una tendencia ( $P=0.05$ ) de mayores tasas de expresión de los machos en estas dos poblaciones con respecto a las hembras, tendencia que desaparece al realizar la corrección de Bonferroni ( $P > 0,0125$ ).

**Figura 40. Comparación de las tasas de expresión entre la línea germinal de machos y de hembras de las poblaciones originales.**

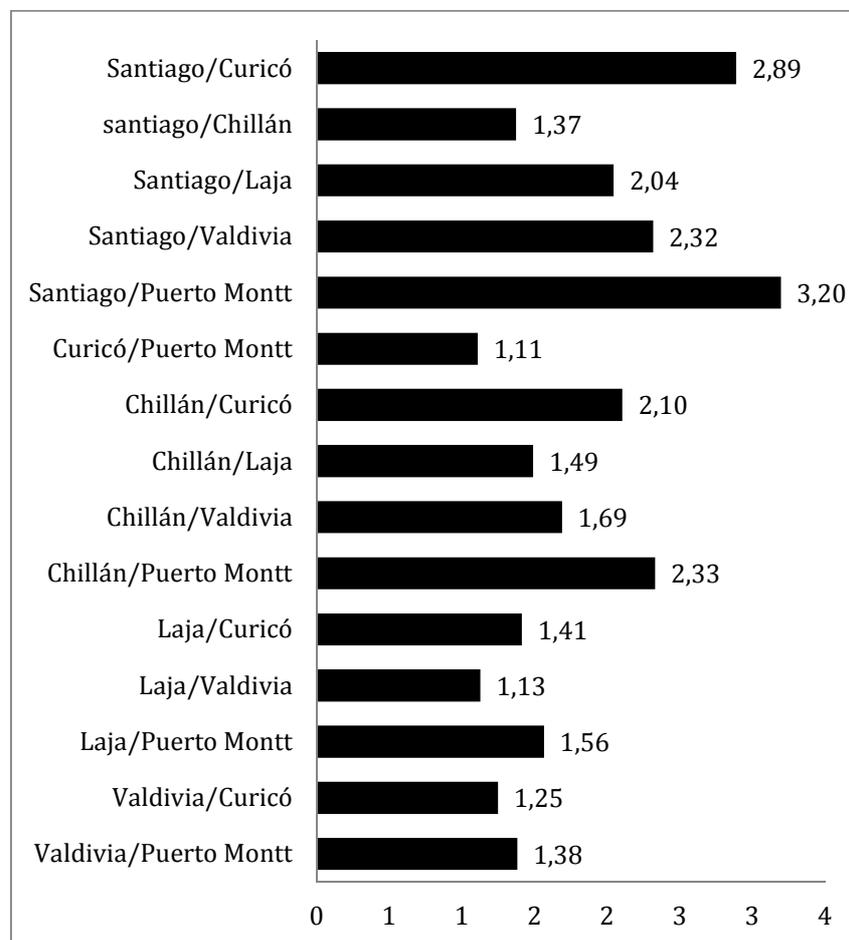


Aún así, como se mencionó en las comparaciones entre poblaciones, anotadas con anterioridad, el análisis de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias significativas en las tasas de expresión de *gypsy* entre la línea germinal de machos vs hembras de las poblaciones originales, cuando se compararon los 8 grupos de datos independientes ( $\chi^2= 16,96$ ;  $P= 0,018^*$ ).

### 3.4.2. Tasas de expresión de *gypsy* en línea germinal de poblaciones colonizadoras.

En la línea germinal de las poblaciones colonizadoras, *gypsy* presentó tasas de expresión muy similares entre ellas, salvo en la población de Santiago, en la que se observaron incrementos de más del doble con respecto a la mayoría de poblaciones colonizadoras, al igual que la población de Chillán frente a Puerto Montt y Curicó (figura 41).

**Figura 41. Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de poblaciones colonizadoras.**

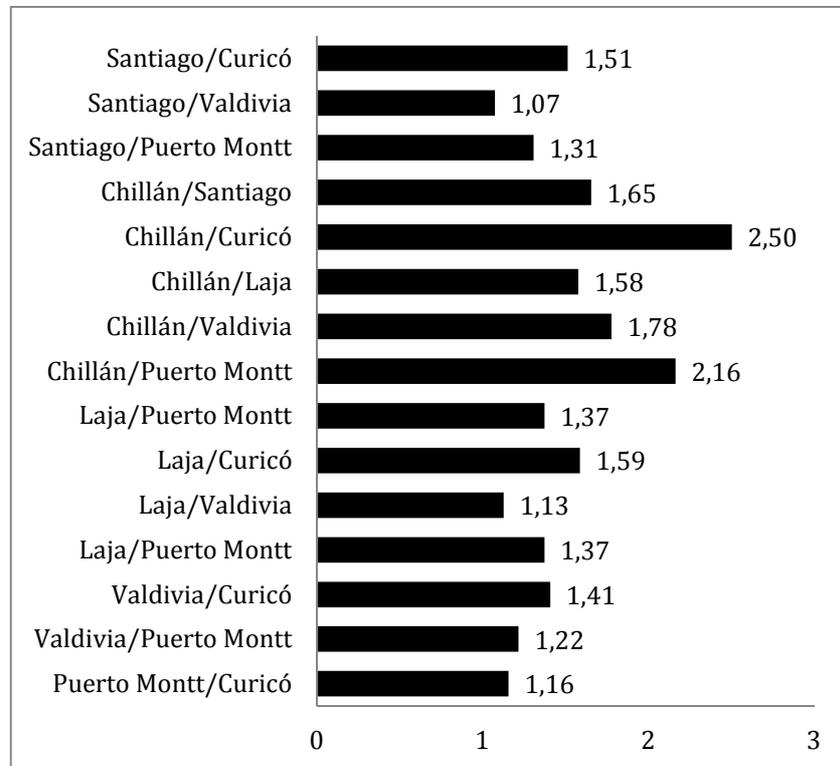


La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas de las poblaciones colonizadoras a nivel de la línea germinal cuando se compararon como 6 grupos de datos independientes ( $\chi^2= 3,71$ ;  $P= 0,591$ ).

Los análisis de las tasas de expresión separadas por sexos mostraron que la tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de las hembras no presentan mayores diferencias cuando se comparan entre ellas, los incrementos más altos de las tasas

de expresión (1,65 - 2,16) se observaron únicamente en la población de Chillán (figura 42).

**Figura 42. Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de las hembras de poblaciones colonizadoras chilenas.**



El análisis, prueba de Kruskal-Wallis, no mostró diferencias significativas entre las tasas de expresión de *gypsy* de la línea germinal de hembras de las colonizadoras ( $\chi^2= 6,22$ ;  $P= 0,285$ ). Teniendo en cuenta que en Chillán es donde se observaron los mayores incrementos en las tasas de expresión (figura 42), se realizaron comparaciones, dos a dos, a través de la prueba de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias en las tasas de expresión de *gypsy*, pero sí una tendencia de mayor tasa de expresión en Chillán con respecto a Curicó ( $P=0,05$ , tabla 34). No obstante, cuando se realizó la corrección de Bonferroni ( $P > 0,01$ ) no se conserva esta tendencia a nivel estadístico.

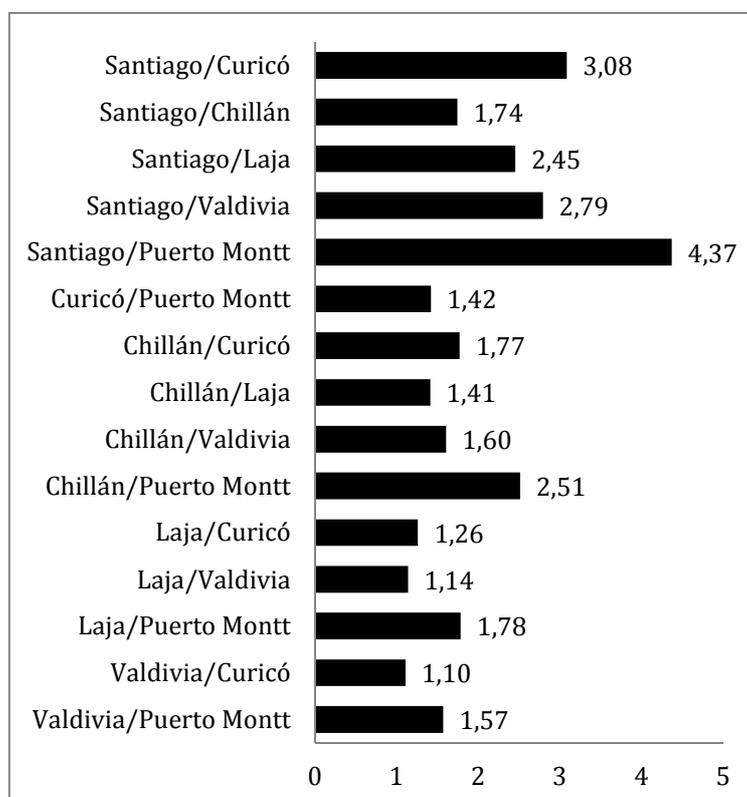
**Tabla 34. Comparaciones entre la línea germinal de hembras de Chillán con respecto al resto de las poblaciones colonizadoras.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Chillán/Puerto Montt	30/30	1	-1,528	0,1
Chillán/Valdivia	30/30	1	-1,528	0,1
Chillán/Laja	30/30	2	-1,091	0,2
Chillán/Curicó	30/30	0	-1,964	0,05
Chillán/Santiago	30/30	0	-1,732	0,1

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (Aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

En la línea germinal de los machos se observaron incrementos en las tasas de expresión en más de una población (figura 43): en Chillán fueron más altas que en Curicó y en Puerto Montt, mientras que Santiago presentó las tasas más altas frente al resto de poblaciones colonizadoras. Por otra parte, en Laja se observó un incremento en las tasa de expresión de casi el doble con respecto a Puerto Montt.

**Figura 43: Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de los machos de poblaciones colonizadoras.**



Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis, comparando 6 grupos de datos independientes. Esta prueba: no mostró diferencias significativas ( $\chi^2= 9,047$ ;  $P= 0,107$ ), a nivel de la tasa de expresión de *gypsy* entre la línea germinal de los machos de las colonizadoras. También, se realizaron análisis bajo la prueba de Mann Whitney, comparando la población de Santiago con cada una de las demás colonizadoras. Los resultados mostraron que existe una tendencia de mayores tasas de expresión de *gypsy* en Santiago con respecto a la población de Puerto Montt ( $P=0,05$ , tabla 35). No obstante, bajo la corrección de Bonferroni dicha tendencia no se mantiene a nivel estadístico ( $P > 0,01$ ).

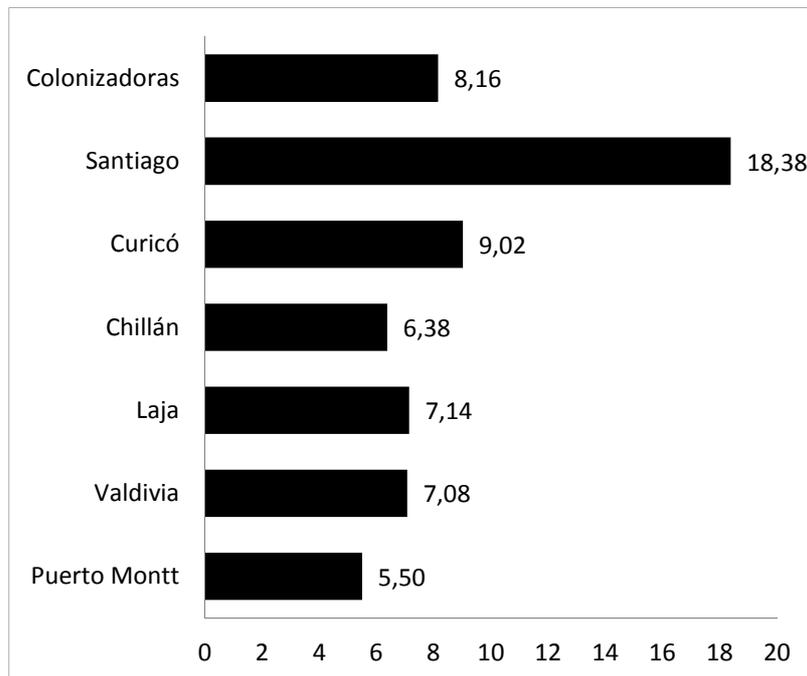
**Tabla 35. Comparaciones entre la línea germinal de los machos de Santiago frente al resto de las poblaciones colonizadoras.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Santiago/Puerto Montt	30/30	0	-1,964	0,05
Santiago/Valdivia	30/30	2	-1,091	0,2
Santiago/Laja	30/30	2	-1,091	0,2
Santiago/Chillán	30/30	4	-0,0218	0,5
Santiago/Curicó	30/30	1	-1,528	0,1

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta, valor crítico unilateral.

Los análisis entre machos vs hembras mostraron de manera contundente que los machos de todas las poblaciones colonizadoras presentan tasas de expresión más altas con respecto a las hembras de su misma población (figura 44). Esta tendencia también se observó en las poblaciones originales (figura 40).

**Figura 44. Comparación de las tasas de expresión de *gypsy* entre las líneas germinales de machos vs hembras de poblaciones colonizadoras.**



El análisis, de Kruskal-Wallis, demostró que existen diferencias entre la tasa de expresión de *gypsy* en la línea germinal de machos vs hembras de estas poblaciones ( $\chi^2= 29,46$ ;  $P= 0,002^{**}$ ). Estos resultados fueron corroborados al realizar comparaciones, dos a dos, a través de la prueba de Mann-Whitney (tabla 36). La comparación del total agrupado de los machos vs hembras muestran diferencias significativas ( $P<0,01$ ) mientras que en las comparaciones intrapoblacionales (entre machos y hembras de la misma población) se observó una tendencia de mayores tasas de expresión de los machos con respecto a las hembras ( $P=0,05$ ). No obstante, bajo la corrección de Bonferroni ( $P > 0,0071$ ) no se observan tales tendencias en las comparaciones por población, pero se mantiene el nivel de significación entre las tasas de expresión de *gypsy* entre la línea germinal del total de los machos vs de las hembras de las poblaciones chilenas ( $P < 0,0071$ , tabla 36).

**Tabla 36. Comparaciones de las tasas de expresión entre poblaciones colonizadoras.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Puerto Montt	30/30	0	-1,964	0,05
Valdivia	30/30	0	-1,964	0,05
Laja	30/30	0	-1,964	0,05
Chillán	30/30	0	-1,964	0,05
Curicó	30/30	0	-1,964	0,05
Santiago	20/20	0	-1,732	0,1
Colonizadoras	170/170	0	0	<0,01

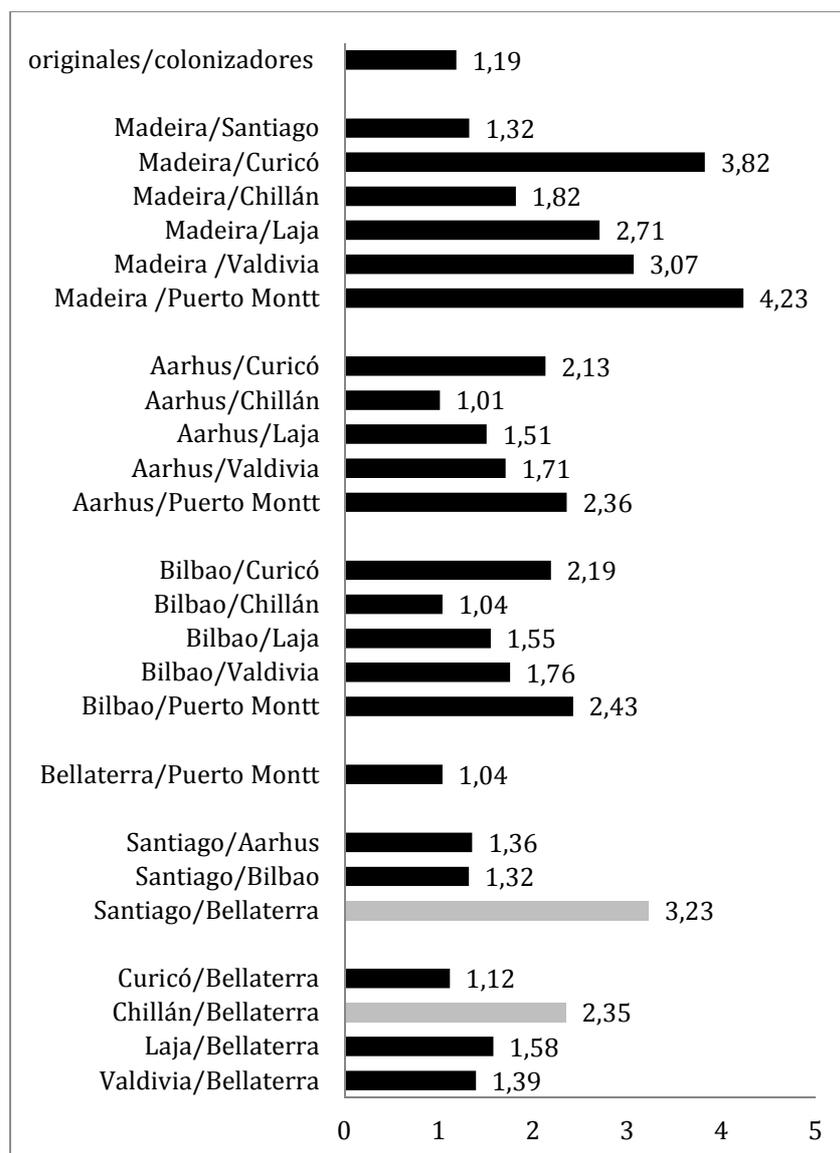
N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig. exacta: valor crítico unilateral.

### 3.4.3. Comparación de las tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de poblaciones colonizadoras y originales

Una vez caracterizados los niveles de expresión de *gypsy* en las poblaciones originales y colonizadoras por separado, se realizaron las comparaciones entre las líneas germinales de las poblaciones colonizadoras vs originales, con el fin de indagar sobre el efecto de los procesos de colonización en las tasas de expresión del elemento *gypsy* a este nivel celular.

En las comparaciones entre colonizadoras y originales (hembras y machos juntos), se observó en Santiago y Chillán mayores tasas de expresión de *gypsy* con respecto a Bellaterra, como se puede observar en las barras grises de la figura 45. Por otra parte, en la población original de Madeira se observaron tasas de expresión más altas frente a todas las colonizadoras, con excepción de Santiago con la cual no existen diferencias en las tasas de expresión. En Bilbao y Aarhus se presentaron incrementos de las tasas de expresión con respecto a tres, de las seis, poblaciones colonizadoras analizadas: Puerto Montt, Valdivia y Curicó (figura 45).

**Figura 45 Tasas de expresión de *gypsy* en la línea germinal de poblaciones colonizadoras vs originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplieran con este parámetro, motivo por el cual, no todas están en relación colonizadoras vs originales, no obstante, todas las posibles combinaciones están presentes.

El análisis, de Kruskal-Wallis, no mostró diferencias significativas entre las líneas germinales de las poblaciones originales y colonizadoras, cuando se compararon hembras y machos juntos en cada población (10 grupos de datos independientes,  $\chi^2= 5,26$ ;  $P= 0,81$ ). Sin embargo, cuando se realizó el análisis tomando las hembras por separado de los machos, se encontraron diferencias significativas entre estas poblaciones (20 grupos de datos independientes,  $\chi^2= 47,04$ ;  $P<0.01^{**}$ ). Este resultado sugirió la existencia de diferencias en las tasas de expresión a nivel de

sexos, por ese motivo se realizaron análisis entre hembras y machos, a diferentes niveles.

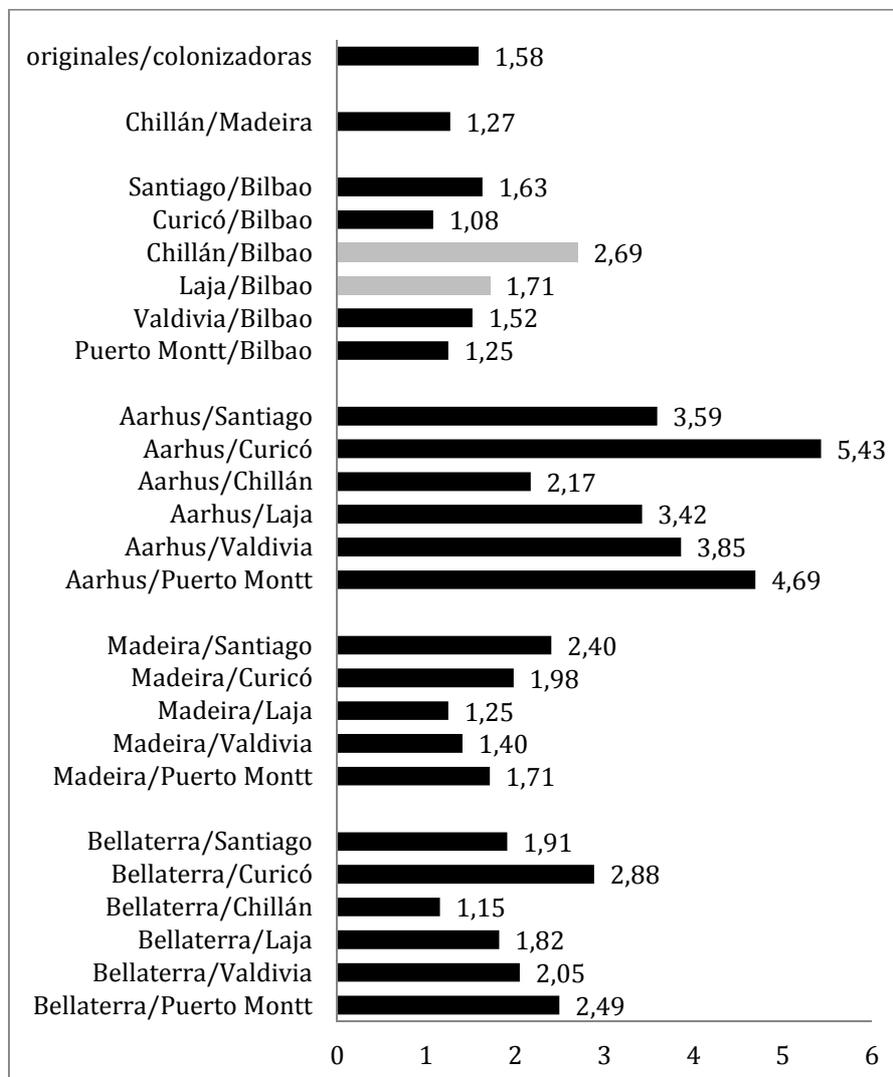
En los análisis de las tasas de expresión de la línea germinal de las hembras (figura 46), se observó que no existen diferencias entre poblaciones originales y colonizadoras (1,58). Sin embargo, en las comparaciones por pares de poblaciones se encontraron algunas excepciones: en Chillán y Laja *gypsy* presentó tasas más altas con respecto a la población original de Bilbao (barras grises figura 46). Por otra parte, en Aarhus y Bellaterra se observaron altas tasas de expresión con respecto al resto de las poblaciones colonizadoras, con excepción de la comparación Bellaterra/Chillán con la cual no se observan diferencias (1,15). Y finalmente, en Madeira, *gypsy*, presentó tasas de expresión más altas que las poblaciones de Puerto Montt, Curicó y Santiago (figura 46).

