



PRACTICA DE LABORATORIO:

MAPA DE TRES GENES LIGADO AL CROMOSOMA EN DROSOPHILA

Por: Margarita Zuleta B. (1)

INTRODUCCION

Con el descubrimiento de la existencia de más genes que cromosoma, se llegó a la conclusión de que cada cromosoma debe contener muchos genes. Por lo tanto se espera que los genes localizados en un mismo cromosoma se transmitan ligados de una generación a otra como un único grupo y a éste se le llamó grupo de ligamiento. Es así como cada par de cromosomas constituye un grupo de ligamiento y deben existir tantos grupos como pares de cromosomas homólogos tenga una especie (Ej: 4 grupos de ligamiento en *Drosophila melanogaster*, puesto que tiene 4 pares de cromosomas; 23 grupos de ligamiento en humanos).

Pero no siempre los genes ligados a uno de los cromosomas homólogos se transmiten juntos. Esto se debe a la ocurrencia de entrecruzamiento entre ellos o sea intercambio de porciones cromosómicas que conduce a la transferencia de genes de un cromosoma homólogo al otro. Esto produce nuevas combinaciones entre los genes ligados a un cromosoma aunque, en este caso, la recombinación no es independiente.

T. H. Morgan, en 1911, postuló que la frecuencia de entrecruzamiento entre dos genes ligados depende de la distancia entre ellos. A mayor distancia entre dos genes, más frecuencia de entrecruzamiento y recombinación se producirá entre ellos y en consecuencia se consideran menos ligados ya que pueden separarse más fácilmente. Por lo tanto, la distancia

entre dos genes se puede estimar utilizando como medida, la frecuencia de entrecruzamiento entre ellos. En este caso la unidad de distancia entre dos genes, llamada también unidad morgan, es igual al 1/o de entrecruzamiento.

El entrecruzamiento se reconoce a través de las nuevas clases recombinadas. Los cromosomas que no sufren entrecruzamiento pasan a los hijos con las combinaciones parentales. Esto puede observarse en la figura 1.

El postulado de Morgan dió origen a la teoría del arreglo lineal de los genes en los cromosomas y permitió la construcción de mapas genéticos o mapas de ligamiento, que consisten en ordenar linealmente los genes en el cromosoma, utilizando como medida de distancia, la frecuencia de entrecruzamiento entre los genes.

En los machos de *Drosophila*, normalmente no ocurre entrecruzamiento, así que los mapas de ligamiento en este organismo se basan únicamente en la frecuencia de entrecruzamiento ocurrido en las hembras heterocigóticas.

INTERFERENCIA Y COINCIDENCIA

Si el entrecruzamiento en un punto del cromosoma, por ejemplo en la región 1, fuera independiente del entrecruzamiento en la región adyacente, por ejemplo la región 2, la probabilidad de "doble entrecruzamiento" (uno en la región 1 y otro en la región 2), sería igual al producto de

(1) Profesora Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, S.A.

multiplicar la frecuencia de entrecruzamiento en la región 1 por la frecuencia de entrecruzamiento en la región 2. En el ejemplo que se ilustra a continuación (figura 2), la probabilidad de *doble entrecruzamiento* uno en la región 1 y el otro en la región 2, sería igual a $(0.20) \times (0.14) = 0.028$, lo que equivale a 2.8o/o.

Sin embargo, se observa que el doble entrecruzamiento ocurre con menos frecuencia que la esperada. Esto se debe a que existe *interferencia cromosómica*, o sea que la ocurrencia de entrecruzamiento en una región disminuye el entrecruzamiento simultáneo en la región adyacente.

Para medir la interferencia se utiliza el coeficiente de coincidencia, el cual se busca dividiendo la frecuencia observada de doble entrecruzamiento por la frecuencia esperada de doble entrecruzamiento.