El análisis de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias significativas en la línea germinal de las hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales ( $\chi^2=19,74$ ;  $P=0,02^*$ ). Sin embargo, dado que los resultados de las tasas de expresión no muestran un incremento generalizado, de la tasa de *gypsy* en las colonizadoras con respecto a las originales, se realizó un análisis en el que se excluyó la población de Aarhus, ya que al ser la población original en la que se observó las tasas de expresión más altas, puede ser la responsable de la significación de la prueba estadística. El resultado, de este análisis, demostró que realmente no existen diferencias significativas entre estos dos grupos de poblaciones (colonizadoras vs originales), y que es Aarhus la población que presenta diferencias significativas con respecto a las demás poblaciones analizadas.

Las tasas de expresión entre la línea germinal de machos de las poblaciones originales y colonizadoras (figura 47) muestra que *gypsy* no presenta diferencias entre estos dos grupos en comparación (1,31). Sin embargo, cuando se realizaron los análisis por población se observaron algunos incrementos en las tasas: en los machos de todas las poblaciones chilenas *gypsy* presentó mayores tasas con respecto a la población de Bellaterra, al igual que Santiago y Chillán con respecto a Aarhus. Estos resultados se pueden apreciar en las barras grises de la figura 47.

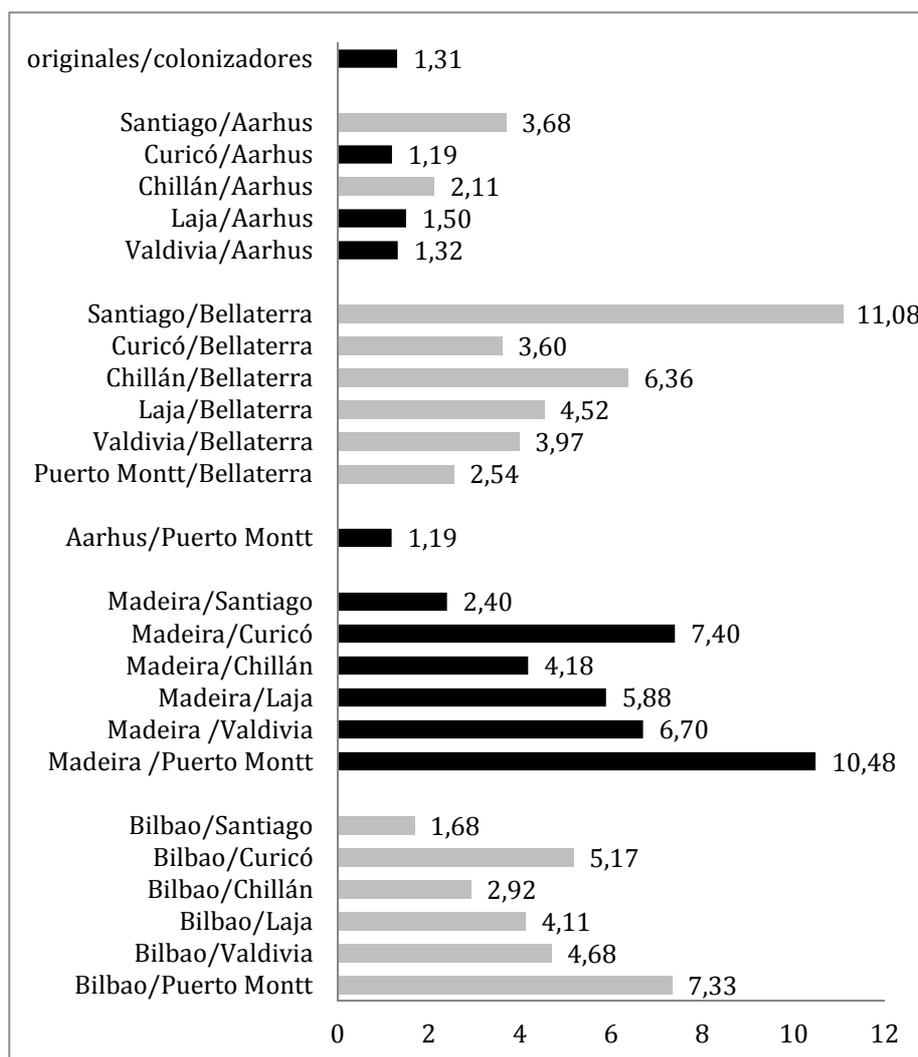
Por otra parte, en las poblaciones originales de Madeira y Bilbao se presentaron tasas más altas con respecto a todas las colonizadoras (figura 47).

**Figura 46. Comparación de las tasas de expresión de la línea germinal de hembras de las poblaciones colonizadoras y originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplían con este parámetro, motivo por el cual no todas están en dirección colonizadoras vs originales, sin embargo todas las posibles combinaciones están presentes.

**Figura 47. Comparación de las tasas de expresión de la línea germinal de machos de poblaciones colonizadoras y originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplían con este parámetro, motivo por el cual no todas están en dirección colonizadoras vs originales, sin embargo todas las posibles combinaciones están presentes.

El análisis de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre la tasa de expresión de la línea germinal de los machos de las poblaciones originales y colonizadoras ( $\chi^2 = 12,906$ ;  $P = 0,167$ ).

En términos generales no se observó una tendencia generalizada de mayores tasas de expresión del elemento *gypsy* en la línea germinal de las poblaciones colonizadoras con respecto a las originales. Por otra parte, existen diferencias en las tasas de este ET entre sexos: las mayores tasas se presentaron en los machos tanto de las poblaciones originales como en las colonizadoras. Estos dos grupos de

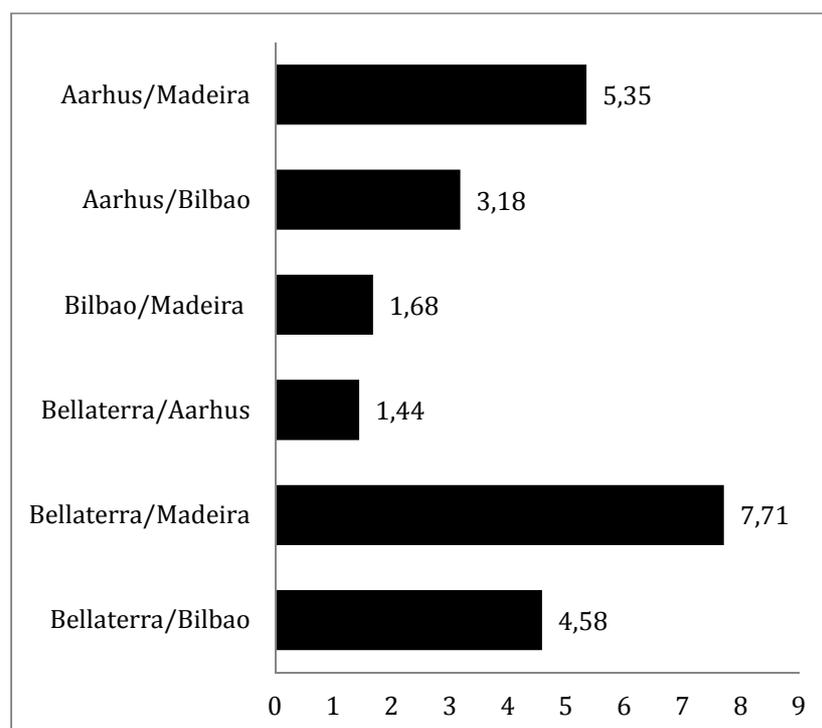
resultados difieren de lo encontrado en los análisis de las tasas de expresión de *gypsy* en individuos completos (línea somática y germinal juntas), en los cuales las tasa eran mayores en las poblaciones colonizadoras vs originales, al igual en las hembras con respecto a los machos.

### 3.5. Caracterización de los niveles de expresión de *bilbo* en la línea germinal de poblaciones originales y colonizadoras.

#### 3.5.1. Tasa de expresión de *bilbo* en la línea germinal de poblaciones originales.

Las comparaciones entre las poblaciones originales mostraron (figura 48), con respecto a Bilbao y Madeira, mayores tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de Bellaterra y Aarhus que, además, no presentaron, entre ellas, diferencias (1,44). Bilbao presentó una mayor tasa respecto a Madeira (1,68), siendo esta última la población en la que *bilbo* se expresó menos comparada con el resto de las poblaciones originales.

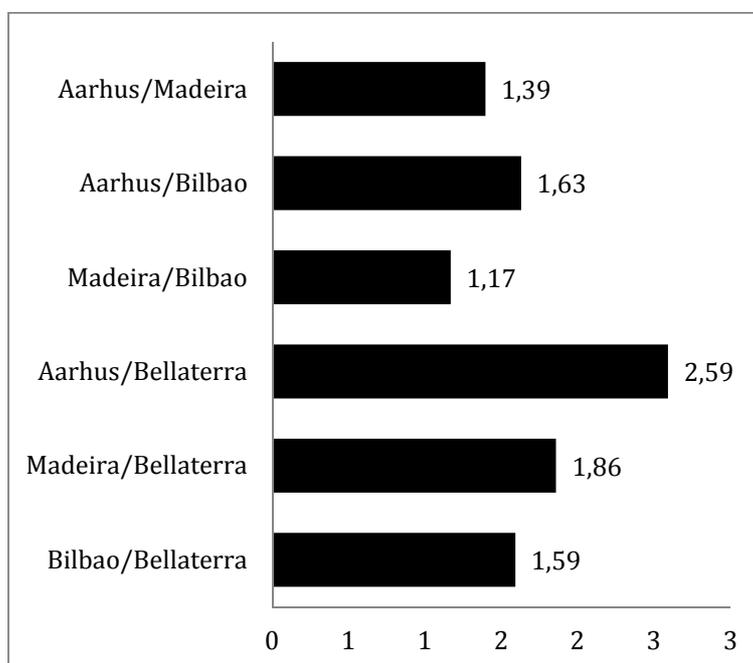
**Figura 48. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de las poblaciones originales.**



El análisis de Kruskal-Wallis, comparando los incrementos de *Ct* de cada una de las poblaciones, como 4 grupos de datos independientes, no mostró diferencias significativas entre la línea germinal de las poblaciones originales ( $\chi^2= 2,75$ ;  $P=0,43$ ). No obstante, cuando se realizó esta prueba teniendo en cuenta los datos de la línea germinal de hembras y machos por separado, como 8 grupos de datos independientes, se observaron diferencias significativas entre ellos ( $\chi^2= 19,53$ ;  $P=0,007^{**}$ ). Este resultado puede indicar que existen diferencias en las tasas de expresión de *bilbo* a nivel de sexos, motivo por el cual se realizaron comparaciones de las tasas tanto de machos como de hembras, por separado.

En las hembras (figura 49), se observó que *bilbo* en Aarhus presentó los niveles más altos de expresión entre las poblaciones originales analizadas, incremento que fue más evidente en la comparación con la población de Bellaterra (2,59), que es la población de expresión más baja. Por otra parte, entre Bilbao y Madeira no se observaron diferencias en la tasa de expresión de este ET (1,17).

**Figura 49. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de hembras de las poblaciones originales.**

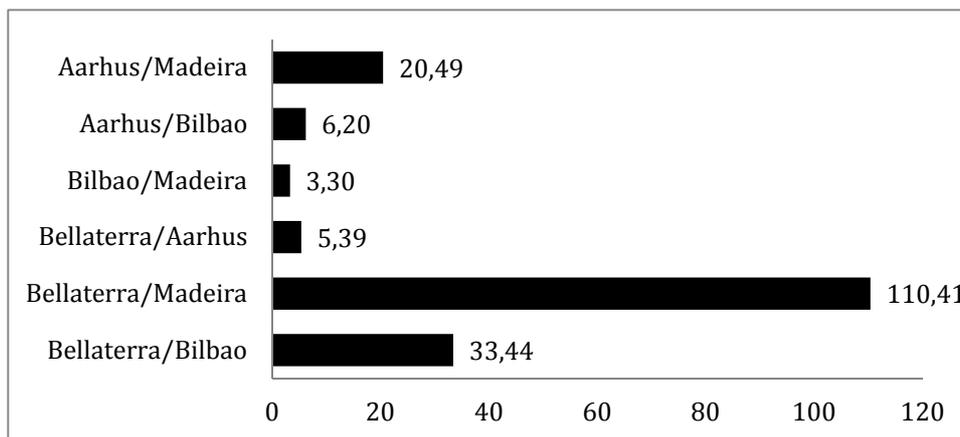


La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre la línea germinal de hembras de las poblaciones originales ( $\chi^2= 9,15$ ;  $P=0,003^{**}$ ). Teniendo en cuenta las bajas tasas que presentó *bilbo* en Bellaterra, se realizó una prueba

excluyendo esta población: los resultados no mostraron diferencias significativas ( $\chi^2= 5,06$ ;  $P=0,086$ ) entre el resto de poblaciones originales. Esto indica que la población de Bellaterra es la que difiere de las demás.

En los machos (figura 50), a diferencia de lo encontrado en las hembras, la población de Bellaterra es en la que *bilbo* presenta las tasas más altas, especialmente cuando se comparan con Madeira y Bilbao, que son las poblaciones en donde se observaron las menores tasas de este ET. En la población de Aarhus también se presentaron niveles de expresión importantes, pero mucho menores que las encontradas en Bellaterra.

**Figura 50. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de machos de las poblaciones originales.**

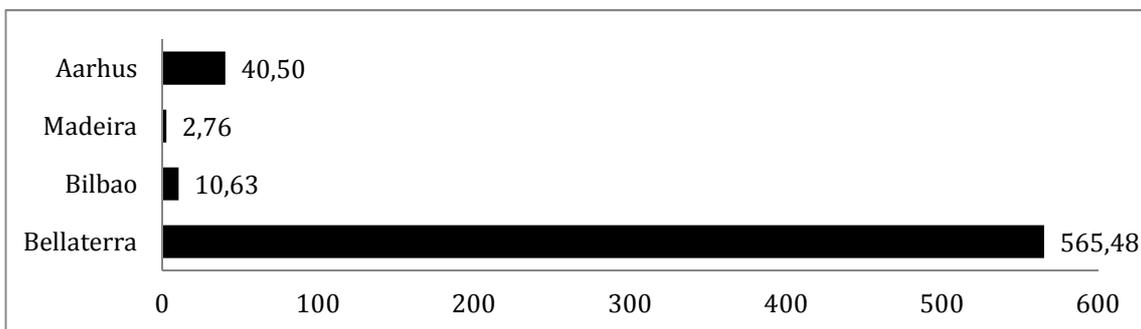


Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, comparando cuatro grupos de datos independientes (4 poblaciones), el resultado mostró que existen diferencias significativas ( $\chi^2= 8,74$ ;  $P= 0,006^{**}$ ) entre la línea germinal de los machos de las poblaciones originales. No obstante, al igual que en las hembras, cuando se realizó el análisis excluyendo los datos de las población de Bellaterra dichas diferencias no se observaron ( $\chi^2= 4,35$ ;  $P= 0,132$ ), en este caso las altas tasas de expresión de la línea germinal de los machos de Bellaterra son significativamente diferentes frente al resto de las poblaciones originales.

Para determinar de manera clara las diferencias que existen entre sexos, se realizaron comparaciones intrapoblacionales, entre la línea germinal de los machos vs la de las hembras, los resultados mostraron claras evidencias de tasas

de expresión más altas en la línea germinal de los machos (figura 51). Este patrón también se observó para el elemento *gypsy* (figuras 40 y 44) en estas poblaciones. Para *bilbo* la tasa más alta se presentó en la población de Bellaterra (565,48), y la menor en Madeira (2,76), pese a ello, el incremento de la tasa de expresión de *bilbo* en esta población no fue menos importante, ya que es aproximadamente tres veces más alto en los machos que en las hembras.

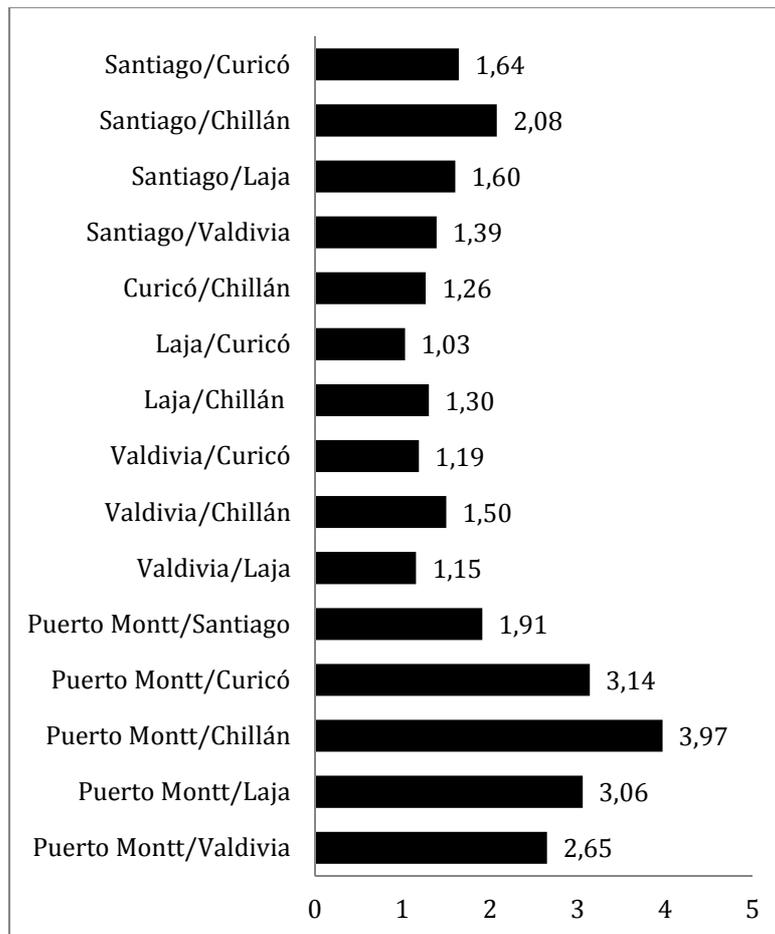
**Figura 51. Comparación de las tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de machos vs hembras de las poblaciones originales.**



### 3.5.2. Estudio de los niveles de expresión de *bilbo* en línea germinal de poblaciones colonizadoras chilenas.

En las poblaciones colonizadoras chilenas se observó que la tasa de expresión de *bilbo* en la línea germinal de Puerto Montt presenta un incremento con respecto al resto de las poblaciones colonizadoras en estudio (figura 52). Por otra parte, las tasas de las poblaciones de Valdivia, Laja, Chillán, Curicó y Santiago, son muy parecidas entre ellas, con excepción de la comparación Santiago vs Chillán cuyo incremento en la tasa de expresión fue de aproximadamente el doble (figura 52).

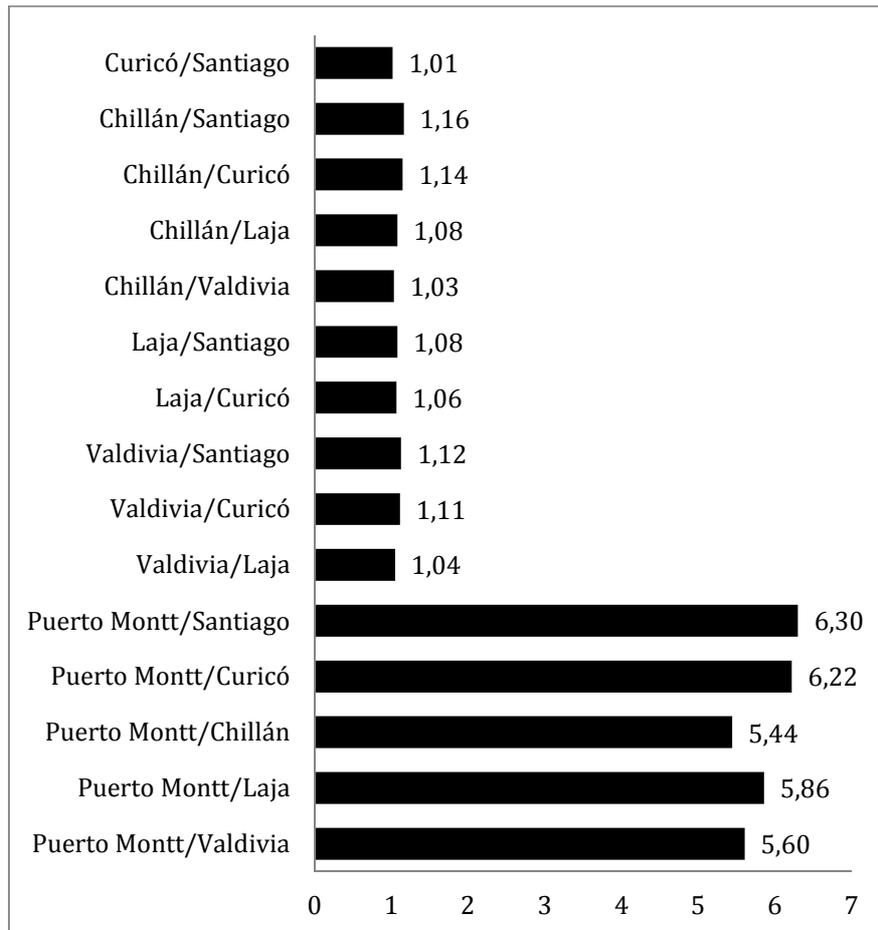
**Figura 52. Tasas de Expresión de *bilbo* en línea germinal de las poblaciones colonizadoras.**



La prueba de Kruskal-Wallis, en el cual se compararon las 6 poblaciones colonizadoras como 6 grupos de datos independientes, no mostró diferencias significativas ( $\chi^2= 1, 29$   $P= 0,94$ ), a nivel de la línea germinal. Dado que se observaron diferencias en los incrementos de  $Ct$  de hembras y machos, a simple vista, se realizó un análisis comparando 12 grupos de datos independientes, que corresponden a las hembras y los machos de cada una de las colonizadoras. Con esta prueba se observaron diferencias significativas ( $\chi^2= 26,689$ ;  $P=0, 005^{**}$ ), resultado que puede indicar la existencia de diferencias en las tasas de este ET a nivel de sexos. Con el fin de esclarecer este planteamiento, se realizaron comparaciones de las tasas de *bilbo* en la línea germinal de hembras y machos, por separado, así como comparaciones intrapoblacionales entre ellos.

Los patrones de las tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de las hembras son muy parecidos a los encontrados cuando se consideraron hembras y machos juntos. En las hembras de Puerto Montt (figura 53) se observaron altas tasas de expresión con respecto al resto de poblaciones chilenas. Entre las cinco poblaciones restantes no existen diferencias en las tasas de expresión.

**Figura 53. Tasas de expresión de *bilbo* en las hembras de las poblaciones colonizadoras.**



La prueba de Kruskal-Wallis, en donde se compararon 6 grupos de datos independientes, no mostraron diferencias significativas ( $\chi^2 = 1,50$ ;  $P = 0,91$ ) entre la línea germinal de las hembras, de las poblaciones colonizadoras.

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas en las tasas de expresión de Puerto Montt, con respecto a las demás poblaciones colonizadoras, se realizaron comparaciones, dos a dos, a través de la prueba de Mann-Whitney, bajo este análisis tampoco se logró detectar diferencias significativas, como se puede observar en la tabla 37 (corrección de Bonferroni:  $P > 0,01$ ).

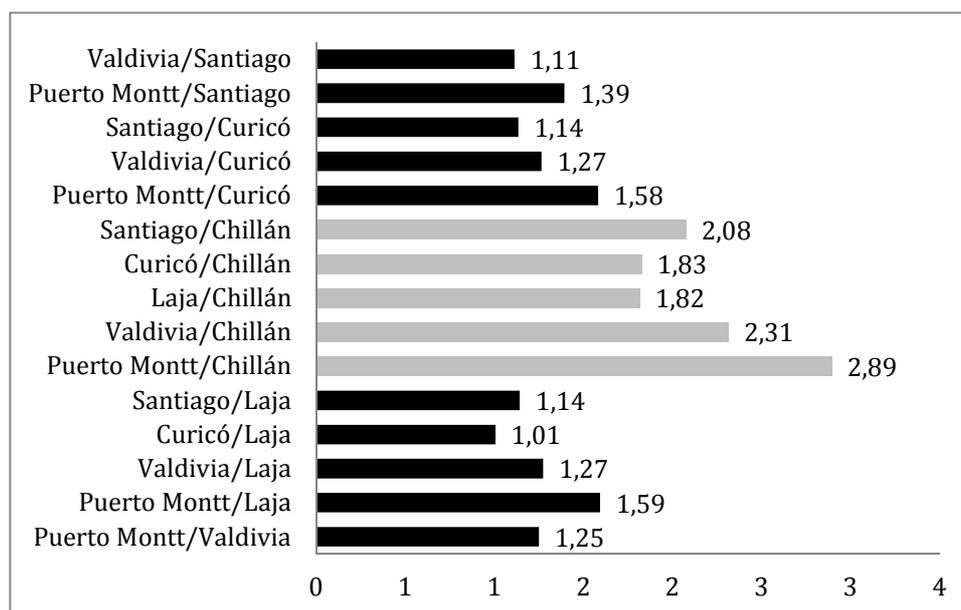
**Tabla 37. Comparaciones entre la línea germinal de hembras de las poblaciones colonizadoras.**

Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
		U	Z	P
Puerto Montt/Valdivia	30/30	3	-0,655	0,35
Puerto Montt/Laja	30/30	3	-0,655	0,35
Puerto Montt/Chillán	30/30	3	-0,655	0,35
Puerto Montt/Curicó	30/30	3	-0,655	0,35
Puerto Montt/Santiago	30/30	2	-0,577	0,4

N: Tamaño poblacional; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); sig. exacta: valor crítico unilateral.

En la línea germinal de los machos las tasas de expresión de *bilbo* son muy parecidas entre todas las poblaciones originales, como se observó en la línea germinal de las hembras, sin embargo, los únicos incrementos que se observaron están relacionados con la población de Chillán. En esta población se presentaron las tasas de expresión más bajas, como se observa en las barras grises de la figura 54.

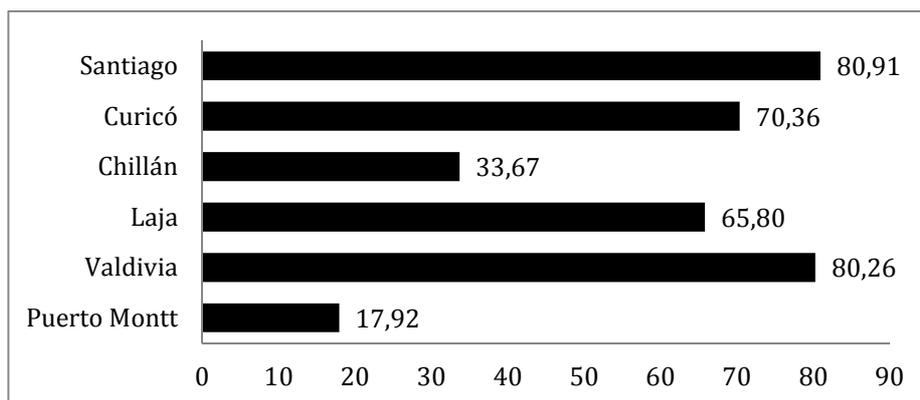
**Figura 54. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de machos de las poblaciones colonizadoras.**



Con la prueba de Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas ( $\chi^2=4,85$ ;  $P=0,43$ ) entre la línea germinal de los machos de las poblaciones colonizadoras.

Con el fin de indagar sobre el comportamiento de *bilbo* en las líneas germinales de machos vs hembras, se realizaron comparaciones, intrapoblacionales, entre sexos. Los análisis mostraron, nuevamente, que las tasas son más altas en la línea germinal de los machos con respecto a la línea germinal de hembras (figura 55), tendencia que también se observó para el elemento *gypsy* en estas mismas poblaciones.

**Figura 55. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal de los machos vs hembras de las poblaciones colonizadoras chilenas.**



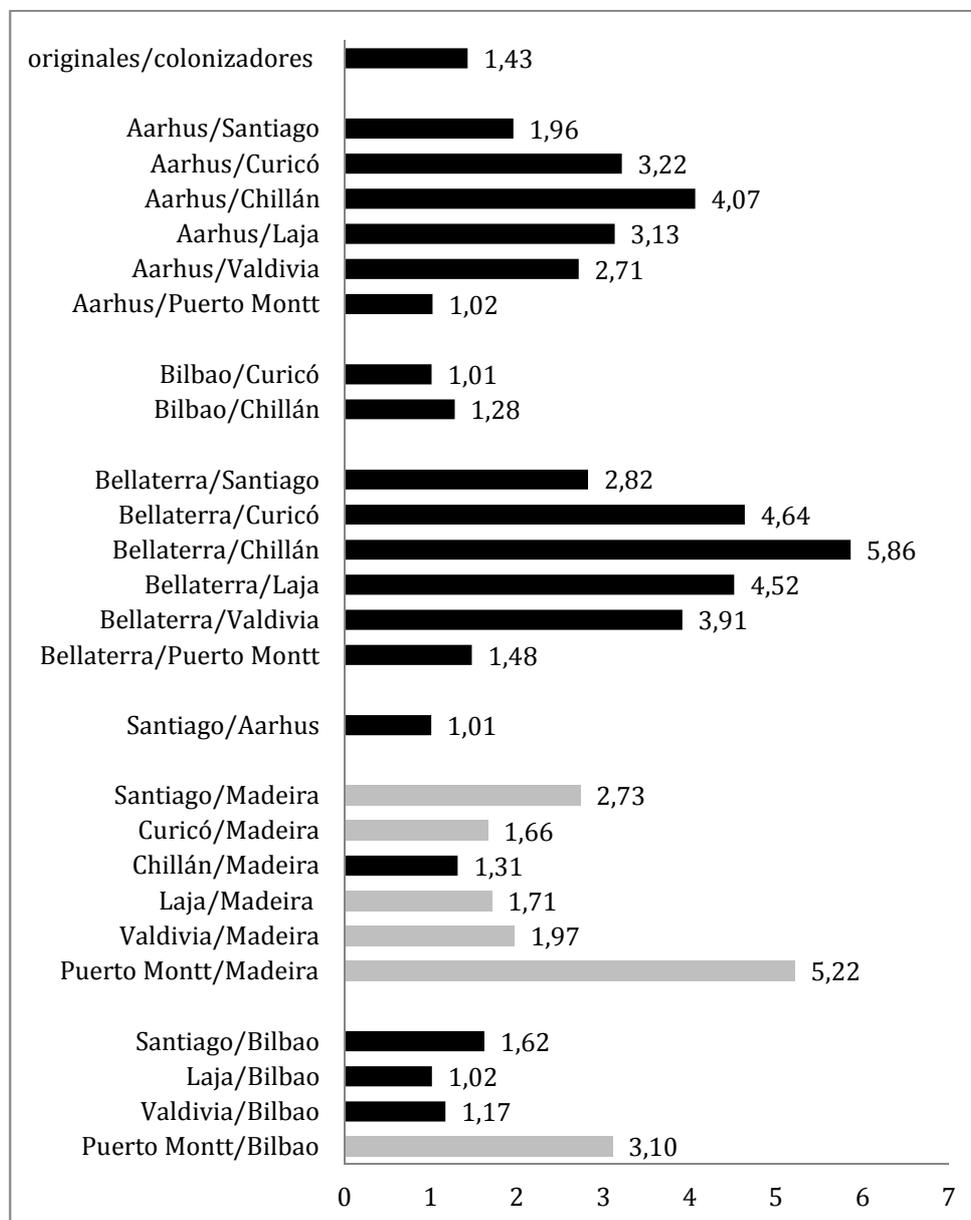
### 3.5.3. Comparación de las tasas de expresión de *bilbo* en línea germinal de poblaciones colonizadoras y originales.

En los apartados anteriores se han consignado, por separado, los análisis de expresión de *bilbo* en la línea germinal, de las poblaciones originales y colonizadoras. Con el fin de indagar sobre la posible influencia de los procesos de colonización, sobre los niveles de expresión de *bilbo*, a este nivel celular, se realizaron comparaciones de sus tasas de expresión entre estos dos tipos de poblaciones.

A nivel de la línea germinal no se observó un patrón generalizado de mayores tasas de expresión, en las poblaciones colonizadoras vs originales, como si se observó en los análisis de individuos completos. A nivel germinal, *bilbo*, presentó incrementos en las comparaciones de todas las colonizadoras con respecto a la población original de Madeira, con excepción de Chillán (1,31). Así como también, Puerto Montt con respecto a Bilbao (3,10), estos incrementos se puede observar en las barras grises de la figura 56. Las demás comparaciones mostraron que las

poblaciones originales de Bellaterra y Aarhus presentaron altas tasas de expresión de *bilbo* frente a la mayoría de las poblaciones colonizadoras (figura 56).

**Figura 56. Tasas de expresión de *bilbo* en la línea germinal entre poblaciones colonizadoras y originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplían con este parámetro, motivo por el cual no todas están en dirección colonizadoras vs originales, sin embargo todas las posibles combinaciones están presentes.

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ( $\chi^2= 5,84$ ;  $P=0,756$ ), entre las tasas de expresión de *bilbo* de las poblaciones colonizadoras vs originales.

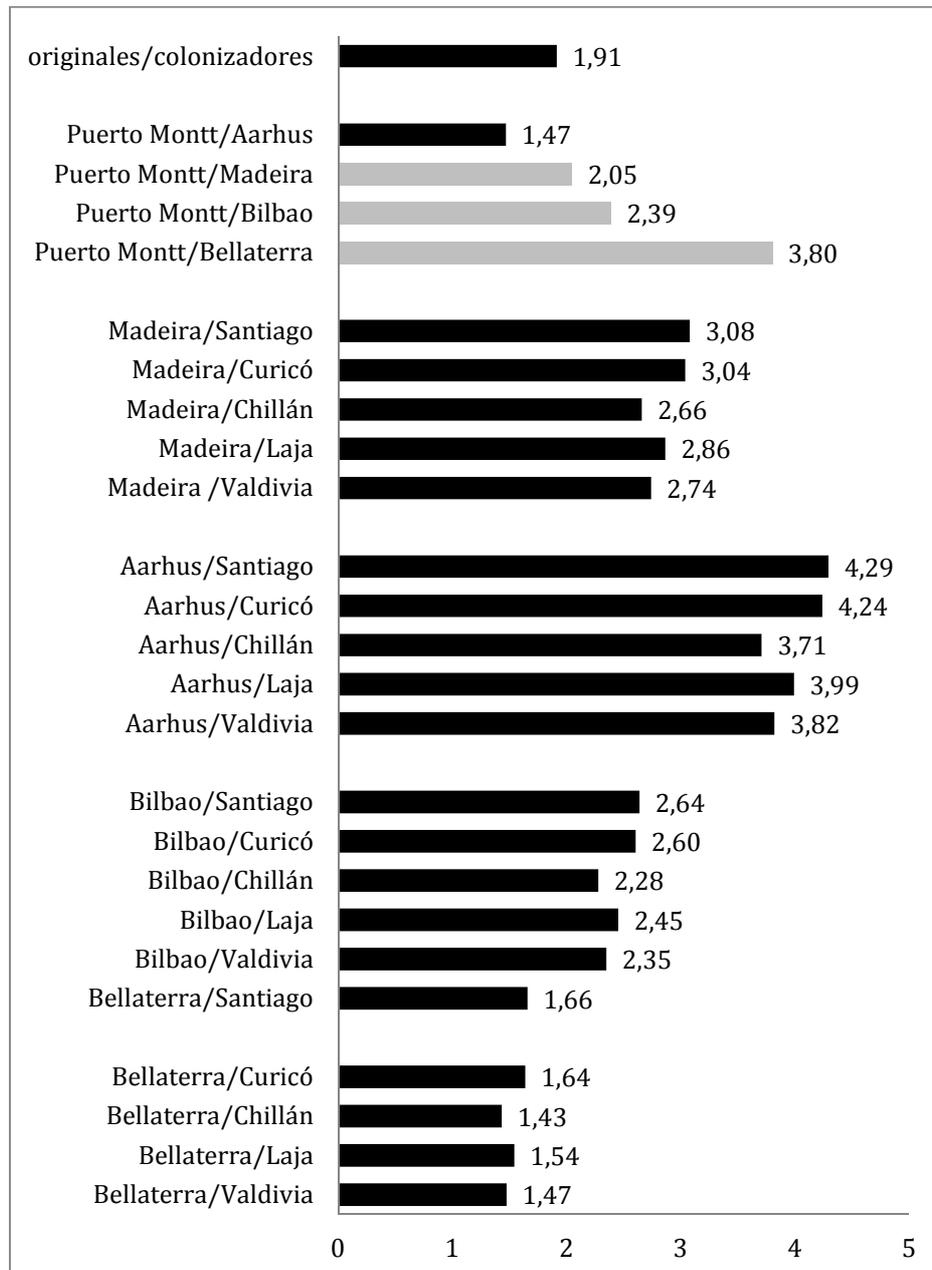
Para determinar el comportamiento de los niveles de expresión por sexos, se realizaron los cálculos de las tasas de expresión tanto de la línea germinal de hembras como de machos por separado.

En la línea germinal de las hembras se observó que *bilbo* presenta tasas de expresión más altas en Puerto Montt, con respecto a todas las poblaciones originales, salvo en la comparación con Aarhus donde no se observaron diferencias en la tasa (1,47), resultados que se puede observar en las barras grises de la figura 57. Las poblaciones colonizadoras tampoco muestran tasas diferentes con respecto a Bellaterra, no obstante, con respecto al resto de poblaciones originales *bilbo* sí presentó diferencias que están relacionadas con tasas de expresión muy bajas, como se puede observar en las comparaciones entre Bilbao, Aarhus y Madeira vs las colonizadoras (figura 57).

El análisis de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias significativas ( $\chi^2=17,823$ ;  $P=0,037^*$ ) entre la línea germinal de las hembras de las poblaciones colonizadoras vs originales. Al igual que la comparación de estos dos grupos de poblaciones, que mostraron mayores tasas de expresión de las originales con respecto a las colonizadoras ( $U=24$ ;  $Z=-3,45$ ;  $P=0^{**}$ ).

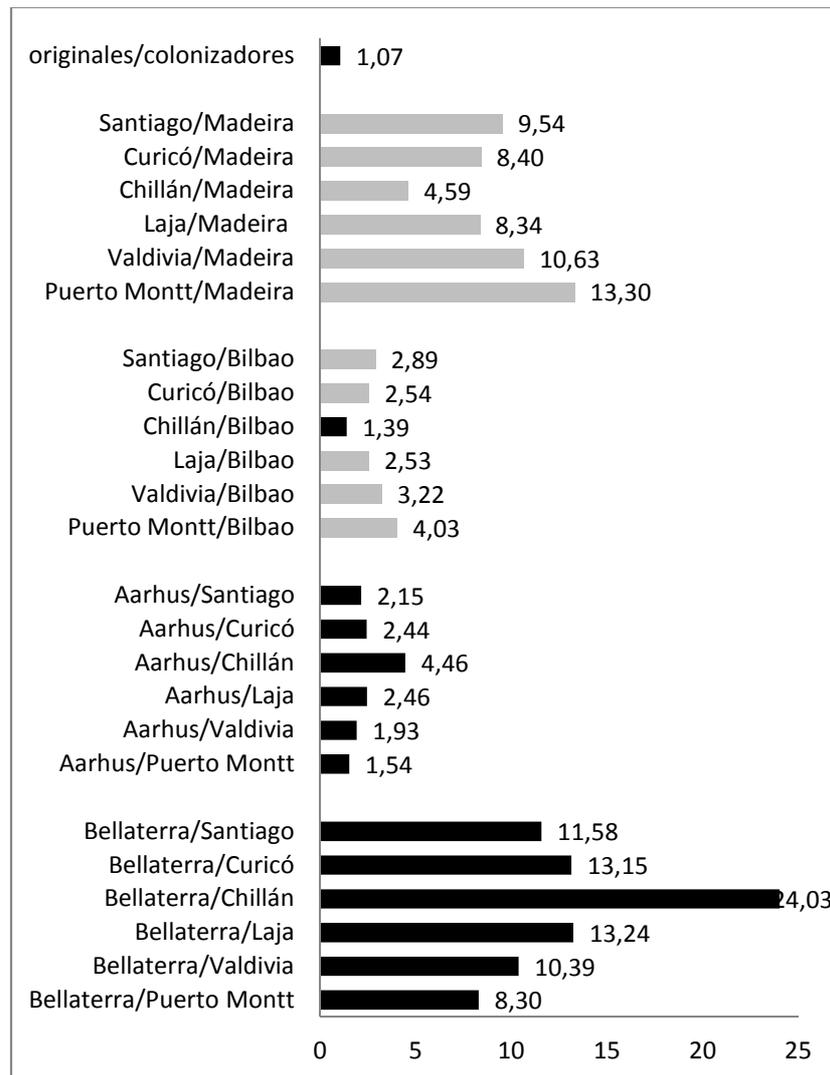
En la línea germinal de los machos de las poblaciones colonizadoras se observaron incrementos de las tasas de expresión de *bilbo* con respecto a Bilbao y Madeira, con excepción de las comparación entre Chillán vs Bilbao (1,39), y Aarhus vs Puerto Montt (1,54), como se puede observar en las barras grises de la figura 58. En la población original de Aarhus se observaron incrementos en las tasas de expresión, de más del doble, con respecto a las colonizadoras, exceptuando la comparación Aarhus/Chillán que no muestra diferencias en la línea germinal de estas dos poblaciones (1,39). Vale la pena destacar que en Bellaterra, *bilbo*, presentó tasas muy altas (más de ocho veces) con respecto a las colonizadoras (figura 58).

**Figura 57. Tasas de expresión de la línea germinal de hembras entre poblaciones colonizadoras y originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplían con este parámetro, motivo por el cual no todas están en dirección colonizadoras vs originales, sin embargo todas las posibles combinaciones están presentes.

**Figura 58. Tasas de expresión de la línea germinal de los machos de las poblaciones colonizadoras y originales.**



Con el fin de mostrar tasas de expresión mayores de 1 se consignaron las comparaciones que cumplían con este parámetro, motivo por el cual no todas están en dirección colonizadoras vs originales, sin embargo todas las posibles combinaciones están presentes.

Los análisis, que se realizaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis, mostraron diferencias significativas ( $\chi^2= 18,24$ ;  $P=0,032$ ) entre la línea germinal de los machos de las poblaciones colonizadoras vs originales.

En términos generales en la línea germinal *bilbo*, al igual que *gypsy*, tampoco presentó un patrón generalizado de tasas de expresión más altas en las poblaciones colonizadoras frente a las originales. Estos resultados difieren de lo encontrado en los análisis de individuos completos (línea somática y germinal juntas), donde se observaron tasas de expresión más altas en las colonizadoras que en las originales.

Por otra parte, *bilbo* presentó tasas de expresión más altas en la línea germinal de los machos, que en la línea germinal de las hembras, tanto en las poblaciones originales como colonizadoras, lo que concuerda con el patrón de tasas observado en los análisis de individuos completos (línea somática y germinal juntas).

Teniendo en cuenta las diferencias más notables de tasas de expresión entre poblaciones de *D. subobscura*, en los análisis de individuos completos, se escogió el elemento *gypsy* para el estudio de las tasas de transposición (Tt) y del papel de la colonización en la reorganización de los genomas. Datos que impulsaron los análisis de expresión en la línea germinal.

### **3.6. Estudio de las tasas de transposición del elemento *gypsy* en poblaciones originales y colonizadoras de *Drosophila subobscura*.**

El análisis de la actividad transposicional de *gypsy* se realizó mediante la técnica de transposon display, determinándose el número de inserciones de este elemento en el genoma de 2 poblaciones originales (europeas) y 6 poblaciones colonizadoras (chilenas) de *Drosophila subobscura* (ver Tt, en tabla 2).

#### **3.6.1. Tasas de transposición del elemento *gypsy* en las poblaciones originales**

En principio se realizaron los análisis de las tasas de transposición (Tt) de *gypsy* por familias (3 cruces individuales) para cada una de las poblaciones. Las tasas de transposición fueron calculadas para cada sexo por separado y también teniendo en cuenta ambos sexos por familia. Bajo estos mismos parámetros de comparación se realizaron los análisis de las poblaciones colonizadoras.

En Bellaterra se observó un nuevo evento de transposición que se evidencia por la presencia de una banda nueva (ausente en los individuos parentales) de 370 pb en una hembra de la familia 2, cuya Tt fue de  $5,6 \times 10^{-3}$ . Las demás inserciones, que estaban presentes en los progenitores, presentaron tamaños comprendidos entre 183 y 1075 pb (tabla 38 y 40; Anexos 1 - 3).

En Aarhus se encontraron mayor número de inserciones nuevas que en Bellaterra. Estas inserciones se observaron tanto en hembras, como en machos. En la familia 1, se observó una nueva inserción de 202 pb en una hembra, la Tt en hembras fue de  $5 \times 10^{-3}$ . Mientras que en la familia 2 se observaron 4 nuevas inserciones: 1 de 1056 pb en una hembra y 3 en machos (2 de 1018 y una de 1096 pb) resultando en una Tt en machos de  $1,7 \times 10^{-2}$ . Las demás inserciones encontradas ya estaban presentes en los individuos parentales y tenían tamaños entre 202 y 1096 pb (tablas 38 y 40; anexos: 4-6).

**Tabla 38. Bandas de *gypsy* detectadas por transposon display en las poblaciones originales.**

Familias	A	<i>pb</i>	N1 (H)	T ( <i>pb</i> ) N1(H)	N1 (M)	T ( <i>pb</i> ) N1 (M)
<b>Bellaterra</b>						
Familia 1	24	213 - 1,062	0		0	
Familia 2	19	197 - 1075	1	370	0	
Familia 3	17	183 - 1009	0		0	
<b>Aarhus</b>						
Familia 1	21	202 - 1,013	1	202	0	
Familia 2	20	204 - 1,096	1	1,056	3	2 (1018); 1 (1096)
Familia 3	22	202 - 1,013	0	0	0	

A: bandas originales; *pb*: intervalos de tamaño de las bandas; N1: nueva inserción; T(*pb*): tamaño de las bandas nuevas; H: hembras; M: machos.

Las poblaciones originales, mostraron grandes diferencias en cuanto al número de nuevas inserciones presentes en cada una de ellas: en Bellaterra, tan solo se encontró una nueva inserción en una hembra, mientras que en la población de Aarhus se encontraron cinco inserciones, en tres individuos (una hembra y dos machos).

Para visualizar de una manera más general los resultados encontrados, se realizaron los cálculos de las Tt a nivel poblacional, los resultados se observan en la tabla 39.

**Tabla 39. Tasas de transposición de las poblaciones originales.**

Familias	N	A	N1 (H)	N1 (M)	Tt
<b>Bellaterra</b>					
H + M	30	60	0	1	$1,4 \times 10^{-3}$
H	15	60	0	1	$1,1 \times 10^{-3}$
M	15	60	0	0	0
<b>Aarhus</b>					
H + M	30	63	0	5	$1,4 \times 10^{-3}$
H	15	63	0	2	$1,1 \times 10^{-3}$
M	15	63	0	3	$1,7 \times 10^{-3}$

N: número de individuos A: bandas originales; N1: nº de inserciones nuevas; Tt: tasa de transposición; H: hembras; M: machos.

Las comparaciones interpoblacionales, a través de la prueba de Kruskal-Wallis no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) de las tasas de transposición entre las poblaciones originales. Estos resultados, se corroboraron al realizar todas las combinaciones posibles de la Tt (intra e interpoblacional), por pares de datos independientes, con la prueba de Mann-Whitney, en ninguna de las comparaciones se observaron diferencias significativas (tabla 41).

### 3.6.2. Tasas de transposición del elemento *gypsy* en poblaciones colonizadoras

En 5 de las poblaciones chilenas se encontraron nuevas inserciones de *gypsy*. Las cuales se encontraron únicamente en los machos, salvo en Santiago en la que se encontró una inserción en una hembra. El detalle de las bandas encontradas junto con los cálculos de las tasas de transposición se encuentran en las tablas 42 y 43. Las matrices de datos de inserción de *gypsy* en estas poblaciones se incluyeron en los anexos como sigue: Puerto Montt (anexos 7-9), Valdivia (anexos 10-12), Laja (anexos 13-15), Chillán (anexos 16-18), Curicó (anexos 19-21).

Cabe destacar la población de Curicó en donde se observó el mayor número de eventos de transposición (7 en total) y todos en los machos. Sin embargo, Santiago es la única de las poblaciones chilenas en la que se observó un evento de transposición en una hembra.

**Tabla 40. Tasas de transposición por familia de las poblaciones originales.**

Familias	N H (F <sub>1</sub> )	N M (F <sub>1</sub> )	N total	A	N1 (H)	N1 (M)	Tt (H)	Tt (M)	Tt (familia)
<b>Bellaterra</b>									
Familia 1	5	5	10	24	0	0	0	0	0
Familia 2	5	5	10	19	1	0	$5,6 \times 10^{-3}$	0	$2,8 \times 10^{-3}$
Familia 3	5	5	10	17	0	0	0	0	0
<b>Aarhus</b>									
Familia 1	5	5	10	21	1	0	$5 \times 10^{-3}$	0	$2,5 \times 10^{-3}$
Familia 2	5	5	10	20	1	3	$5,3 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$
Familia 3	5	5	10	22	0	0	0	0	0

N H: número de hembras; N M: número de machos; A: número de bandas originales; N1: número de inserciones nuevas; Tt: tasa de transposición; H: hembras; M: machos.

**Tabla 41. Comparaciones de las tasas de transposición intra e interpoblacionales de Bellaterra y Aarhus.**

Nº	Comparación	Comparación poblacional	Mann-Whitney			
			N	U	Z	P
1		H vs M Bellaterra	15/15	3	-1	0,5
2		H vs M Aarhus	15/15	4	-0,232	1
3		H Bellaterra/H Aarhus	15/15	4	-0,232	1
4		M Bellaterra/M Aarhus	15/15	3	-1	1

N: número de individuos; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta; valor crítico bilateral.

Tabla 42. Bandas de *gypsy* encontradas en las poblaciones colonizadoras.

Familias	A	A ( <i>pb</i> )	N1 (H)	T ( <i>pb</i> ) N1(H)	N1 (M)	T ( <i>pb</i> ) N1 (M)
<b>Puerto Montt</b>						
Familia 1	19	184 - 903	0		0	
Familia 2	14	203 - 810	0		1	810
Familia 3	22	180 - 926	0		0	
<b>Valdivia</b>						
Familia 1	15	260 - 1,029	0		1	843
Familia 2	18	185 - 816	0		1	816
Familia 3	16	203 - 1,029	0		0	
<b>Laja</b>						
Familia 1	9	245 - 896	0		0	
Familia 2	15	202 - 880	0		1	652
Familia 3	20	202 - 889	0		0	
<b>Chillán</b>						
Familia 1	18	184 - 969	0		0	
Familia 2	14	190 - 896	0		0	
Familia 3	14	203 - 817	0		0	
<b>Curicó</b>						
Familia 1	18	202 - 1,028	0		1	1028
Familia 2	15	218 - 896	0		3	456; 658; 864
Familia 3	13	205 - 818	0		3	2 (450); 1 (526)
<b>Santiago</b>						
Familia 1	15	202 - 896	0		0	
Familia 2	12	185 - 817	1	319	0	
Familia 3	12	203 - 737	0		0	

A: bandas originales; A (*pb*): tamaño de bandas originales; N1 (H): nuevos eventos de transposición en hembras; N1 (M): nuevos eventos de transposición en machos; T (*pb*): tamaño de nuevo evento de transposición.

Tabla 43. Tasas de transposición por familia de las poblaciones colonizadoras.

Familias	N H (F <sub>1</sub> )	N M (F <sub>1</sub> )	N total	A	N1 (H)	N1 (M)	Tt (H)	Tt (M)	Tt (familia)
<b>Puerto Montt</b>									
Familia 1	5	5	10	19	0	0	0	0	0
Familia 2	5	5	10	14	0	1	0	$7,7 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$
Familia 3	5	5	10	22	0	0	0	0	0
<b>Valdivia</b>									
Familia 1	5	5	10	15	0	1	0	$7,1 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$
Familia 2	5	5	10	18	0	1	0	$5,9 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$
Familia 3	5	5	10	16	0	0	0	0	0
<b>Laja</b>									
Familia 1	5	5	10	9	0	0	0	0	0
Familia 2	5	5	10	15	0	0	0	0	0
Familia 3	5	5	10	20	0	1	0	$5,3 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$
<b>Chillán</b>									
Familia 1	5	5	10	18	0	0	0	0	0
Familia 2	5	5	10	14	0	0	0	0	0
Familia 3	5	5	10	14	0	0	0	0	0
<b>Curicó</b>									
Familia 1	5	5	10	18	0	1	0	$5,9 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$
Familia 2	5	5	10	15	0	3	0	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
Familia 3	5	5	10	13	0	3	0	$2,7 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$
<b>Santiago</b>									
Familia 1	5	5	10	15	0	0	0	0	0
Familia 2	5	5	10	12	1	0	$9,1 \times 10^{-3}$	0	$4,5 \times 10^{-3}$
Familia 3	5	5	10	12	0	0	0	0	0

N H: número de hembras; N M: número de machos; A: bandas originales; N1: número de inserciones nuevas; Tt: tasa de transposición; H: hembras; M: machos.

Para visualizar de una manera más general los resultados encontrados, se realizaron los cálculos de las Tt a nivel poblacional observando que los valores más altos fueron registrados en la población de Curicó (tabla 44).

**Tabla 44. Tasas de transposición de las poblaciones colonizadoras.**

Familias	N total	A	N1 (H)	N1 (M)	Tt
<b>Puerto Montt</b>					
H + M	30	54	0	1	$3,0 \times 10^{-4}$
H	15	54	0	0	0
M	15	54	0	1	$6,0 \times 10^{-4}$
<b>Valdivia</b>					
H + M	30	47	0	1	$7,1 \times 10^{-4}$
H	15	47	0	0	0
M	15	47	0	1	$1,4 \times 10^{-3}$
<b>Laja</b>					
H + M	30	43	0	0	$4,0 \times 10^{-4}$
H	15	43	0	0	0
M	15	43	0	1	$8,0 \times 10^{-4}$
<b>Chillán</b>					
H + M	30	46	0	0	0
H	15	46	0	0	0
M	15	46	0	0	0
<b>Curicó</b>					
H + M	30	40	0	7	$2,9 \times 10^{-3}$
H	15	40	0	0	0
M	15	40	0	7	$5,8 \times 10^{-3}$
<b>Santiago</b>					
H + M	30	38	1	0	$4,0 \times 10^{-4}$
H	15	38	1	0	$9,0 \times 10^{-4}$
M	15	38	0	0	0

N H: número de hembras; N M: número de machos; A: número de bandas originales; N1: número de inserciones nuevas; Tt: tasa de transposición; H: hembras; M: machos.

Los análisis estadísticos, en los que se compararon las tasas de transposición, de hembras y machos de cada población como grupos independientes (12 grupos), mostraron que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), entre las tasas de transposición de las poblaciones colonizadoras (tabla 45). Para determinar de manera más exacta los datos que pudieron influenciar dichos niveles de significación, se analizaron por separado los valores obtenidos para hembras y machos. Los resultados mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de las Tt de *gypsy* entre los machos de las poblaciones colonizadoras pero no entre las hembras ( $P > 0,05$ ), ver tabla 45.

**Tabla 45. Prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones de la tasas de transposición entre las poblaciones colonizadoras.**

Nº	Comparación poblacional	N	Kruskal-Wallis	
			$\chi^2$	P
1	Colonizadoras	180	20,929	0,015*
2	H colonizadoras	90	5	1
3	M colonizadores	90	10,258	0,043*

H: hembras; M: machos. P: sig. exacta.

Teniendo en cuenta los resultados, anteriormente anotados, se realizaron todas las comparaciones posibles entre los machos de las poblaciones colonizadoras, a través de la prueba de Mann-Whitney. Los resultados de estas pruebas (tabla 46), no mostraron diferencias significativas, en ninguna de las comparaciones realizadas. Sin embargo, si se observó una tendencia ( $P = 0,05$ ) de mayor número de nuevas inserciones de *gypsy* en el genoma de los machos de Curicó, con respecto a las poblaciones de Laja, Chillán y Santiago. Con las dos últimas poblaciones, era de esperar, ya que en ellas no se observaron nuevos eventos de transposición.

**Tabla 46. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de la tasas de transposición entre machos vs hembras, y entre machos de las poblaciones colonizadoras.**

Nº	Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
			U	Z	P
1	M/H Colonizadoras	90/90	109,5	-2,28	0,016*
2	Puerto Montt/Valdivia	15/15	3	-0,70	0,35
3	Puerto Montt/Laja	15/15	4	-0,03	0,5
4	Puerto Montt/Chillán	15/15	3	-1,00	0,5
5	Puerto Montt/Curicó	15/15	1	-1,55	0,1
6	Puerto Montt/Santiago	15/15	3	-1,00	0,5
7	Valdivia/Laja	15/15	2	-1,16	0,2
8	Valdivia/Chillán	15/15	1,5	-1,55	0,2
9	Valdivia/Curicó	15/15	1,5	-1,33	0,15
10	Valdivia/Santiago	15/15	1,5	-1,55	0,2
11	Laja/Chillán	15/15	3	-1,00	0,5
12	Laja/Curicó	15/15	0	-1,99	0,05
13	Laja/Santiago	15/15	3	-1,00	0,5
14	Chillán/Curicó	15/15	0	-2,09	0,05
15	Chillán/Santiago	15/15	4,5	0,00	0,05
16	Curicó/Santiago	15/15	0	-2,09	0,05

M: machos; H: hembras; N: número de individuos analizados; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta; valor crítico unilateral. Las comparaciones 2-16 son entre machos colonizadores.

### 3.6.3. Comparación de tasas de transposición entre poblaciones colonizadoras y originales.

En las poblaciones colonizadoras se encontraron en total 11 nuevas inserciones (10 en machos y 1 en hembras), mientras que en los originales 6 (3 en hembras y 3 en machos). Como se puede observar en estos resultados, en las poblaciones originales la distribución por sexos de estos nuevos eventos de transposición, fue del 50 % en cada uno de ellos. Sin embargo, en las colonizadoras el 90% de las inserciones nuevas fueron detectadas en machos. Los análisis estadísticos a través de la prueba de Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en las Tt entre poblaciones colonizadoras y originales (primera comparación tabla 47). De igual manera, cuando se analizaron los datos separados por sexos: hembras (H) colonizadoras vs (H) originales y, machos (M) colonizadoras vs (M) originales, no se encontraron diferencias significativas, como se puede observar en

la tabla 47. Sin embargo, la comparación entre machos, mostró un valor de P próximo al límite de significación, indicando una tendencia a un aumento de la Tt de los machos de las poblaciones colonizadoras con respecto a las originales.

**Tabla 47. Prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de las tasas de transposición entre las poblaciones colonizadoras y las originales.**

Nº	Comparación poblacional	N	Mann-Whitney		
			U	Z	P
1	colonizadoras vs originales	180/60	52,00	-0,145	0,923
2	H colonizadoras vs H originales	90/30	88,5	-1,397	0,163
3	M colonizadoras vs M originales	90/30	76,5	-1,713	0,056

H: hembras; M: machos; N: número de individuos analizados; U: valor estadístico Mann-Whitney; Z: valor de la tipificación de U (aproximación a la media); P: sig. exacta; valor crítico unilateral.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Estudio de la estructura molecular de los elementos transponibles *bilbo* y *gypsy* en poblaciones originales y colonizadoras de *Drosophila subobscura*.

Teniendo en cuenta los resultados de un estudio previo (García Guerreiro et al. 2008) que mostraban altas frecuencias de inserción de los ETs *gypsy* y *bilbo* en poblaciones colonizadoras de *D. subobscura*, se planteó comprobar si dichas frecuencias eran debidas a deriva fundadora ó a eventos de transposición hacia determinados lugares cromosómicos. El hecho de trabajar con cromosomas politénicos ofrece muchas ventajas (Drosopoulou et al., 2011; Lee y Langley, 2010; Zhimulev et al., 2004; Zhimulev, 1999), así como la técnica de hibridación *in situ* (Nouri Aria, 2008), en especial su utilidad en el estudio de la distribución de secuencias repetitivas distribuidas tanto en la heterocromatina como en la eucromatina, tal y como lo demuestran numerosos trabajos realizados en *Drosophila* (García Guerreiro et al., 2008; Kogan et al., 2003; Sun et al., 2003; Labrador y Fontdevila, 1994; Blesa y Martínez, 1997; Alberola y de Frutos, 1996; Yamamoto et al., 1990; Miklos et al., 1988; Pierce y Lucchesi, 1981). A través de esta técnica, en cromosomas politénicos de *D. subobscura*, se lograron aislar tres clones que contenían los ETs tema de este estudio (2 clones de *gypsy* y 1 clon de *bilbo*), seleccionados bajo las estrictas normas que se detallan a continuación:

Los clones que se escogieron como aptos para el análisis poblacional, fueron aquellos que presentaron una única posición, distinta de las posiciones estándar presentes en el genoma de la cepa *ch-cu* de *D. subobscura*. Además se usó una sonda específica de cada ET (*gypsy* ó *bilbo*) que contenía una secuencia flanqueante de genómico, lo que garantizó su aislamiento a partir de la genoteca. El tamaño de la secuencia es importante en las sondas marcadas con métodos no radiactivos (digoxigenina) porque la sensibilidad de estos procedimientos es algo menor que la obtenida por métodos de marcaje radiactivos, siendo difícil de obtener buenas señales por debajo de las 500 pb (Labrador, 1994; Eggleston et al., 1988).

En el presente estudio las copias de interés incluían elementos *gypsy* y *bilbo* presentes en la eucromatina ya que son lugares ricos en genes y rara vez se encuentran ETs anidados en otros (Lee y Langley, 2010; Bergman et al., 2006; Biémont y Vieira, 2005). Esto aumenta la probabilidad de detectar copias completas de estos ETs a través de hibridación *in situ*. No obstante, cabe destacar que en *Drosophila* la incidencia de algunos ETs en la eucromatina es baja (Lee y Langley, 2010) y el elemento *gypsy* es uno de ellos dado que posee muy pocas copias en la eucromatina (brazos de los cromosomas) quedando la mayor parte de ellas confinadas a las regiones heterocromáticas (Biémont et al., 1994).

Los dos elementos considerados en este estudio presentan una gran cantidad de copias heterocromáticas, hecho que se evidenció por la señales de hibridación observadas en las zonas centroméricas y pericentroméricas de los diferentes cromosomas de la cepa *ch-cu* de *D. subobscura*. Los ETs son los principales componentes de las regiones centroméricas en *Drosophila*, así como de la mayoría de eucariotas superiores (Biémont y Viera, 2005; Sun et al., 2003; Kogan et al., 2003; Copenhaver et al., 1999; Labrador, 1994). Estas copias, generalmente, se encuentran desordenadas e incompletas, altamente degeneradas y anidadas en otros ETs (Lee y Langley, 2010; Biémont y Vieira, 2005). De esta manera, las características de las secuencias de ETs presentes en la heterocromatina, disminuiría la probabilidad de aislar una copia completa de *gypsy* o de *bilbo* y dificultaría la identificación por hibridación *in situ* de, únicamente, las copias de estos dos ETs. Sin embargo, cabe señalar que en casos particulares se consiguió el aislamiento de secuencias completas de ETs de la heterocromatina (Kogan et al., 2003; Sun et al., 2003, Biémont y Vieira, 2005).

Algunos ETs parece que presentan preferencias de inserción en la heterocromatina, mientras que otros presentan, además, copias en la eucromatina (Kogan et al., 2003; Sun et al., 2003), de modo que los clones obtenidos en las zonas eucromáticas pueden hibridar en la heterocromatina (Labrador, 1994), tal y como se observó en la mayoría de clones hibridados en este estudio.

#### 4.1.1. Análisis poblacional

En el presente estudio se aislaron tres copias eucromáticas: una copia de *bilbo* (*bilbo 12*) y dos de *gypsy* (*gypsy1* y *gypsy10*). Posteriormente se trató de amplificar por PCR cada copia en un conjunto de poblaciones naturales para determinar si todas ellas correspondían a la misma copia inserta en el mismo lugar a nivel nucleotídico (idénticas regiones flanqueantes) o, por el contrario, correspondían a eventos de transposición diferentes. De éstas, la única copia que se encontró en más de la mitad de las poblaciones analizadas fue *gypsy10*, mientras que el resto (*gypsy1* y *bilbo12*) no se lograron amplificar por PCR en ninguna de las poblaciones. Para intentar entender estos resultados se pueden considerar, principalmente, tres hipótesis: 1) Que estas copias se hayan perdido, 2) Que su frecuencia en la población sea muy baja de tal manera que los individuos analizados no presentasen estas copias. En ambos casos la deriva genética fundadora sería la probable responsable de la desaparición de estas copias en las poblaciones colonizadoras. 3) Que estas copias si bien se encuentran en la misma región genómica, se hallan insertas en una región diferente a nivel nucleotídico lo que haría que no fuesen detectadas mediante PCR.

Una vez que se ha expuesto de manera general las hipótesis, se discutirán a continuación los resultados clon a clon empezando por aquellos que no se lograron amplificar en ninguna de las poblaciones analizadas.

#### 4.1.2. Clon *bilbo 12*

Las dos secuencias de *bilbo* que se encontraron en el clon denominado *bilbo 12* (a y b) ver figura 13 y 14, posiblemente correspondan a copias muy antiguas de este elemento, que a través del tiempo han sufrido una gran cantidad de deleciones y sustituciones, mutaciones responsables de que en la actualidad esta secuencia se encuentre incompleta y degenerada, perdiendo la capacidad de transponerse.

En la posición cromosómica (E61C), en la que se localizó este clon (figura 12), no se reportó ninguna copia de *bilbo* en las diferentes poblaciones analizadas por García Guerreiro et al., 2008. Teniendo en cuenta lo anterior, y los resultados del

presente estudio, se puede considerar que esta copia de *bilbo* se han perdido por deriva como consecuencia del pequeño número de individuos que pudieron contenerla en su genoma.

Sin embargo, también se puede considerar la posibilidad de que *bilbo* 12a y *bilbo* 12b sigan presentes en las poblaciones analizadas encontrándose alojados en zonas del genoma ricas en secuencias repetitivas lo que dificultaría su amplificación por PCR. De hecho, el análisis de la secuencia flanqueante de este clon mostró homología con secuencias del elemento *P* reportadas en diferentes especies, así como de secuencias microsatélites (tabla 20 y 21).

Por otra parte, a través de la técnica no se pueden distinguir inserciones dentro de la misma banda con lo cual si estas inserciones se encuentran en diferentes lugares a nivel nucleotídico en las diferentes poblaciones no se podrían detectar por PCR.

#### **4.1.3. Clon *gypsy1***

Como se mencionó en el apartado de resultados, la copia de *gypsy* denominada *gypsy 1*, se encontró en la región cromosómica E70B (figura 8), que en un estudio anterior (García Guerreiro et al., 2008) se había encontrado a una frecuencia muy baja (3,8 %) en la población de Bordils (Girona, España). Sin embargo, pese a que en el presente estudio esta población también se incluyó en los análisis, no se encontró esta copia de *gypsy* en ninguna de las poblaciones analizadas por PCR.

Dado que su frecuencia en la población original era baja, no es sorprendente la ausencia de detección en las poblaciones colonizadoras. Se podría pensar que esta copia podría haber surgido de una transposición reciente en la población, de ahí su baja frecuencia. Sin embargo, dado que *gypsy1* corresponde a una copia incompleta de *gypsy* (figura 8), hace pensar que se trata de una copia antigua del elemento, que ha sufrido cambios a través del tiempo, y que se mantiene en tan solo algunos individuos, lo que explicaría que ninguno de los individuos analizados presentara dicha copia.

No obstante, no se puede descartar la posibilidad que *gypsy1* se haya perdido del genoma de las poblaciones analizadas. Si esta hipótesis fuese cierta, la señal de hibridación que se observó en las hibridaciones *in situ* realizadas en este estudio

en las poblaciones de Dijon, Sintra, Madeira, Bellaterra y El Perelló, en la misma región cromosómica (E70B) podría ser el resultado de otra inserción de *gypsy* que se encuentra en otra posición, muy cerca a nivel nucleotídico en el genoma. Esta hipótesis explicaría porque la búsqueda de *gypsy1* en las poblaciones analizadas no diese ningún resultado pese al diseño de varios juegos de cebadores. Sin embargo, para aceptar esta hipótesis tenemos que suponer que los eventos de transposición hacia lugares cromosómicos colindantes fueron antiguos, ya que la copia se presenta incompleta.

#### **4.1.4. Clon *gypsy10***

La inserción de una copia de *gypsy* en el cromosoma J en la región 29B (J29B) denominada *gypsy10* (figura 10), no fue reportada en el trabajo realizado por García Guerreiro et al., 2008. La ausencia de su reporte en dicho trabajo poblacional, llevó a presuponer que *gypsy10* se encontraba en muy baja frecuencia en las poblaciones analizadas. No obstante, en el presente trabajo su incidencia a nivel poblacional es bastante alta. Si se considera que *gypsy* a pesar de ser un elemento que presenta pocas copias eucromáticas en la cepa *ch-cu* de *D. subobscura*, se encontró en 14 de las 23 poblaciones en estudio podría considerarse una copia de alta ocupación.

Los análisis de *gypsy10* a nivel de secuencia, y ubicación nucleotídica, no mostraron diferencias entre las diferentes poblaciones, ni de éstas con el elemento canónico (Alberola y de Frutos, 1996), lo que sugiere que esta copia puede ser fruto de una transposición reciente en la población que se propagó por transmisión vertical. Hay que tener en cuenta también que la colonización de América es un proceso reciente (Prevosti et al., 1988; Pascual et al., 2007) y, por tanto, la selección negativa probablemente no haya tenido tiempo de actuar. Con los resultados del presente estudio lo más probable es que la deriva genética precedida de un efecto fundador sea la responsable de la alta frecuencia de *gypsy10* en el genoma de *D. subobscura* de las poblaciones colonizadoras.

La secuencia de *gypsy10* no se encuentra tan degenerada como las secuencias de *gypsy 1* y *bilbo 12* (a y b), su ORF3 está completo y la inexistencia de codones stop podría indicar la posibilidad de que esta copia codifique para la proteína de la

envoltura viral (*Env*), necesaria para la actividad extracelular. La inexistencia de codones stop en este gen (*env*) abre la posibilidad de que esta copia de *gypsy* presente capacidad infecciosa en *D. subobscura*, tal y como lo presentan las copias de este elemento en *D. melanogaster* (Pélisson et al., 1994; Song et al., 1994). Nuestro resultado difiere de lo encontrado por Alberola y de Frutos, 1996, quienes encontraron truncada la secuencia del gen *env* en la copia de *gypsy* aislada por ellos. Por tanto, *gypsy10* es la primera copia de *gypsy* reportada con posibilidad de comportarse como un retrovirus en *D. subobscura*.

La secuencia de *gypsy10* podría sugerir un origen más reciente que *bilbo12* y *gypsy1*. Esta copia pudo aparecer en las poblaciones originales en un tiempo cercano al proceso de colonización a América. Su distribución poblacional también daría referencia de este hecho, ya que se encuentra en originales y colonizadoras; representando la amplitud de distribución de *D. subobscura* (Budnik et al., 1991; Prevosti et al., 1988; Brncic et al., 1981); de las 14 poblaciones donde se encontró: 4 son originales (Tenerife, El Perelló, Dijon y Montpellier) y 10 colonizadoras; 4 poblaciones suramericanas (Santiago, Coyhaique, Laja, Valdivia) y 6 norteamericanas (Bellingham, Davis, Medford, Port Hardy, Salem y Eureka).

Esta hipótesis también se puede apoyar con las comparaciones de la secuencia LTR de las poblaciones analizadas, las cuales son casi idénticas entre ellas, los pocos cambios que se observaron están agrupados en su gran mayoría en la población de Tenerife (tabla 19), lo que supone que la copia de *gypsy* presente en esta población es más antigua. Aún así, es importante considerar que en las poblaciones no fue posible aislar una copia completa de *gypsy10* (figura 11), este hecho dificulta la posibilidad de determinar la edad del elemento ya que no se cuenta con las dos secuencias LTRs, indispensables para realizar estos cálculos (Bowen y McDonald, 2001). Aún así podemos inferir que tan antigua es al comparar el número de cambios en la secuencia entre poblaciones y de éstas con el elemento canónico, es decir a través del nivel de integridad de la secuencia LTR presente.

A nivel molecular se podría considerar que *gypsy10* se encuentra cerca de regiones conservadas del genoma. La región flanqueante de este clon presenta una homología de más del 90% con parte de la secuencia (677 pb) de genes ribosomales reportados en diferentes especies de *Drosophila*, así como de otros dípteros, como se reportó en el capítulo de resultados (tabla 18).

Los mecanismos de regulación génica, así como los mecanismos endógenos de regulación de los ETs suelen ser muy estables y conservados en las diferentes especies (Siomi et al., 2011; Kim et al., 2009), por tanto, el evento de inserción de esta copia de *gypsy* debió ocurrir gracias a la relajación de estos mecanismos de regulación, en respuesta al estrés producido, por ejemplo, por factores ambientales, como se ha tratado de estudiar en *Drosophila*, en plantas, y en otros eucariotas, en los que parece estar mejor documentado (García Guerreiro, 2012; Strand y McDonald, 1985). Su permanencia en el genoma pudo estar favorecida por las bajas tasas de recombinación que posiblemente presenta la región del genoma donde se encuentra esta copia de *gypsy*. Se sabe, que existe mayor probabilidad de que los ETs se fijen en regiones con bajas tasas de recombinación que en regiones con tasas normales de recombinación (Fontanillas et al., 2007; Biémont y Vieira, 2005; Blumenstiel et al., 2002).

Algunas de las copias de ETs caracterizadas en este estudio, como ya se ha mencionado en cada uno de los apartados anotados con anterioridad, son copias antiguas de estos elementos. Sus secuencias se encuentran incompletas y degeneradas. Gran parte de ellas se hallan concentradas en la heterocromatina, aunque también en los brazos de los cromosomas como se pudo observar en el presente estudio. Los cambios que han sufrido las secuencias como consecuencia de deleciones y sustituciones, dan razón del tiempo que han permanecido en el genoma. En *D. melanogaster* se considera que los elementos LTR de longitud completa (que poseen dos LTRs completas) son muy jóvenes, de transposición reciente, ya que no ha transcurrido el tiempo suficiente para acumular mutaciones (Bowen y McDonald, 2001). Por tanto, si *gypsy* ó *bilbo* se encontraran activos en el genoma de *D. subobscura* se aumentaría la probabilidad de encontrar una copia

completa lo que parece probable dado que estos dos elementos son activos a nivel transcripcional como detallaremos más adelante.

Por otra parte, en *D. melanogaster*, como en otras especies de *Drosophila*, la tasa de deleciones de ADN de 400 pb es muy alta dentro del genoma, lo que conlleva a una elevada pérdida de ADN (Bowen y McDonald, 2001; Petrov y Hartl, 1997). Por ejemplo, en *D. virilis* se estima que el nivel de pérdida de ADN es 75 veces más rápido que el de pseudogenes en mamíferos. Esta alta tasa de pérdida de ADN debería conducir a una rápida pérdida de elementos que no son necesarios en el ADN (Bowen y McDonald, 2001; Petrov y Hartl, 1997;). El trabajo realizado, por Rebollo et al. (2008) con el elemento *Helena* es un buen ejemplo de este caso. Con él demostraron que el proceso de eliminación de *Helena* en el genoma hospedador es muy rápido y que está mediado por grandes deleciones, generadas por un mecanismo interno de eliminación muy activo en *D. simulans*. Los resultados del presente estudio podrían explicarse a la luz de esta hipótesis, ya que los elementos que se han caracterizado contienen deleciones de sus secuencias cuando se comparan con la longitud de los elementos canónicos publicados (Alberola y de Frutos, 1996; Blesa y Martínez, 1997).

Los resultados de las investigaciones previas en *D. subobscura*, con poblaciones originales vs colonizadoras, ha mostrado que existen diferencias en las frecuencias de inserción de los ETs *bilbo* y *gypsy*: muy bajas en las poblaciones originales y bimodal (altas y bajas) en las colonizadoras. La deriva fundadora, es el fenómeno propuesto hasta el momento para explicar esta distribución bimodal de las frecuencias. No obstante, otros estudios realizados de estos ETs en *D. subobscura*, junto con los realizados en *D. buzzatti* no descartan, además, la existencia de puntos calientes de inserción, producto de eventos de transposición durante la colonización, sugiriendo que no solo la deriva genética sería la responsable de estas altas frecuencias de inserción (García Guerreiro y Fontdevila, 2011; García Guerreiro et al., 2008; 2007; García Guerreiro y Fontdevila, 2001;). La observación realizada en el presente estudio del clon *gypsy1* por hibridación *in situ* junto a la ausencia de su amplificación por PCR, podría apoyar esta hipótesis. No obstante, los análisis moleculares y poblacionales del clon *gypsy10*, también aportan evidencia de que es la deriva fundadora la fuerza evolutiva responsable de la

dinámica y distribución de estos ETs, ya que los análisis de *gypsy10* a nivel de secuencia y ubicación nucleotídica no mostraron diferencias entre las diferentes poblaciones, ni de estas con el elemento canónico publicado por Alberola y de Frutos en 1996.

Pese a que todos los trabajos que se han realizado hasta el momento apuntan de manera más contundente que es la deriva fundadora la principal responsable de la dinámica y distribución de los ETs, no se puede negar, de manera categórica, que la colonización pueda generar explosiones de transposición, y que los puntos calientes de transposición (zonas específicas del genoma con alta tasa de ocupación de ETs) puedan existir realmente (García Guerreiro y Fontdevila, 2007).

#### **4.2. Estudio de las tasas de expresión de los elementos transponibles *gypsy* y *bilbo* en poblaciones colonizadoras vs originales.**

Los niveles de expresión de *gypsy* y *bilbo* se analizaron, en primera instancia, en individuos completos. Una vez se comprobó la expresión de estos ETs en las diferentes poblaciones, se realizó la medición de las Tt de *gypsy*, ya que sus altas tasas de expresión sugerían una mayor probabilidad de encontrar altas tasas de transposición el genoma de las poblaciones analizadas. Este estudio se completó con los análisis del patrón de expresión de *gypsy* y *bilbo* en la línea germinal.

En la literatura actual no existe ningún reporte ni sobre las tasas de expresión, ni de transposición de *gypsy* y *bilbo* en *D. subobscura*. Por lo tanto, este trabajo constituye el primer estudio en esta especie.

Los resultados de los análisis de ARN de individuos completos muestran claramente, en unos casos de manera más contundente que en otros, que tanto *gypsy* como *bilbo* presentan mayores tasas de expresión en las poblaciones colonizadoras que en las originales (figuras 23 y 34), con excepción de las comparaciones con las poblaciones de Bellaterra y Aarhus. En estas dos poblaciones originales los dos ETs presentaron mayores tasas de expresión en todos los niveles de comparación, detallados en el apartado de resultados. No

obstante, a nivel de la línea germinal el panorama de expresión de *gypsy* y *bilbo* es diferente, porque no se observaron patrones tan delimitados entre colonizadoras y originales. Las tasas de expresión de *gypsy* no presentaron diferencias marcadas entre originales vs colonizadoras (figura 45), siendo Madeira la única de las poblaciones originales que presentó de manera generalizada mayores incrementos, mientras que Aarhus solo presentó tasas de expresión más altas en tres de las seis poblaciones colonizadoras en estudio. Por otra parte, en *bilbo* tampoco se observan grandes diferencias entre las originales vs colonizadoras (figura 56), pero en este caso las tasas de Bellaterra y Aarhus son más altas que las colonizadoras, resultado que es coincidente con el observado en el análisis de las tasas de expresión de individuos completos.

Los análisis mostraron que las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo* son diferentes a nivel de sexos y en el caso de *gypsy*, también, existen diferencias en el patrón de expresión a nivel del tejido analizado. *Gypsy* presentó, en los análisis de individuos completos, mayores tasas de expresión en las hembras con respecto a los machos (figuras 18 y 22), sin embargo, cuando se analizó la línea germinal se observaron mayores tasas de expresión en los machos que en las hembras (figuras 36 y 41), en ambos casos tanto en las poblaciones originales como colonizadoras. Mientras que *bilbo* presentó mayores tasas de expresión en los machos tanto en el análisis de individuos completos (figuras 29 y 33) como en la línea germinal (figura 51 y 55).

La expresión de *gypsy* y *bilbo* en el análisis de individuos completos, puede estar principalmente determinada por la expresión de estos ETs en la línea somática, si se tiene en cuenta que dichas células estarían mayoritariamente representadas en los tejidos procesados. La comparación de estos resultados con los de la línea germinal aclararon un poco más el panorama con respecto a los patrones de expresión de estos elementos en *D. subobscura*: *gypsy* presentó en la línea somática (en los análisis de individuos completos) tasas más altas de expresión que las observadas en *bilbo*. Mientras que en la germinal no se observaron diferencias tan marcadas en las tasas de expresión entre las diferentes poblaciones de ninguno de los dos ETs en estudio. Con excepción de la línea germinal de los machos, donde *bilbo* presentó tasas considerablemente más altas que *gypsy*.

#### 4.2.1. Tasas de expresión de ETs en los testículos de *Drosophila*.

Uno de los resultados más interesantes del presente estudio lo constituyen las altas tasas de expresión observadas de *gypsy* y *bilbo* en los machos, a nivel de la línea germinal, con las particularidades, ya anotadas, para cada elemento. Los resultados de *gypsy* también se apoyan en los análisis de las tasas de transposición.

En la literatura científica se encuentran estudios relacionados con el cromosoma Y que se caracteriza por su baja concentración de genes y estar constituido mayoritariamente por heterocromatina (Bonaccorsi et al., 1990). Aquí se encuentran grandes cantidades de secuencias repetitivas en tándem de ADN satélite, que son el principal componente de los genes de fertilidad del cromosoma Y, necesarios para la diferenciación de los espermatozoides normales (Bonaccorsi et al., 1990). Algunas de estas secuencias están altamente transcritas en los testículos durante la espermatogénesis, en los espermatoцитos primarios en *D. melanogaster* (Bonaccorsi et al., 1990). Según estos autores, la transcripción de algunas de estas secuencias satélite se da sólo en estructuras filamentosas, que se forman en los espermatoцитos jóvenes, llamados bucles, que desaparece junto con los transcritos en la primera profase meiótica. En *D. hydei* se ha postulado un papel biológico similar para los bucles del cromosoma Y, demostrándose que existe una transcripción activa en ellos, aunque las secuencias de ADN altamente repetitivo no parecen transcribirse en los bucles de esta especie. Pese a que estos resultados corresponden al estudio de la expresión de ADN altamente repetitivo, es de esperar que la alta proporción de heterocromatina, que constituye al cromosoma Y, pueda favorecer de igual manera que los ETs se inserten a lo largo de su secuencia. Esto podría suceder especialmente en aquellas regiones cercanas a sitios de alta actividad transcripcional como se demostró en la línea germinal de los machos de *D. melanogaster*, en los trabajos realizados por diferentes autores (Fontanillas et al., 2007; Timakov et al., 2002; Bownes, 1990). Estos sitios de alta actividad transcripcional también favorecerían la expresión de los ETs insertos cerca de estas regiones en el cromosoma Y. Si esto fuese así, podría contribuir al incremento de las tasas de expresión observadas para *gypsy* en la línea germinal de los machos y de *bilbo* en los machos (individuos completos y en la línea germinal).

Sin embargo, la contribución del cromosoma *Y*, probablemente no alcanzaría a explicar en su totalidad los altos niveles de expresión observados en el presente estudio.

Bownes (1990) logró que el elemento *P* se movilizara, siendo el primero en reportar que la actividad transcripcional podría tener un efecto positivo en la inserción de ETs. Los resultados de su trabajo mostraron un sesgo en los eventos de inserción del elemento *P* en la línea germinal, pero con una mayor preferencia de inserción en las gónadas masculinas.

Otro estudio relacionado con la movilización artificial del elemento *P* en *Drosophila*, en el que se observó un sesgo de inserción relacionado con la expresión, fue el realizado por Timakov et al. (2002). En este estudio observaron expresión de tres genes diana (Hsp27, Hsp23, Hsp26) en las células germinales de los machos, en los que una transposición local tuvo lugar en las regiones promotoras transcripcionalmente activas de la línea celular germinal de los machos de *D. melanogaster*.

Fontanillas et al. (2007) a través del estudio de transposición del elemento *P* en *D. melanogaster*, propusieron y corroboraron que las nuevas copias de ETs surgen en lugares en donde pueden acceder fácilmente para insertarse en el genoma. Observaron que, en *D. melanogaster*, las tasas de inserción de ETs serían mayores alrededor de los genes expresados en las células que dan lugar a los espermatozoides y a los óvulos, es decir en la línea germinal. No obstante, encontraron que la mayoría de inserciones ocurrían en promotores de genes que se transcribían activamente en las células germinales masculinas.

El sesgo de inserción hacia genes expresados se puede explicar de manera mecánica: la transcripción se asocia con una descondensación de la cromatina, lo que facilita que la maquinaria transcripcional pueda acceder al ADN, pero también lo expone a las enzimas implicadas en la transposición (Fontanillas et al., 2007; Timakov et al., 2002). De esta manera, evaluar el efecto de la expresión génica en la tasa de inserción se puede hacer relativamente fácil, ya que esto conducirá a una acumulación de elementos insertados en, y alrededor, de los genes expresados en la línea germinal, en comparación con los genes expresados en el soma. Esta

acumulación diferencial de ETs se podría ver ya que solo los eventos de transposición que tienen lugar en las células de la línea germinal se transmiten a las generaciones futuras, mientras que todas las inserciones somáticas se pierden (Fontanillas et al., 2007).

Estos estudios demostraron que la transposición local depende del patrón de expresión del gen diana. Por tanto, a la luz de estas investigaciones, sería importante determinar si promotores activos en la línea germinal de los machos de *D. subobscura* dirigen, preferentemente, inserciones locales de *gypsy* y *bilbo*, como es el caso del elemento *P* en *D. melanogaster*. Esto ayudaría a entender el sesgo de expresión observado de *gypsy* y *bilbo* en la línea germinal de los machos. Quizás genes que se expresan únicamente en la línea germinal de los machos puedan desregularse, por causas que aún no conocemos; ya sean genes involucrados en la espermatogénesis, y/o aquellos involucrados en los mecanismos de regulación endógena, exclusivos de machos.

Por tanto, se debe evaluar la posibilidad de que las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo*, estén influenciadas por mecanismos de regulación mediados por pequeños RNAs, como los piRNAs, que se encuentran en los genomas para defenderlos de transposones (Senti y Brennecke, 2010; Kim et al., 2009). Su expresión parece estar limitada a la línea germinal, en la cual se encuentran altamente conservados en diferentes especies animales (Siomi et al., 2011; Senti y Brennecke, 2010; Kim et al., 2009; Watanabe et al., 2008; Yin y Lin, 2007). Estos RNAs se unen a proteínas como: las piwi y Aub (*Aubergine*), entre otras, formando complejos de regulación. Estas proteínas están involucradas en funciones vitales para el organismo, y también en los mecanismos de regulación de ETs. Piwi es un factor esencial de autorenovación en las células madre de la línea germinal, tanto de machos como de hembras, y está involucrado en la regulación de la actividad de los transposones, especialmente en ovarios (Brennecke et al., 2008; Nishida et al., 2007; Brennecke et al., 2007; Zamore, 2007; Vagin et al., 2006). Mientras que el gen *Aubergine* (*Aub*) es necesario para la formación de células germinales y para el mantenimiento de la fertilidad de los machos de *Drosophila* (Nishida et al., 2007; Vagin et al., 2006).

El trabajo realizado por Kalmykova et al. (2005); en el que usaron mutantes de piwi para el estudio de la expresión de retrotransposones LTR en testículos, reveló

que el gen *piwi* es necesario para el silenciamiento de los retrotransposones en la línea germinal de los machos, ya que las mutaciones en este gen generaron la desrepresión del elemento *copia* y la movilización del elemento *mdg1* en esta línea germinal de los machos. Consideraron que dicho efecto posiblemente se debía a que la mutación desestabilizaba el mecanismo de silenciamiento a través de piRNAs. Su trabajo constituyó el primer reporte de que la mutación de un solo gen podía desencadenar eventos de transposición en la línea germinal de machos en *Drosophila*. Estos resultados mostraron que *piwi* presenta un papel en el silenciamiento de *mdg1* en las células proliferativas de la línea germinal y del elemento *copia* en las últimas etapas de la espermatogénesis.

Nishida et al. (2007), estudiaron las características de los piRNAs asociados con las proteínas *piwi* y *Aub* en los ovarios y testículos. Sus estudios mostraron que pese a que existen diferencias en la localización celular de *piwi* y *Aub* en los ovarios, se unen a un conjunto de piRNAs muy parecidos a nivel estructural. Por el contrario, en los testículos los piRNAs asociados a *Aub* presentan características que les hace únicos, diferentes de los piRNAs encontrados en los ovarios, ya que parecen ser más cortos que los asociados con *piwi* (Saito et al., 2007; Nishida et al., 2007). Los autores propusieron que tanto en ovarios como en testículos, las funciones de *Aub* en el silenciamiento del ARN citoplasmático se debe a su asociación con 24 a 30 nucleótidos de los piRNAs. Por otra parte, encontraron que los siRNAs y los miRNAs no presentaban asociación con *Aub*, posiblemente, porque existen vías distintas que regulen la asociación de piRNAs con *Aub* en los testículos. El estudio de estos autores proporcionó los primeros conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos de silenciamiento génico mediado por *Aub* en unión con piRNAs en los testículos de *Drosophila*.

Los piRNAs también presentan una alta complementariedad con el mRNA del gen *vasa* (*vas*), que se expresa en toda la línea germinal excepto en el esperma maduro (Nishida et al., 2007). *Vasa* está involucrado en la diferenciación del ovocito y en la formación de tumores en las células nodrizas y en ovocitos no diferenciados, así como en el silenciamiento de retrotransposones (Liu et al., 2009).

Los estudios citados dejan en claro que existen diferencias en el mecanismo de regulación de los piRNAs a nivel de sexos. Esto implicaría que los factores que pueden desestabilizar el mecanismo de regulación de los ETs en la línea germinal

de los machos no necesariamente tendrían que afectar este mecanismo en las hembras, y viceversa. Es posible que las altas tasas de expresión observadas, en el presente estudio, estén determinadas por cambios en la producción de las proteínas y/o en la estructura de la proteína a las que se unen los piRNA en la línea germinal, en especial de *Aub* que parece expresarse mayoritariamente en la línea germinal de los machos.

#### **4.2.2. Tasas de expresión de ETs en los ovarios de *Drosophila***

Los resultados del presente trabajo, también podría mostrar que existen diferentes vías de regulación de los ETs en la línea somática vs la germinal al igual que lo observado en otros estudios realizados en ovarios de *Drosophila* (Senti y Brennecke, 2010). En nuestro estudio se espera que los resultados de los análisis de individuos completos representen la expresión de este elemento en la línea somática. Si unimos este estudio junto con el realizado en la línea germinal podríamos determinar, de manera indirecta, que *gypsy* y *bilbo* estarían regulados por vías distintas. Así por ejemplo dado que *gypsy* y *bilbo*, a nivel germinal, se expresan mucho más en machos podemos suponer que son las hembras las que presentarían un fuerte control a nivel germinal. Sin embargo, a nivel de los análisis de individuos completos la expresión de *gypsy* estaría fuertemente controlada a nivel de los machos, mientras que *bilbo* lo estaría a nivel de las hembras. Esto estaría apoyado por el hecho que *gypsy* se expresa más en células somáticas (análisis de individuos completos) de hembras y *bilbo* se expresa más en machos.

En *Drosophila* se sabe que existen dos vías de silenciamiento mediadas por piRNAs, relacionadas pero distintas: una en las células somáticas y otra en la línea germinal, como lo demuestra el trabajo realizado por Malone et al. (2009) en células germinales y en las células somáticas del folículo del ovario. Su trabajo reveló que los piRNAs en cada vía presentaban características únicas y dependencias génicas distintas que cabía considerar. Por una parte, en la línea germinal la vía de los piRNA está fuertemente delimitada por siete genes, entre los que se encuentran: *piwi*, *auberinge* y *vasa*. La pérdida de su función afecta los niveles de piRNAs, ya que algunos de ellos están involucrados directamente en el ciclo de amplificación “ping pong”, que es parte fundamental de esta vía (Malone et al., 2009). Las proteínas relacionadas con este mecanismo de silenciamiento,

presentan diferencias significativas de expresión dependiendo de la línea celular, ya que en las células germinales se expresan preferentemente tres miembros de la familia PIWI (Piwi, Aubergine (Aub) y AGO3), y en las células somáticas de apoyo se expresa exclusivamente Piwi (Senti y Brennecke, 2010).

En las hembras existe una estructura típica de la línea germinal llamada “nuage” (que significa nube en francés), también conocida como cuerpo cromatoide en el ratón o gránulo perinuclear *P* en *Caenorhabditis elegans* (Siomi et al., 2011; Lim y Kai, 2007). “Nuage” puede detectarse en las células nodrizas pero está ausente en el ovocito transcripcionalmente inactivo, por lo que su presencia podría correlacionarse con la transcripción activa. Muchos componentes nuage, incluyendo PIWIs asociados con piRNAs, son proporcionados por las células nodrizas al ovocito. Nuage contiene muchas otras proteínas que son genéticamente requeridas para el silenciamiento mediante piRNA y las deficiencias de estas proteínas eliminarían o distorsionaría el perfil de los piRNAs. Además, pueden promover otros componentes de “nuage” para deslocalizar o incluso causar que se desintegre la estructura (Siomi et al., 2011).

Además, los grupos piRNA que operan en la línea germinal, generalmente producen pequeños RNAs de ambas cadenas genómicas y contienen fragmentos de elementos en orientaciones aleatorias, el sistema global está fuertemente sesgado hacia las copias anti sentido (Brennecke et al., 2007). Esta tendencia es aún más evidente en los pequeños RNAs formados independientemente del ciclo de “ping-pong”, lo que indica que la biogénesis primaria de grupos piRNA de alguna manera percibe la información del tipo de hebra pero el mecanismo por el cual esto ocurre no se conoce (Senti y Brennecke, 2010; Malone et al., 2009).

Por otra parte, el mecanismo de silenciamiento de la expresión de transposones en las células somáticas del ovario mediada por piRNAs aún se desconoce. El único factor con una función conocida es el locus *flamenco* que sirve como una fuente importante de piRNAs (Senti y Brennecke, 2010). En esta línea el clúster *flamenco* genera piRNA, en ausencia del ciclo ping pong, a partir de una sola hebra y de un ARN precursor que contiene elementos en una orientación uniforme (Brennecke et

al., 2007). El sesgo antisentido del sistema somático parece estar determinado evolutivamente, por la selección, para las inserciones de transposones en una orientación preferencial dentro del gen *flamenco* (Malone et al., 2009). Sin embargo, el mecanismo de silenciamiento de la expresión de transposones en las células somáticas del ovario, mediada por piRNAs, aún no se conoce completamente (Senti y Brennecke, 2010).

El locus *flamenco* se encuentra en el cromosoma X y controla específicamente los retrotransposones LTR de la familia Gypsy. Así, se ha propuesto que la familia de elementos Gypsy han colonizado el nicho somático gonadal propagándose en la población mediante la infección de células germinales subyacentes con las partículas virales producidas en las células epiteliales del folículo (Senti y Brennecke, 2010; Lécher et al., 1997; Song et al., 1997; Kim et al., 1994). De acuerdo con esta noción, muchos de los elementos que muestran un patrón de control Piwi *flamenco* pueden codificar proteínas de la envoltura (Chalvet et al., 1999). La especificidad de cada vía de silenciamiento de ETs, en el ovario de *Drosophila*, sugiere que la vía se adapta específicamente a la estructura y los hábitos de cada elemento para proteger eficazmente la línea germinal de la actividad del transposon (Malone et al., 2009).

Es importante tener en cuenta que los PIWIs asociados a piRNAs y las poblaciones de piRNA se encuentran, selectivamente, en los ovarios enteros y no en los huevos, ya que durante las etapas finales de desarrollo de los ovocitos las células de la línea germinal liberan su contenido en el ovocito en crecimiento y las células somáticas de apoyo sufren apoptosis (Senti y Brennecke, 2010).

Existen otros mecanismos de control epigenético tales como la metilación que tienen un papel clave en el silenciamiento de retrotransposones LTR en plantas y vertebrados (Schumann et al., 2010; Slotkin y Martienssen, 2007), pero que carecen de tal función en muchas especies de invertebrados incluyendo, nematodos, *Drosophila*, y levaduras (Bowen y McDonald, 2001). En *Drosophila*, pese a que se ha encontrado metilaciones en muchas de sus especies, así como también en una gran variedad de otros insectos (Slotkin y Martienssen, 2007; Marhold et al., 2004; Lyko, 2001), existen muy bajos niveles de metilación del ADN en todos los estadios de su vida, excepto en el embrionario donde son altos

(Fontdevila, 2011, pág. 93). Estos bajos niveles hacen pensar que la metilación no es un mecanismo muy relevante en el control de los ETs en *Drosophila*.

Los altos niveles de expresión observados en el presente estudio, pueden ser el resultado de la relajación de dos sistemas de regulación de los ETs: piRNA y siRNA endógenos, dos tipos de pequeños ARNs claramente diferentes en cuanto a su tamaño (24 -29 y 21 nucleótidos, respectivamente), a las proteínas con las que se asocian (*piwi* frente a *Ago2*) y a las células en las que se expresan (preferentemente en células germinales en comparación con expresión ubicua) (Kim et al., 2009).

Si se considera que en los análisis de individuos completos se refleja, mayoritariamente, las tasas de expresión de *gypsy* y *bilbo* en la línea somática, es posible que las altas tasas de expresión estén determinadas por la desregulación del mecanismo de silenciamiento siRNA, ya que este sistema presenta una expresión más ubicua que la presentada por los piRNA, que se expresa preferentemente en células germinales (Kim et al., 2009). Aunque, también existen reportes de expresión de *piwi* en las células somáticas de los testículos en *Drosophila* (Nishida et al., 2007).

Las tasas globales de expresión observadas en la línea germinal no muestran diferencias importantes entre las poblaciones colonizadoras vs originales. No obstante, a nivel de sexos sí se observaron diferencias. En la línea germinal de los machos se observaron tasas de expresión muy altas, con respecto a las hembras, lo que hace suponer que las proteínas involucradas en la espermatogénesis se ven fuertemente afectadas quizás por los cambios de temperatura u otras condiciones ambientales. Dado que las poblaciones analizadas proceden de regiones geográficas diferentes sometidas a condiciones ambientales distintas, esto podría explicar los diferentes patrones de expresión observados en algunas poblaciones. El cambio en la configuración de las proteínas o el déficit de alguna de ellas afectarían la formación de los complejos de regulación que surgen de la unión de los piRNAs con proteínas que se expresan mayoritariamente en la línea germinal de los machos. En el caso particular de los machos, se ha observado una expresión preferencial de *Aub* y *AGO3* en los testículos (Senti y Brennecke, 2010), o de las

proteínas piwi que estarían involucradas en la regulación de ETs, como lo demuestra el estudio citado de Kalmykova et al. (2005).

De esta manera, si los mecanismos de regulación sufren este tipo de cambios podría desregularse el mecanismo de silenciamiento de los piRNA, por lo tanto, la transcripción de *gypsy* y *bilbo* en la línea germinal de los machos se realizaría sin ningún control. No obstante, su expresión también podría verse facilitada, posiblemente, por la expresión local de otros genes muy activos propios de la línea germinal de los machos. Estas circunstancias también estarían afectando la probabilidad de que una copia completa de *gypsy*, se reactive y, por ende, pueda insertarse en el genoma para intentar perpetuarse en él.

La desregulación de estos mecanismos de silenciamiento pueden deberse a factores estresantes: bióticos y/o abióticos con los que interactúan las poblaciones en su entorno natural. Dado que los elementos transponibles pueden causar mutaciones y rearrreglos cromosómicos, los mecanismos de regulación recuperarían su función de silenciar ETs, una vez haya desaparecido el factor estresante, manteniendo en equilibrio el genoma hospedador.

En el presente estudio se espera que la expresión, de estos elementos, en los individuos analizados, no esté influenciada por las condiciones de la captura y traslado en tubos con alimento sintético, así como tampoco, de las condiciones artificiales a las que son sometidas en el laboratorio para su mantenimiento. Para evitar, la posible influencia de factores estresantes durante la captura y traslado, no se analizaron los individuos recién traídos de la naturaleza, sino, los descendientes F<sub>1</sub> de cada una de las poblaciones analizadas. Pese a ello, no se puede descartar del todo que la tasas de expresión de los ETs en los individuos no se vea afectada por las condiciones de laboratorio. Hasta el momento no existen datos sobre las tasas de transposición de *gypsy* y *bilbo* en *D. subobscura*. Para tratar de indagar si las altas tasas de expresión observadas están asociadas a eventos de transposición, se realizó el estudio de la tasa de transposición del elemento *gypsy*.

### 4.3. Tasas de transposición del elemento *gypsy*

Las altas tasas de expresión observadas en *gypsy* (figura 15, 16 y 17), en el análisis de individuos completos, podrían indicar el surgimiento de nuevos eventos de transposición. Para comprobarlo se estudiaron las tasas de transposición de este elemento en poblaciones originales y colonizadoras de *D. subobscura*.

Los análisis de las tasas de transposición de las poblaciones colonizadoras vs. originales no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre estos grupos poblacionales (tabla 47). De esta manera, a nivel poblacional no se podría determinar que la colonización ejerza un posible efecto desestabilizador en la actividad de *gypsy* en el genoma de *D. subobscura*, ya que en realidad no se observan diferencias marcadas en el patrón de las tasas de transposición de *gypsy* entre las poblaciones originales y colonizadoras.

Aun así, el análisis de las tasas de transposición, de *gypsy* arrojó resultados interesantes en cuanto a la dinámica diferencial de inserción de este elemento en *D. subobscura*. *Gypsy* presenta un patrón muy marcado de transposición en machos, y no en hembras, en las poblaciones colonizadoras (tabla 43) y en menor medida en las originales (tabla 40). Así, en las colonizadoras se observó que, salvo la población de Santiago, todos los nuevos eventos de transposición se encontraban en los machos. Estos resultados corroboran lo previamente encontrado con los niveles de expresión que mostraban que en las gónadas *gypsy* se expresaba más en los machos que en las hembras (figuras 40 y 44), en la mayoría de las poblaciones analizadas.

En las poblaciones colonizadoras (tabla 43), Curicó es la que presenta el mayor número de nuevos eventos de transposición (tasa de  $10^{-2}$ ), todos en los machos (7 de los 11 observados entre todas las colonizadoras). Este patrón en las tasas de transposición es congruente con el observado en la línea germinal de los machos, en los cuales la tasa de expresión es muy alta, 9 veces más en los machos que en las hembras (9.02; figura 44). Sin embargo, la población con la tasa de expresión más alta en los machos con respecto a las hembras fue Santiago (18,38; figura 44); aun

así, en esta población sólo se observó un nuevo evento de transposición, pero en una hembra, con una tasa de transposición del orden de  $10^{-3}$  (tabla 43), lo cual sugiere que no hay siempre una correlación estrecha entre las tasa de expresión y la tasa de transposición.

Por otra parte, de las dos poblaciones originales analizadas, Aarhus es la que presenta, salvo una nueva inserción presente en Bellaterra (en un macho), todos los nuevos eventos de transposición: 2 en hembras y 3 en machos (tabla 40). Resultados que no difieren de lo observado a nivel de las tasas de expresión en la línea germinal (figura 40). Esta población no presentó diferencias marcadas entre machos vs hembras, siendo en los machos ligeramente más alta (1,39). En la población de Bellaterra no existen diferencias en la expresión a este mismo nivel de comparación (0,87).

Cuando se analizan los individuos completos, la población de Aarhus, al igual que Bellaterra, presentaron las mayores tasas de expresión (figura 15). Patrón que se mantuvo tanto en machos (figura 17) como en hembras (figura 13), siendo en éstas donde se observaron los incrementos más importantes (2.6 y 4.8; figura 15).

Dado que los análisis se realizaron a partir ADN de individuos completos, la deducción de que los nuevos eventos de inserción estarían presentes en la línea germinal se hace de manera indirecta, contando las bandas presentes en individuos  $F_1$  que no están presentes en los padres. De esta forma observaríamos en la  $F_1$  las transposiciones que se hayan producido en la línea germinal de los progenitores. No obstante, no se puede descartar de manera categórica, que nuevas inserciones puedan ocurrir en la línea somática en las primeras etapas del desarrollo. Después de todo las transposiciones en la línea somática no son eventos raros tal y como lo demuestran estudios del retrotransposon L1 en ratones y ratas (Beck et al., 2011). En los experimentos con elementos L1 artificiales, modificados de L1 de humanos, se observó que dichos elementos pueden transponerse durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, lo que sugiere que el mRNA de L1 puede transferirse de los gametos al cigoto para retrotransponerse posteriormente durante el desarrollo, generando mosaicismo

somático en la descendencia resultante (Beck et al., 2011). Dichos mosaicos también se han encontrado en humanos (Beck et al., 2011; Van den Hurk et al., 2007).

Por otra parte, en *Drosophila* se ha reportado que *gypsy* se encuentra mayoritariamente representado en la línea somática, como lo demuestran los trabajos realizados en las células epiteliales del folículo del ovario (Lécher et al., 1997) y en cromosomas politénicos en donde se observaron altas tasas de transposición bajo condiciones experimentales específicas (Kim y Belyaeva, 1991). No obstante, bajo estas mismas condiciones experimentales, existen reportes de la posible infección de la línea germinal por *gypsy* (Kim et al., 1994; Kim y Belyaeva, 1991).

En el presente trabajo, las hembras colonizadoras presentan tasas de expresión más altas que Bellaterra y Aarhus, mientras que en los machos no se observaron diferencias importantes. No obstante, en los análisis de individuos completos se observaron incrementos importantes, de más de tres veces, en las tasas de expresión tanto de machos como de hembras de las poblaciones colonizadoras con respecto a las poblaciones de Madeira, Bilbao y El Pedroso, pero estas poblaciones originales no se incluyeron en el análisis de las tasas de transposición por sus bajas tasas de expresión.

Es importante, para próximos estudios, calcular las tasas de transposición de las poblaciones de Madeira y Bilbao, ya que en la línea germinal fueron las dos poblaciones en las que *gypsy* presentó las tasas de expresión más altas entre las originales (figura 39, 40). En términos generales, se tendrían que incrementar el número de poblaciones originales en los análisis de las tasas de transposición con el fin de determinar si la distribución de las nuevas inserciones entre machos y hembras sigue el mismo patrón encontrado en la población de Aarhus.

En los análisis de la línea somática (análisis de individuo completos) *gypsy* presenta tasas de expresión muy bajas en los machos, mientras que en la línea germinal sucede el patrón contrario: altas tasas de expresión en los machos y no en las hembras. Podemos considerar que existe una mayor probabilidad de que los nuevos eventos de transposición observados en los machos estén presentes

únicamente en la línea germinal, lo que indicaría una correlación entre las altas tasas de expresión y las altas tasas de transposición en *gypsy*.

Las altas tasas de transposición *de gypsy* observadas en el presente estudio pueden ser el resultado de la inestabilidad de este elemento. Determinar con exactitud la causa de estas altas tasas de transposición es una tarea difícil de abordar, tal y como lo ha sido el determinar las tasas de transposición para el resto de elementos móviles desde su descubrimiento. Los factores que inducen la movilización de los ETs dentro de los genomas han sido objeto de estudio desde su descripción por Barbara McClintock en 1951 (McClintock, 1953). Se sabe que raras veces los ETs son inestables, su inestabilidad y posterior transposición puede estar asociada con características genéticas y fisiológicas, tales como: altas tasas de mutación, no disyunción, altas tasas de recombinación, rearrreglos cromosómicos, y esterilidad de machos y hembras (Labrador et al., 1999; Labrador, 1994; Kim et al., 1994; Mével Ninio et al., 1989). En *Drosophila*, este fenómeno es conocido como disgénesis híbrida (Moschetti et al., 2010; Labrador et al., 1999; Petrov et al., 1995; Biémont y Gautier 1987; Engels, 1983). Sin embargo, en el presente estudio el elemento y los cruces hermano–hermana de las diferentes poblaciones carecen de las características asociadas a este fenómeno.

Otros estudios, han demostrado que la endogamia podría ser una condición estresante, generadora de la inestabilidad genética que promueve la transposición, como, por ejemplo el trabajo realizado por Biémont y Aouar (1987), del elemento móvil *mdg1* en *D. melanogaster*. Sin embargo, también existe evidencia de que dicho efecto no se presenta sólo en este tipo de cepas, como lo reportado, años después por Labrador et al. (1999) con el transposon *Osvaldo* en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, así como en híbridos de estas especies. Los autores encontraron que la endogamia no incrementa la transposición y que era la hibridación interespecífica la que generaba tales incrementos en las tasas de transposición de *Osvaldo*.

En el presente estudio, es posible considerar un efecto de la endogamia sobre las altas tasas de transposición encontradas en Aarhus y Curicó ( $10^{-2}$ , tablas 40 y 43), ya que las cepas que se usaron en este análisis, fundadas con individuos recién traídos de la naturaleza, llevaban más de 20 generaciones en el laboratorio a una

temperatura constante de 18°C. Sin embargo, el efecto de la endogamia, de existir sobre las tasas de transposición de *gypsy*, aún sería incipiente, ya que no se observó un patrón de altas tasas de transposición en todas las familias analizadas de estas dos poblaciones. Las tasas de transposición observadas en el presente estudio, pueden considerarse mucho más altas que las tasas de transposición estimadas en algunas poblaciones de laboratorio y en poblaciones naturales; con un intervalo de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  por copia por generación en éstas (Labrador et al., 1998; Vieira y Biémont, 1997; Suh et al., 1995; Charlesworth y Langley, 1989). En general, los ETs presentan tasas de transposición y de escisión muy bajas. Comúnmente se acepta que la tasa de transposición es, en promedio,  $10^{-4}$  por elemento por genoma y generación o inferior (Labrador et al., 1999; Suh et al., 1995; Charlesworth y Langley, 1989). Sin embargo en otros trabajos se estimaron tasas de transposición cercanas a  $10^{-3}$  (Vieira y Biémont, 1997; Labrador y Fontdevila, 1994; Biémont y Aouar, 1987). Valores mayores únicamente se han reportado en la descendencia de cruzamientos entre ciertas cepas de *D. melanogaster*, por el fenómeno de disgénesis híbrida (Biémont y Aouar, 1987), y también en híbridos interespecíficos, por ejemplo en los híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koeferae* (Labrador et al., 1999).

Al igual que otros elementos transponibles, *gypsy*, se mueve con poca frecuencia y de manera impredecible en el genoma hospedador (Pélisson et al., 1994). Aún así, existen reportes de altas frecuencias de la transposición en, unas pocas, cepas específicas de *D. melanogaster* (Kim et al., 1994; Pélisson et al., 1994; Mével Ninio et al., 1989). En ellas, el gen *flamenco* (*flam*) ligado al cromosoma X del genoma hospedador, reprime no solo la transposición de *gypsy* sino también su expresión. (Pélisson et al., 1994). El efecto de *flamenco* en la expresión de *gypsy* está aparentemente restringido a las células somáticas foliculares que rodean la línea germinal materna (Pélisson et al., 1994). No obstante, en el presente estudio no podemos explicar las altas tasas de transposición por cruces entre cepas mutantes, ya que los datos aquí consignados y analizados no presentan mutaciones específicas, como las relacionadas en la mayoría de los estudios citados anteriormente.

Los factores que pueden conducir a la posible movilización de *gypsy* en *D. subobscura*, también pueden estar fuertemente determinados por la distribución de este elemento a lo largo del genoma de esta especie. Se sabe que la regulación de su expresión y actividad puede estar determinada en gran medida por la cepa de la que proceda (Pélisson et al., 1994; Kim et al., 1994; Mével Ninio et al., 1989) así como por las características de la cromatina en donde estén insertados a nivel del ADN, tal y como se ha descrito en *D. melanogaster* en donde se encuentra preferentemente insertado en la heterocromatina (Domínguez et al., 2012; Biémont et al., 1994).

Las copias de *gypsy* observadas en *D. subobscura* en el presente estudio, están insertadas mayoritariamente en la heterocromatina. No obstante, algunas de ellas son eucromáticas, de tal manera que las nuevas copias observadas en la F<sub>1</sub> podrían ser el resultado de inserciones de un elemento activo presente en ambas regiones cromosómicas. En *Drosophila*, algunos ETs presentes en la heterocromatina pueden ser movilizados (Biémont y Vieira, 2005; Jiang et al., 2002), y algunos de ellos pueden presentar secuencias intactas y estar completos (Biémont y Vieira, 2005; Kogan et al., 2003; Sun et al., 2003) y, por lo tanto, podrían ser reactivados. La inserción en la heterocromatina de una copia reciente activa procedente de la eucromatina implicaría que ésta estuviese desprovista de mutaciones dado que la acumulación de mutaciones a través del tiempo la inactivarían (Biémont y Vieira, 2005).

Considerar que las copias leídas a través de “transposon display” pueden corresponder mayoritariamente a inserciones presentes en la heterocromatina es válido, ya que en algunas familias se observaron una gran cantidad de copias en los parentales. En *Drosophila* existen reportes (García Guerreiro et al., 2008; Dimitri y Junakovic, 1999) de la acumulación de ETs en la heterocromatina de diferentes especies. En particular, en *D. melanogaster* en donde se encuentran clústeres de ETs insertados en la heterocromatina de los cromosomas sexuales y de los autosomas. La eucromatina, por el contrario, suele presentar un bajo número de copias ó ausencia de *gypsy*, así como de otros retrotransposones (Bowen y McDonald, 2001; Pimpinelli et al., 1995). Bowen y McDonald (2001) no

encontraron copias de *gypsy*, así como tampoco de los elementos *1731* y *Zam*, en la secuencia del genoma de *D. melanogaster*. De hecho, se ha reportado que *gypsy*, al igual que otros elementos, presenta menos de dos copias por genoma en las poblaciones naturales (Vieira et al., 1999). En el trabajo realizado por García Guerreiro et al. (2008) también se evidenció un bajo número de copias en la eucromatina, en los brazos de los cromosomas por individuo. Sin embargo, encontraron altas frecuencias de inserción de los ETs *gypsy* y *bilbo* en los brazos de los cromosomas de *D. subobscura*. Aunque, cabe puntualizar, que en comparación con *bilbo*, *gypsy* presentó una menor tasa de ocupación. En el trabajo realizado por Biémont et al. (1994) también encuentran bajo número de ETs en los brazos de los cromosomas por individuo de *D. melanogaster*, concluyendo que la forma en que el número de copias de TEs se encuentra en los genomas, depende tanto del elemento considerado, como de las diferentes fuerzas que actúan de forma simultánea, lo que indica que los modelos de la dinámica de TE deben incluir detalles de cada elemento.

En el presente trabajo las lecturas que se realizaron a través de la técnica del “transposon display”, no permite indagar sobre la localización exacta de las copias aquí observadas, pero en futuros trabajos se podría combinar otras técnicas que permitan aislar bandas específicas para ser secuenciadas y luego contrastadas con la secuencia completa del genoma de *D. subobscura* (genoma que aún se encuentra en un proceso incipiente de ensamblaje). Por el momento, la técnica de hibridación *in situ*, sigue siendo muy útil para la determinación de, por lo menos, la ubicación cromosómica de diferentes copias de *gypsy*, como también de *bilbo* y otros elementos, tal y como se realizó en la primera parte de este estudio.

Los resultados de este estudio no representan una evidencia de que el proceso de colonización afecte las tasas de transposición de *gypsy*, ya que no se observaron diferencias en estas tasas entre colonizadoras vs originales. Sin embargo, no podemos negar la total inexistencia del efecto de la colonización sobre la dinámica de los elementos transponibles en esta especie, ya que a nivel de las tasas de expresión si se observan diferencias, aunque principalmente en los análisis de individuos completos.

El estudio de Vieira et al. (1999) es un buen ejemplo de que el proceso de colonización puede afectar la dinámica de los ETs. Los autores encontraron que las poblaciones originales africanas de *D. melanogaster* presentaban una menor cantidad de ETs que en las poblaciones colonizadoras en otros continentes, sugiriendo que la adquisición y acumulación de ETs siguen los procesos de colonización de especies. Además, sugieren que con la colonización las especies encuentran nuevas condiciones ambientales capaces, probablemente, de activar los ETs, en el que ponen como ejemplo, con respecto al proceso de colonización mundial de *D. simulans*, la correlación que existe entre el número de copias del elemento 412 y la temperatura mínima en poblaciones naturales de esta especie. Los autores llegan a una importante conclusión: el número de inserciones de ETs es una característica propia de cada población más que de una especie como un todo, y esto es congruente con las diferencias encontradas en las tasas de expresión y transposición entre las poblaciones analizadas en el presente estudio.

La distribución de *bilbo* y *gypsy* en *D. subobscura*, está determinada por la deriva fundadora, como lo apuntan hasta el momento todas las evidencias. Sin embargo, la dinámica de la expresión y transposición de estos elementos en las poblaciones, también puede estar fuertemente determinado por los mecanismo de regulación mediados por iRNAs (piRNAs, siRNAs), y las proteínas con los que se asocian que, como ya se ha documentado, ejercen un fuerte control silenciando los ETs en el genoma de *Drosophila* y otros organismos, actuando como un mecanismo de protección en contra de elementos nocivos para el genoma hospedador.

Por otra parte, se sabe que las marcas epigenéticas suprimen la expresión de los ETs, y que pueden modificar la expresión de los genes adyacentes (Venner et al., 2009; Slotkin y Martienssen, 2007; Huang et al., 2004). Y que además, pueden estar sujetas a cambios dinámicos en respuesta a factores ambientales y estrés genético (Cam et al., 2008; Feschotte y Pritham., 2007; Biémont y Vieira, 2006; García Guerreiro y Fontdevila, 2001). No obstante, habría que estudiar si en *D. subobscura* la metilación juega un papel importante en el control de *gypsy* y *bilbo*, ya que en *Drosophila* los bajos niveles encontrados en varias especies (Fontdevila, 2011; Slotkin y Martienssen, 2007), hacen pensar que la metilación no es un mecanismo muy relevante en el control de los ETs. También existen reportes del

control epigenético que pueden ejercer las PIWI sobre los ETs (Kim et al., 2009; Nishida et al., 2007; Saito et al., 2006).

Los resultados de este estudio, abren la posibilidad de considerar la existencia de copias activas de *gypsy* en el genoma de *D. subobscura*, ya que se observaron nuevos eventos de transposición en la F<sub>1</sub> de todas las poblaciones analizadas. Estos resultados pueden apoyarse con las altas tasas de expresión observadas, especialmente, con las de la línea germinal en donde existe un fuerte sesgo de expresión y transposición en los machos.

Las razones de las altas tasas de expresión y de transposición de *gypsy* y *bilbo* en *Drosophila subobscura*, que se observaron en el presente estudio, están por resolver. Es posible que los elementos sean regulados por vías distintas a nivel de sexos, que los mecanismos de regulación se alteren o se dañen en respuesta a diferentes condiciones, que dichos mecanismos sean distintos para cada elemento y para cada tipo celular. También, puede estar involucrada la activación local de genes en la expresión de estos ETs, así como el proceso de colonización, seguida de la dinámica de las poblaciones ya establecidas y mediadas por la deriva genética. Muchos de estos procesos pueden estar involucrados al tiempo, ya que no tiene porque ser mutuamente excluyentes.

Este estudio es el primero que se realiza sobre las tasas de expresión y transposición en *D. subobscura* y abre todo un abanico de posibilidades para futuros estudios, que ya se vienen adelantando, como el estudio de la tasas de transposición de *bilbo*, cuyos datos están en proceso de análisis. Y el trabajo que se está realizando sobre la expresión de las familias Piwi en *D. subobscura*, como parte de un trabajo de Máster del laboratorio de Biología Evolutiva de la UAB (comunicación personal con la Dra. María del Pilar García Guerreiro).

## 5. CONCLUSIONES

*Gypsy10* es una copia de *gypsy* de alta frecuencia que no presenta codones stop en la ORF3, por tanto es posible que el elemento completo pueda codificar la proteína de la envoltura proteica (Env). Esta inserción probablemente corresponda a una inserción reciente ocurrida poco antes de la colonización

La deriva genética debido al efecto fundador es la responsable más probable de la alta frecuencia de *gypsy10* en el genoma de *Drosophila subobscura*.

*Gypsy1* y *bilbo12* son copias antiguas de los elementos que presentan secuencias incompletas y degeneradas, que no se encontraron en las poblaciones en estudio.

*Gypsy* presenta mayores tasas de expresión en las poblaciones colonizadoras frente a las originales de Madeira, El Pedroso y Bilbao, en los análisis de individuos completos.

Las poblaciones de Aarhus y Bellaterra no presentan diferentes tasas de expresión ni de *gypsy* ni de *bilbo*, y son a su vez las poblaciones originales que más se expresan con respecto a las colonizadoras en los análisis de individuos completos.

No existen diferencias marcadas entre los niveles de expresión de *gypsy* y *bilbo* entre las poblaciones colonizadoras. Las mayores diferencias se presentan entre las poblaciones originales, ambos en los análisis de individuos completos.

En términos generales *gypsy* presenta mayores tasas de expresión que *bilbo* en los análisis de individuos completos. Sin embargo, en la línea germinal *bilbo* presenta mayores tasas de expresión que *gypsy*.

A nivel de sexos, las tasas de expresión de *gypsy* son más altas en las hembras que en los machos tanto en las poblaciones colonizadoras como en las originales en los análisis de individuos completos, mientras que en la línea germinal son los machos los que presentan estas altas tasas de expresión.

*Bilbo* presenta mayores tasas de expresión en los machos con respecto a las hembras, tanto en los análisis de individuos completos como en la línea germinal.

En la línea germinal, tanto *gypsy* como *bilbo*, no presentaron una tendencia generalizada de mayores tasas de expresión en las colonizadoras vs las originales.

*Gypsy* no presenta diferencias en las tasas de transposición entre las poblaciones colonizadoras y originales.

Existen diferencias en las tasas de transposición a nivel de sexos: el mayor número de nuevos eventos de transposición se presentó en los machos de las poblaciones colonizadoras.

## BIBLIOGRAFIA

Abrusan, G., and H. J. Krambeck, 2006 Competition may determine the diversity of transposable elements. *Theor. Popul. Biol.* **70**: 364-375.

Alberola, T. M., and R. de Frutos, 1996 Molecular structure of a *gypsy* element of *Drosophila subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res.* **24**: 914-923.

Alberola, T. M., L. Bori and R. de Frutos, 1997 Structural analysis of *Drosophila subobscura gypsy* elements (*gypsyDs*). *Genetica* **100**: 39-48.

Arnault, C., A. Heizmann, C. Loevenbruck and C. Biéumont, 1991 Environmental stresses and mobilization of transposable elements in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **248**: 51-60.

Arnault, C., C. Loevenbruck and C. Biéumont, 1997 Transposable element mobilization is not induced by heat shocks in *Drosophila melanogaster*. *Naturwissenschaften* **84**: 410-414.

Ayala, F. J., L. Serra and A. Prevosti, 1989 A grand experiment in evolution: The *Drosophila subobscura* colonization of the americas. *Genome* **31**: 246-255.

Beck, C. R., J. L. Garcia-Perez, R. M. Badge and J. V. Moran, 2011 LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **12**: 187-215.

Beckenbach, A. T., and A. Prevosti, 1986 Colonization of north america by the european species, *Drosophila subobscura* and *D. ambigua*. *Am. Midl. Nat.* 10-18.

Bergman, C. M., H. Quesneville, D. Anxolabéhère and M. Ashburner, 2006 Recurrent insertion and duplication generate networks of transposable element sequences in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol.* **7**: R112.

Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon, 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

Biéumont, C., and A. Aouar, 1987 Copy-number dependent transpositions and excisions of the mdg-1 mobile element in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **58**: 39-47.

Biéumont, C., and C. Vieira, 2005 What transposable elements tell us about genome organization and evolution: The case of *Drosophila*. *Cytogenet. Genome Res.* **110**: 25-34.

Biéumont, C., and C. Vieira, 2006 Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**: 521-524.

Biémont, C., F. Lemeunier, M. Garcia Guerreiro, J. Brookfield, C. Gautier *et al*, 1994 Population dynamics of the copia, mdg1, mdg3, gypsy and P transposable elements in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* **63**: 197-212.

Bijlsma, R., and V. Loeschcke, 2005 Environmental stress, adaptation and evolution: An overview. *J. Evol. Biol.* **18**: 744-749.

Blesa, D., and M. J. Martinez-Sebastian, 1997 bilbo, a non-LTR retrotransposon of *Drosophila subobscura*: A clue to the evolution of LINE-like elements in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1145-1153.

Blesa, D., M. Gandía and M. J. Martínez-Sebastián, 2001 Distribution of the *bilbo* non-LTR retrotransposon in Drosophilidae and its evolution in the *Drosophila obscura* species group. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 585-592.

Blumenstiel, J. P., D. L. Hartl and E. R. Lozovsky, 2002 Patterns of insertion and deletion in contrasting chromatin domains. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2211-2225.

Bonaccorsi, S., M. Gatti, C. Pisano and A. Lohe, 1990 Transcription of a satellite DNA on twoY chromosome loops of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **99**: 260-266.

Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson, 2006 RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 1097-1101.

Bowen, N. J., and J. F. McDonald, 2001 *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside. *Genome Res.* **11**: 1527-1540.

Bownes, M., 1990 Preferential insertion of P elements into genes expressed in the germ-line of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 457-460.

Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis *et al*, 2007 Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**: 1089-1103.

Brennecke, J., C. D. Malone, A. A. Aravin, R. Sachidanandam, A. Stark *et al*, 2008 An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* **322**: 1387-1392.

Brncic, D., A. Prevosti, M. Budnik, M. Monclús and J. Ocaña, 1981 Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile I. first population and cytogenetic studies. *Genetica* **56**: 3-9.

Budnik, M., L. Cifuentes and D. Brncic, 1991 Quantitative analysis of genetic differentiation among european and chilean strains of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **67**: 29-33.

Bureau, T. E., and S. R. Wessler, 1992 *Tourist*: A large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell* **4**: 1283-1294.

Bureau, T. E., and S. R. Wessler, 1994 *Stowaway*: A new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell* **6**: 907-916.

Cam, H. P., K. Noma, H. Ebina, H. L. Levin and S. I. Grewal, 2008 Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins. *Nature* **451**: 431-436.

Capy, P., 2005 Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet. Genome Res.* **110**: 457-461.

Capy, P., G. Gasperi, C. Biémont and C. Bazin, 2000 Stress and transposable elements: Co-evolution or useful parasites? *Heredity* **85**: 101-106.

Chaboissier, M. C., A. Bucheton and D. J. Finnegan, 1998 Copy number control of a transposable element, the *I* factor, a LINE-like element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 11781-11785.

Chalvet, F., L. Teyssset, C. Terzian, N. Prud'homme, P. Santamaria *et al*, 1999 Proviral amplification of the *Gypsy* endogenous retrovirus of *Drosophila melanogaster* involves *env*-independent invasion of the female germline. *EMBO J.* **18**: 2659-2669.

Charlesworth, B., and C. H. Langley, 1989 The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 251-287.

Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan, 1994 The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**: 215-220.

Clare, J., and P. Farabaugh, 1985 Nucleotide sequence of a yeast *Ty* element: Evidence for an unusual mechanism of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 2829-2833.

Copenhaver, G. P., K. Nickel, T. Kuromori, M. Benito, S. Kaul *et al*, 1999 Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. *Science* **286**: 2468-2474.

Cordaux, R., and M. A. Batzer, 2009 The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 691-703.

Cost, G. J., and J. D. Boeke, 1998 Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the *L1* endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry* **37**: 18081-18093.

Coyne, J. A., 1989 Mutation rates in hybrids between sibling species of *Drosophila*. *Heredity (Edinb)* **63**: 155-162.

De Adjounian, M. F. Correa, H. Adjounian, S. H. Adjounian 2008 Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Arch.venez.farmacol.ter* **27**: 22-25.

Dimitri, P., and N. Junakovic, 1999 Revising the selfish DNA hypothesis: New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet.* **15**: 123-124.

Domingues, D. S., G. M. Cruz, C. J. Metcalfe, F. T. Nogueira, R. Vicentini *et al*, 2012 Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns. *BMC Genomics* **13**: 137.

Drosopoulou, E., D. Nestel, I. Nakou, I. Kounatidis, N. Papadopoulos *et al*, 2011 Cytogenetic analysis of the Ethiopian fruit fly *Dacus ciliatus* (diptera: Tephritidae). *Genetica* **139**: 723-732.

Eggleston, W. B., D. M. J. Schlitz and W. R. Engels, 1988 PM hybrid dysgenesis does not mobilize other transposable element families in *D. melanogaster*. *Nature* **331**: 368-370.

Eickbush, T. H., and V. K. Jamburuthugoda, 2008 The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res.* **134**: 221-234.

Engels, W. R., 1983 The P family of transposable elements in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **17**: 315-344.

Evgen'ev, M. B., H. Zelentsova, N. Shostak, M. Kozitsina, V. Barskyi *et al*, 1997 *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 196-201.

Evgen'ev, M. B., G. N. Yenikolopov, N. I. Peunova and Y. V. Ilyin, 1982 Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Chromosoma* **85**: 375-386.

Federoff, N., 2002 Control of mobile DNA, pp 907-1007 in *Mobile DNA II*, edited by N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, A. M. Lambowitz (eds) ASM Press, Washington, DC.

Feinberg, A. P., and B. Vogelstein, 1983 A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.

Fernandez Iriarte, P., J. Balanyà, M. Pascual, F. Mestres, E. Hasson *et al*, 2009 Tracking the origin of an invasive species: *Drosophila subobscura* in Argentina. *J. Evol. Biol.* **22**: 650-658.

Fernández Iriarte, P., W. Cespedes and M. Santos, 2003 Quantitative-genetic analysis of wing form and bilateral asymmetry in isochromosomal lines of *drosophila subobscura* using procrustes methods. *J. Genet.* **82**: 95-113.

Feschotte, C., and E. J. Pritham, 2007 DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* **41**: 331-368.

Feschotte, C., N. Jiang and S. R. Wessler, 2002 Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 329-341.

Finnegan, D. J., 1989 Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* **5**: 103-107.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver *et al*, 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fontanillas, P., D. L. Hartl and M. Reuter, 2007 Genome organization and gene expression shape the transposable element distribution in the *Drosophila melanogaster* euchromatin. *PLoS Genet.* **3**: e210.

Fontdevila, A., 2005 Hybrid genome evolution by transposition. *Cytogenet. Genome Res.* **110**: 49-55.

Fontdevila, A., 2011 *The Dynamic Genome: A Darwinian Approach*. OUP Oxford.

Fridell, R. A., A. Pret and L. L. Searles, 1990 A retrotransposon 412 insertion within an exon of the *Drosophila melanogaster* vermilion gene is spliced from the precursor RNA. *Genes Dev.* **4**: 559-566.

Fukui, T., Y. Inoue, M. Yamaguchi and M. Itoh, 2008 Genomic *P* elements content of a wild M'strain of *Drosophila melanogaster*: *KP* elements do not always function as type II repressor elements. *Genes Genet. Syst.* **83**: 67-75.

Garcia Guerreiro, M. P., 2012 What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity (Edinb)* **108**: 461-468.

Garcia Guerreiro, M. P., and A. Fontdevila, 2007 The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXVI. Molecular structural analysis of *Oswaldo* retrotransposon insertions in colonizing populations unveils drift effects in founder events. *Genetics* **175**: 301-310.

Garcia Guerreiro, M. P., and C. Biémont, 1995 Changes in the chromosomal insertion pattern of the copia element during the process of making chromosomes homozygous in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 206-211.

Garcia Guerreiro, M. P., B. E. Chavez-Sandoval, J. Balanya, L. Serra and A. Fontdevila, 2008 Distribution of the transposable elements *bilbo* and *gypsy* in original and colonizing populations of *Drosophila subobscura*. *BMC Evol. Biol.* **8**: 234.

García Guerreiro, M., and A. Fontdevila, 2001 Chromosomal distribution of the transposable elements *Oswaldo* and *blanco* in original and colonizer populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet. Res.* **77**: 227-238.

Georgiev, P. G., S. L. Kiselev, O. B. Simonova and T. I. Gerasimova, 1990 A novel transposition system in *Drosophila melanogaster* depending on the stalker mobile genetic element. *EMBO J.* **9**: 2037-2044.

Gonzalvo, N. S., 2006 *Control de la transposición e impacto de los elementos transponibles en genomas vegetales: análisis del retrotransposón Tnt1 de tabaco y del Mite Emigrant de Arabidopsis*. Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona.

Goodier, J. L., and H. H. Kazazian Jr, 2008 Retrotransposons revisited: The restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* **135**: 23-35.

Guerreiro, M. P., and A. Fontdevila, 2011 *Osveldo* and *Isis* retrotransposons as markers of the *Drosophila buzzatii* colonisation in Australia. *BMC Evol. Biol.* **11**: 111.

Hall, T. A., 1999 *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*.

Havecker, E. R., X. Gao and D. F. Voytas, 2004 The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol.* **5**: 225.

Huang, J., T. Fan, Q. Yan, H. Zhu, S. Fox *et al*, 2004 Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5019-5028.

Ichiyanagi, K., H. Nishihara, D. D. Duvernell and N. Okada, 2007 Acquisition of endonuclease specificity during evolution of L1 retrotransposon. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 2009-2015.

Jensen, P. A., J. R. Stuart, M. P. Goodpaster, J. W. Goodman and M. J. Simmons, 2008 Cytotype regulation of *P* transposable elements in *Drosophila melanogaster*: Repressor polypeptides or piRNAs? *Genetics* **179**: 1785-1793.

Jiang, N., Z. Bao, S. Temnykh, Z. Cheng, J. Jiang *et al*, 2002 Dasheng: A recently amplified nonautonomous long terminal repeat element that is a major component of pericentromeric regions in rice. *Genetics* **161**: 1293-1305.

Josefsson, C., B. Dilkes and L. Comai, 2006 Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology* **16**: 1322-1328.

Jurka, J., 2008 Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **65**: 201-204.

Kalmykova, A. I., M. S. Klenov and V. A. Gvozdev, 2005 Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* **33**: 2052-2059.

Kapitonov, V. V., and J. Jurka, 2001 Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 8714-8719.

Kidwell, M. G., and J. Kidwell, 1976 Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**: 333-351.

Kim, A. I., and E. S. Belyaeva, 1991 Transposition of mobile elements *gypsy* (mdg4) and *hobo* in germ-line and somatic cells of a genetically unstable mutator strain of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 437-444.

Kim, A., C. Terzian, P. Santamaria, A. Pelisson, N. Purd'homme *et al*, 1994 Retroviruses in invertebrates: The *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 1285-1289.

Kim, V. N., J. Han and M. C. Siomi, 2009 Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 126-139.

Kocincova, D., A. K. Singh, J. L. Beretti, H. Ren, D. Euphrasie *et al*, 2008 Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 390-398.

Kogan, G. L., A. V. Tulin, A. A. Aravin, Y. A. Abramov, A. I. Kalmykova *et al*, 2003 The *GATE* retrotransposon in *Drosophila melanogaster*: Mobility in heterochromatin and aspects of its expression in germline tissues. *Mol. Genet. Genomics* **269**: 234-242.

Koske, T., and J. M. Smith, 1954 Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. *Journal of Genetics* **52**: 521-541.

Krimbas, C., 1993 *Drosophila subobscura*: Biology. Genetics and Inversion Polymorphism (Verlag Dr.Kovac, Hamburg, Germany, 1993) .

Labrador, M., 1994 *Genética y evolución del AND medianamente repetitivo de Drosophila buzzatii*. Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona.

Labrador, M., and A. Fontdevila, 1994 High transposition rates of *Oswaldo*, a new *Drosophila buzzatii* retrotransposon. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 661-674.

Labrador, M., H. Naveira and A. Fontdevila, 1990 Genetic mapping of the *adh* locus in the *Repleta* group of *Drosophila* by in situ hybridization. *J. Hered.* **81**: 83-86.

Labrador, M., M. d. C. Seleme and A. Fontdevila, 1998 The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXIV. The distribution of the retrotransposon *Oswaldo* in original and colonizing populations. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1532-1547.

Labrador, M., M. Farré, F. Utzet and A. Fontdevila, 1999 Interspecific hybridization increases transposition rates of *Oswaldo*. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 931-937.

Langley, C. H., E. Montgomery, R. Hudson, N. Kaplan and B. Charlesworth, 1988 On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number. *Genet. Res.* **52**: 223-235.

Lankinen, P., and W. Pinsker, 1977 Allozyme constitution of two standard strains of *Drosophila subobscura*. *Experientia* **33**: 1301-1302.

Lecher, P., A. Bucheton and A. Pelisson, 1997 Expression of the *Drosophila* retrovirus *gypsy* as ultrastructurally detectable particles in the ovaries of flies carrying a permissive *flamenco* allele. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 9)**: 2379-2388.

Lee, Y. C., and C. H. Langley, 2010 Transposable elements in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**: 1219-1228.

Lewin, B., H. B. V. Zavallos and F. G. Roig, 2008 *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers Sudbury, MA.

Lim, A. K., and T. Kai, 2007 Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 6714-6719.

Liu, N., H. Han and P. Lasko, 2009 Vasa promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating *mei-P26* translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev.* **23**: 2742-2752.

López, M. C., M. Olivares, C. González, F. Martín, J. García Pérez *et al*, 1999 Elementos móviles: ¿ventaja evolutiva o parasitismo molecular? *Ars Pharm.* **40**: 5-24.

Lyko, F., 2001 DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.* **17**: 169-172

Lynch, M., 2007 *The origins of genome architecture*. IU, Bloomington.

Maisonhaute, C., D. Ogereau, A. Hua-Van and P. Capy, 2007 Amplification of the 1731 LTR retrotransposon in *Drosophila melanogaster* cultured cells: Origin of neocopies and impact on the genome. *Gene* **393**: 116-126.

Mallet, J., 2005 Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* **20**: 229-237.

Malone, C. D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W. R. McCombie *et al*, 2009 Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**: 522-535.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook, 1982 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.

Marhold, J., N. Rothe, A. Pauli, C. Mund, K. Kuehle *et al*, 2004 Conservation of DNA methylation in dipteran insects. *Insect Mol. Biol.* **13**: 117-123.

Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel and A. J. Matzke, 2009 RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 367-376.

McCarthy, E. M., and J. F. McDonald, 2004 Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome Biol.* **5**: R14-R14.

McClintock, B., 1953 Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics* **38**: 579-599.

Metcalfe, C. J., K. V. Bulazel, G. C. Ferreri, E. Schroeder-Reiter, G. Wanner *et al*, 2007 Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. *Genetics* **177**: 2507-2517.

Mével-Ninio, M., M. Mariol and M. Gans, 1989 Mobilization of the *gypsy* and *copia* retrotransposons in *Drosophila melanogaster* induces reversion of the *ovo<sup>D</sup>* dominant female-sterile mutations: Molecular analysis of revertant alleles. *EMBO J.* **8**: 1549-1558.

Michalak, P., 2010 An eruption of mobile elements in genomes of hybrid sunflowers. *Heredity* **104**: 329-330.

Miklos, G., M. Yamamoto, J. Davies and V. Pirrotta, 1988 Microcloning reveals a high frequency of repetitive sequences characteristic of chromosome 4 and the  $\beta$ -heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 2051-2055.

Mills, R. E., E. A. Bennett, R. C. Iskow and S. E. Devine, 2007 Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet.* **23**: 183-191.

Mills, R. E., E. A. Bennett, R. C. Iskow, C. T. Luttig, C. Tsui *et al*, 2006 Recently mobilized transposons in the human and chimpanzee genomes. *Am. J. Hum. Genet.* **78**: 671-679.

Momose, M., Y. Abe and Y. Ozeki, 2010 Miniature inverted-repeat transposable elements of *Stowaway* are active in potato. *Genetics* **186**: 59-66.

Morrish, T. A., J. L. Garcia-Perez, T. D. Stamato, G. E. Taccioli, J. Sekiguchi *et al*, 2007 Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* **446**: 208-212.

Moschetti, R., P. Dimitri, R. Caizzi and N. Junakovic, 2010 Genomic instability of I elements of *Drosophila melanogaster* in absence of dysgenic crosses. *PloS one* **5**: e13142.

Mount, S. M., and G. M. Rubin, 1985 Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element *copia*: Homology between *copia* and retroviral proteins. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1630-1638.

Muotri, A. R., M. C. Marchetto, N. G. Coufal and F. H. Gage, 2007 The necessary junk: New functions for transposable elements. *Hum. Mol. Genet.* **16 Spec No. 2**: R159-R167.

Muszewska, A., M. Hoffman-Sommer and M. Grynberg, 2011 LTR retrotransposons in fungi. *PloS one* **6**: e29425.

Nagel, M., T. Reuter, A. Jansen, C. Szekat and G. Bierbaum, 2011 Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**: 229-236.

Naito, K., E. Cho, G. Yang, M. A. Campbell, K. Yano *et al*, 2006 Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 17620-17625.

Naito, K., F. Zhang, T. Tsukiyama, H. Saito, C. N. Hancock *et al*, 2009 Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature* **461**: 1130-1134.

Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen, 1990 Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289.

Nishida, K. M., K. Saito, T. Mori, Y. Kawamura, T. Nagami-Okada *et al*, 2007 Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine-piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* **13**: 1911-1922.

Noor, M. A., and A. S. Chang, 2006 Evolutionary genetics: Jumping into a new species. *Curr. Biol.* **16**: R890-R892.

Nouri-Aria, K. T., 2008 In situ hybridization, pp. 331-347 in *Allergy Methods and Protocols*. Springer.

O'Neill, R. J. W., M. J. O'Neill and J. A. M. Graves, 1998 Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* **393**: 68-72.

Pantazidis, A., M. Labrador and A. Fontdevila, 1999 The retrotransposon *Oswaldo* from *Drosophila buzzatii* displays all structural features of a functional retrovirus. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 909-921.

Pardue, M. L., S. Rashkova, E. Casacuberta, P. G. DeBaryshe, J. A. George *et al*, 2005 Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res.* **13**: 443-453.

Pascual, M., M. Chapuis, F. Mestres, J. Balanya, R. Huey *et al*, 2007 Introduction history of *Drosophila subobscura* in the new world: A microsatellite-based survey using ABC methods. *Mol. Ecol.* **16**: 3069-3083.

Pasyukova, E. G., and S. V. Nuzhdin, 1993 *Doc* and *copia* instability in an isogenic *Drosophila melanogaster* stock. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 302-306.

Pasyukova, E., E. S. Belyaeva, L. Ilyinskaya and V. Gvozdev, 1988 Outcross-dependent transpositions of *copia-like* mobile genetic elements in chromosomes of an inbred *Drosophila melanogaster* stock. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 281-286.

Pelisson, A., S. U. Song, N. Prud'homme, P. A. Smith, A. Bucheton *et al*, 1994 Gypsy transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco* gene. *EMBO J.* **13**: 4401-4411.

Pereira, V., D. Enard and A. Eyre-Walker, 2009 The effect of transposable element insertions on gene expression evolution in rodents. *PLoS one* **4**: e4321.

Petrov, D. A., A. Fiston-Lavier, M. Lipatov, K. Lenkov and J. González, 2011 Population genomics of transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 1633-1644.

Petrov, D. A., and D. L. Hartl, 1997 Trash DNA is what gets thrown away: High rate of DNA loss in *Drosophila*. *Gene* **205**: 279-289.

Petrov, D. A., J. L. Schutzman, D. L. Hartl and E. R. Lozovskaya, 1995 Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 8050-8054.

Picard, G., J. C. Bregliano, A. Bucheton, J. M. Lavigne, A. Pelisson *et al*, 1978 Non-mendelian female sterility and hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* **32**: 275-287.

Pierce, B. A., 2010 *Genética: Un Enfoque Conceptual*. Ed. Médica Panamericana.

Pierce, D. A., and J. C. Lucchesi, 1981 Analysis of a dispersed repetitive DNA sequence in isogenic lines of *Drosophila*. *Chromosoma* **82**: 471-492.

Pimpinelli, S., M. Berloco, L. Fanti, P. Dimitri, S. Bonaccorsi *et al*, 1995 Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 3804-3808.

Prevosti, A., G. Ribo, L. Serra, M. Aguade, J. Balaña *et al*, 1988 Colonization of america by *Drosophila subobscura*: Experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 5597-5600.

Ratner, V. A., S. A. Zabanov, O. V. Kolesnikova and L. A. Vasilyeva, 1992 Induction of the mobile genetic element *dm-412* transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 5650-5654.

Rebollo, R., B. Horard, B. Hubert and C. Vieira, 2010 Jumping genes and epigenetics: Towards new species. *Gene* **454**: 1-7.

- Rebollo, R., E. Lerat, L. L. Kleine, C. Biemont and C. Vieira, 2008 Losing *helena*: The extinction of a drosophila line-like element. *BMC Genomics* **9**: 149.
- Rose, M. R., and W. F. Doolittle, 1983 Molecular biological mechanisms of speciation. *Science* **220**: 157-162.
- Russell, R. J., M. J. Healy and J. G. Oakeshott, 1992 Molecular analysis of the *lethal(1)B214* region at the base of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **101**: 456-466.
- Saito, K., K. M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi *et al*, 2006 Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* **20**: 2214-2222.
- Saito, K., Y. Sakaguchi, T. Suzuki, T. Suzuki, H. Siomi *et al*, 2007 Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* **21**: 1603-1608.
- Schumann, G. G., E. V. Gogvadze, M. Osanai-Futahashi, A. Kuroki, C. Münk *et al*, 2010 Unique functions of repetitive transcriptomes. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **285**: 115-188.
- Seberg, O., and G. Petersen, 2009 A unified classification system for eukaryotic transposable elements should reflect their phylogeny. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 276-276.
- Senti, K. A., and J. Brennecke, 2010 The piRNA pathway: A fly's perspective on the guardian of the genome. *Trends Genet.* **26**: 499-509.
- Shirasawa, K., H. Hirakawa, S. Tabata, M. Hasegawa, H. Kiyoshima *et al*, 2012 Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. *Theor. Appl. Genet.* **124**: 1429-1438.
- Sienski, G., D. Donertas and J. Brennecke, 2012 Transcriptional silencing of transposons by Piwi and Maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* **151**: 964-980.
- Siomi, M. C., K. Sato, D. Pezic and A. A. Aravin, 2011 PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 246-258.
- Slotkin, R. K., and R. Martienssen, 2007 Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 272-285.
- Song, S. U., M. Kurkulos, J. D. Boeke and V. G. Corces, 1997 Infection of the germ line by retroviral particles produced in the follicle cells: A possible mechanism for the mobilization of the *gypsy* retroelement of *Drosophila*. *Development* **124**: 2789-2798.

Song, S. U., T. Gerasimova, M. Kurkulos, J. D. Boeke and V. G. Corces, 1994 An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: Evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Genes Dev.* **8**: 2046-2057.

Strand, D. J., and J. F. McDonald, 1985 *Copia* is transcriptionally responsive to environmental stress. *Nucleic Acids Res.* **13**: 4401-4410.

Suh, D., E. Choi, T. Yamazaki and K. Harada, 1995 Studies on the transposition rates of mobile genetic elements in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 748-758.

Sun, C., D. B. Shepard, R. A. Chong, J. Lopez Arriaza, K. Hall *et al*, 2012 LTR retrotransposons contribute to genomic gigantism in Plethodontid salamanders. *Genome Biol. Evol.* **4**: 168-183.

Sun, X., H. D. Le, J. M. Wahlstrom and G. H. Karpen, 2003 Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res.* **13**: 182-194.

Thompson jr, James N. 1997. *Drosophila information service. Drosophila workers.* Department of Zoology University of Oklahoma Norman, Oklahoma. U.S.A. 73019. 80.

Timakov, B., X. Liu, I. Turgut and P. Zhang, 2002 Timing and targeting of *P*-element local transposition in the male germline cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**: 1011-1022.

Vagin, V. V., A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev *et al*, 2006 A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* **313**: 320-324.

van den Hurk, J. A., I. C. Meij, M. C. Seleme, H. Kano, K. Nikopoulos *et al*, 2007 L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 1587-1592.

Vela Peralta, D. J., 2012 *Estudio de la inestabilidad genómica inducida por transposición en los híbridos interespecíficos de Drosophila buzzatii y Drosophila koepferae.* Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona.

Venner, S., C. Feschotte and C. Biéumont, 2009 Dynamics of transposable elements: Towards a community ecology of the genome. *Trends Genet.* **25**: 317-323.

Vieira, C., and C. Biéumont, 1997 Transposition rate of the 412 retrotransposable element is independent of copy number in natural populations of *Drosophila simulans*. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 185-188.

Vieira, C., D. Lepetit, S. Dumont and C. Biéumont, 1999 Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1251-1255.

Vieira, C., P. Aubry, D. Lepetit and C. Biemont, 1998 A temperature cline in copy number for 412 but not roo/B104 retrotransposons in populations of *Drosophila simulans*. Proc. Biol. Sci. **265**: 1161-1165.

Volff, J. N., L. Bouneau, C. Ozouf-Costaz and C. Fischer, 2003 Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. Trends Genet. **19**: 674-678.

Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa *et al*, 2008 Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature **453**: 539-543.

Waugh, R., K. McLean, A. Flavell, S. Pearce, A. Kumar *et al*, 1997 Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol. Gen. Genet. **253**: 687-694.

Wendland, J., and A. Walther, 2011 Genome evolution in the *Eremothecium* clade of the *Saccharomyces* complex revealed by comparative genomics. G3 (Bethesda) **1**: 539-548.

Wessler, S. R., 2006 Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**: 17600-17601.

Wicker, T., F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy *et al*, 2007 A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat. Rev. Genet. **8**: 973-982.

Xing, J., H. Wang, V. P. Belancio, R. Cordaux, P. L. Deininger *et al*, 2006 Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**: 17608-17613.

Yamamoto, M., A. Mitchelson, M. Tudor, K. O'Hare, J. Davies *et al*, 1990 Molecular and cytogenetic analysis of the heterochromatin-euchromatin junction region of the *Drosophila melanogaster* X chromosome using cloned DNA sequences. Genetics **125**: 821.

Yannopoulos, G., N. Stamatis, M. Monastirioti, P. Hatzopoulos and C. Louis, 1987 Hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5 MRF. Cell **49**: 487-495.

Yin, H., and H. Lin, 2007 An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. Nature **450**: 304-308.

Zamore, P. D., 2007 RNA silencing: Genomic defence with a slice of pi. Nature **446**: 864-865.

Zampicinini, G., A. Blinov, P. Cervella, V. Guryev and G. Sella, 2004 Insertional polymorphism of a non-LTR mobile element (NLRcTh1) in european populations of

*Chironomus riparius* (diptera, chironomidae) as detected by transposon insertion display. *Genome* **47**: 1154-1163.

Zhimulev, I. F., 1999 Genetic organization of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* **39**: 1-589.

Zhimulev, I. F., E. S. Belyaeva, V. F. Semeshin, D. E. Koryakov, S. A. Demakov *et al*, 2004 Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. *Int. Rev. Cytol.* **241**: 203-275.

## ANEXOS

**Anexo 1: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Bellaterra.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	<b>P1-H181</b>	<b>P1-M182</b>	F <sub>1</sub> -H183	F <sub>1</sub> -H184	F <sub>1</sub> -H185	F <sub>1</sub> -H186	F <sub>1</sub> -H187	F <sub>1</sub> -M188	F <sub>1</sub> -M189	F <sub>1</sub> -M190	F <sub>1</sub> -M191	F <sub>1</sub> -M192
1	213	<b>1</b>	<b>0</b>	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1
2	246	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	302	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
4	347	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
5	385	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
6	437	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
7	460	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8	498	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	552	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
10	573	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
11	615	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
12	652	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
13	670	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
14	704	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
15	739	<b>1</b>	<b>1</b>	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
16	792	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
17	827	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
18	867	<b>1</b>	<b>1</b>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	886	<b>1</b>	<b>1</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	923	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	950	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
22	975	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
23	1.014	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
24	1.062	<b>1</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb*= pares de bases.

**Anexo 2: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Bellaterra.**

Nº banda	Tamaño (pb)	<b>P1-H193</b>	<b>P1-M194</b>	F1-H195	F1-H196	F1-H197	F1-H198	F1-H199	F1-M200	F1-M201	F1-M202	F1-M203	F1-M204
1	197	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
2	222	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
3	245	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
4	289	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
5	319	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
6	342	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
7	370	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
8	406	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
9	444	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
10	475	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
11	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	535	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13	579	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
14	617	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
15	666	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
16	751	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
17	959	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
18	982	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
19	1.075	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb*= pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 3: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Bellaterra.**

Nº banda	Tamaño (pb)	P1-H205	P1-M206	F1-H207	F1-H208	F1-H209	F1-H210	F1-H211	F1-M212	F1-M213	F1-M214	F1-M215	F1-M216
1	183	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	212	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	245	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
4	285	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
5	306	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
6	349	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
7	369	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	396	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
9	434	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
10	482	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
11	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	579	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
13	615	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
14	646	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
15	868	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16	958	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
17	1.009	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb*= pares de bases.

**Anexo 4: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de población de Aarhus.**

Nº banda	Tamaño (pb)	P1-H145	P1-M146	F1-H147	F1-H148	F1-H149	F1-H150	F1-H151	F1-M152	F1-M153	F1-M154	F1-M155	F1-M156
1	202	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	266	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
3	289	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
4	344	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	365	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
6	397	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
7	434	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
8	467	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
9	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	538	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
11	594	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
12	629	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
13	671	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	694	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
15	745	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
16	773	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
17	809	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
18	834	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
19	877	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
20	903	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
21	1.013	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb*= pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 5: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Aarhus.**

Nº banda	Tamaño (pb)	<b>P1-H157</b>	<b>P1-M158</b>	F1-H159	F1-H160	F1-H161	F1-H162	F1-H163	F1-M164	F1-M165	F1-M166	F1-M167	F1-M168
1	204	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
2	265	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
3	289	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	344	<b>1</b>	<b>1</b>	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
5	365	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
6	392	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	434	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
8	466	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
9	498	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	563	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
11	597	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
12	630	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
13	673	<b>1</b>	<b>1</b>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
14	701	<b>0</b>	<b>1</b>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
15	795	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
16	874	<b>1</b>	<b>0</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
17	920	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
18	1.018	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0	0	<b>1</b>
19	1.056	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1.096	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La regiones sombreadas corresponde a nuevas inserción.

**Anexo 6: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Aarhus.**

Nº banda	Tamaño (pb)	<b>P1-H169</b>	<b>P1-M170</b>	F1-H171	F1-H172	F1-H173	F1-H174	F1-H175	F1-M176	F1-M177	F1-M178	F1-M179	F1-M180
1	202	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2	261	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	289	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
4	365	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	404	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
6	450	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
7	466	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	498	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	548	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	570	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1
11	594	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	618	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
13	643	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
14	661	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
15	682	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
16	717	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
17	736	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
18	804	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
19	858	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
20	919	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
21	986	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
22	1.013	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb*= pares de bases.

**Anexo 7: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Puerto Montt.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	<b>P1-H109</b>	<b>P1-M110</b>	F1- H111	F1-H112	F1-H113	F1-H114	F1-H115	F1-M116	F1-M117	F1-M118	F1-M119	F1-M120
1	184	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
2	211	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	261	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
4	289	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
5	307	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
6	329	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
7	362	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
8	398	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
9	434	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
10	471	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
11	499	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	535	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	597	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
14	629	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
15	670	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
16	717	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
17	757	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
18	783	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	903	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 8: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Puerto Montt.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	<b>P1-H121</b>	<b>P1-M122</b>	F1-H123	F1-H124	F1-H125	F1-H126	F1-H127	F1-M128	F1-M129	F1-M130	F1-M131	F1-M132
1	203	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	246	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
3	306	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	335	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
5	393	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
6	434	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
7	471	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	499	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	535	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
10	597	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	617	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	663	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	751	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	810	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La región sombrada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 9: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Puerto Montt.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H133	P1-M134	F1-H135	F1-H136	F1-H137	F1-H138	F1-H139	F1-M140	F1-M141	F1-M142	F1-M143	F1-M144
1	180	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	203	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	246	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4	289	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
5	314	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
6	373	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
7	397	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
8	441	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
9	471	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
10	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	535	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	549	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
13	597	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
14	629	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
15	653	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16	678	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
17	705	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
18	745	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
19	818	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
20	846	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
21	892	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	926	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub> = descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 10: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Valdivia.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H1	P1-M2	F1-H3	F1- H4	F1- H5	F1-H6	F1-H7	F1- M8	F1- M9	F1- M10	F1- M11	F1- M12
1	260	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	306	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
3	357	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
4	397	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
5	434	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
6	471	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
7	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	548	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
9	599	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
10	629	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
11	701	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
12	751	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0
13	817	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
14	843	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0
15	1.029	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 11: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Valdivia.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H13	P1-M14	F1-H15	F1-H16	F1-H17	F1-H18	F1-H19	F1-M20	F1- M21	F1-M22	F1-M23	F1-M24
1	185	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
2	203	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	261	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
4	306	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
5	355	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
6	371	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	389	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
8	401	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
9	434	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	471	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
11	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	567	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
13	600	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
14	629	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
15	701	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
16	730	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
17	751	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
18	816	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 12: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Valdivia.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H25	P1-M26	F1-H27	F1-H28	F1-H29	F1-H30	F1-H31	F1-M32	F1-M33	F1-M34	F1-M35	F1-M36
1	203	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
2	246	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
3	314	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
4	369	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	401	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
6	434	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	471	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
8	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	600	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
10	669	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
11	701	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
12	751	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
13	819	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	865	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
15	914	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1.029	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 13: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Laja.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H217	P1-M218	F1-H219	F1-H220	F1-H221	F1-H222	F1-H223	F1-M224	F1-M225	F1-M226	F1-M227	F1-M228
1	245	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2	306	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	368	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
4	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	534	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
6	616	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
7	749	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
8	818	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
9	896	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 14: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Laja.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H229	P1-M230	F1-H231	F1-H232	F1-H233	F1-H234	F1-H235	F1-M236	F1-M237	F1-M238	F1-M239	F1-M240
1	202	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	245	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
3	306	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0
4	368	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
5	397	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	516	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
8	540	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	596	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
10	616	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
11	657	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	700	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
13	730	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
14	818	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	880	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 15: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Laja.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	<b>P1-H241</b>	<b>P1-M242</b>	F1-H243	F1-H244	F1-H245	F1-H246	F1-H247	F1-M248	F1-M249	F1-M250	F1-M251	F1-M252
1	202	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	245	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
3	289	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	314	<b>1</b>	<b>1</b>	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
5	359	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
6	397	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
7	434	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
8	471	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	498	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	517	<b>0</b>	<b>1</b>	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
11	548	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
12	568	<b>1</b>	<b>1</b>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
13	599	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	652	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0
15	701	<b>0</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16	730	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
17	751	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
18	786	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	817	<b>1</b>	<b>0</b>	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
20	889	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub> = descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde a una nueva inserción.

**Anexo 16: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Chillán.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H37	P1-M38	F1-H39	F1-H40	F1-H41	F1-H42	F1-H43	F1-M44	F1-M45	F1-M46	F1-M47	F1-M48
1	184	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
2	203	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
3	261	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
4	307	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	355	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
6	401	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
7	443	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
8	471	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
9	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	548	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
11	617	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	679	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	713	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
14	751	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
15	804	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
16	870	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
17	897	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
18	969	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 17: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Chillán.**

Nº banda	Tamaño (pb)	P <sub>1</sub> -H <sub>49</sub>	P <sub>1</sub> -M <sub>50</sub>	F <sub>1</sub> -H <sub>51</sub>	F <sub>1</sub> -H <sub>52</sub>	F <sub>1</sub> -H <sub>53</sub>	F <sub>1</sub> -H <sub>54</sub>	F <sub>1</sub> -H <sub>55</sub>	F <sub>1</sub> -M <sub>56</sub>	F <sub>1</sub> -M <sub>57</sub>	F <sub>1</sub> -M <sub>58</sub>	F <sub>1</sub> -M <sub>59</sub>	F <sub>1</sub> -M <sub>60</sub>
1	190	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
2	260	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
3	306	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
4	369	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
5	397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	434	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
7	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	548	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0
9	568	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
10	600	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
11	688	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
12	758	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
13	817	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
14	896	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 18: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Chillán.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H61	P1-M62	F1-H63	F1-H64	F1-H65	F1-H66	F1-H67	F1-M68	F1-M69	F1-M70	F1-M71	F1-M72
1	203	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	261	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
3	292	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
4	314	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
5	361	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	397	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
7	430	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	471	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
9	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	548	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
11	597	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	643	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
13	666	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
14	817	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub> = descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 19: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Curicó.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H253	P1-M254	F1-H255	F1-H256	F1-H257	F1-H258	F1-H259	F1-M260	F1-M261	F1-M262	F1-M263	F1-M264
1	202	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
2	245	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
3	306	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4	368	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
5	401	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
6	427	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
7	471	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	517	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
10	540	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
11	597	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	617	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
13	629	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
14	666	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
15	749	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	871	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
17	896	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
18	1.028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 20: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Curicó.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H265	P1-M266	F1-H267	F1-H268	F1-H269	F1-H270	F1-H271	F1-M272	F1-M273	F1-M274	F1-M275	F1-M276
1	218	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
2	246	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
3	271	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
4	306	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
5	368	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
6	456	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
7	498	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
8	599	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
9	617	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1
10	658	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0
11	701	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
12	751	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
13	818	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
14	864	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	0
15	896	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La regiones sombradas corresponde a nuevas inserción.

**Anexo 21: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Curicó.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	<b>P1-H277</b>	<b>P1-M278</b>	F1-H279	F1-H280	F1-H281	F1-H282	F1-H283	F1-M284	F1-M285	F1-M286	F1-M287	F1-M288
1	205	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
2	245	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
3	292	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	357	<b>0</b>	<b>1</b>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
5	408	<b>1</b>	<b>0</b>	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
6	450	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>1</b>
7	498	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	526	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>0</b>
9	562	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
10	599	<b>1</b>	<b>0</b>	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
11	666	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	749	<b>1</b>	<b>1</b>	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
13	818	<b>0</b>	<b>1</b>	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases. Nota: La regiones sombradas corresponde a nuevas inserción.

**Anexo 22: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 1 de la población de Santiago.**

Nº banda	Tamaño ( <i>pb</i> )	P1-H73	P1-M74	F1- H75	F1-H76	F1-H77	F1-H78	F1-H79	F1-M80	F1-M81	F1- M82	F1-M83	F1-M84
1	202	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	245	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
3	291	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	334	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	368	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
6	397	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
7	434	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
8	471	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
9	498	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
10	548	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	599	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
12	666	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
13	751	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	817	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
15	896	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; *pb* = pares de bases.

**Anexo 23: Relación del número y tamaño (*pb*) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 2 de la población de Santiago.**

Nº banda	Tamaño (pb)	P1-H85	P1-M86	F1-H87	F1-H88	F1-H89	F1-H90	F1-H91	F1-M92	F1-M93	F1-M94	F1-M95	F1-M96
1	185	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
2	260	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
3	289	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
4	319	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	361	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
6	396	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
7	471	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
8	498	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	534	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	597	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	616	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	817	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; pb = pares de bases. Nota: La región sombreada corresponde una nueva inserción.

**Anexo 24: Relación del número y tamaño (pb) de inserciones de *gypsy* encontradas, por individuo, en la familia 3 de la población de Santiago.**

Nº banda	Tamaño (pb)	P1-H97	P1-M98	F1-H99	F1-H100	F1-H101	F1-H102	F1-H103	F1-M104	F1-M105	F1-M106	F1-M107	F1-M108
1	203	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
2	254	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
3	306	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	362	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
5	401	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
6	441	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
7	471	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	499	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	548	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	634	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
11	666	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	737	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

P<sub>1</sub> = parentales; F<sub>1</sub>= descendientes de la primera generación; H = hembras; M = Machos; pb = pares de bases.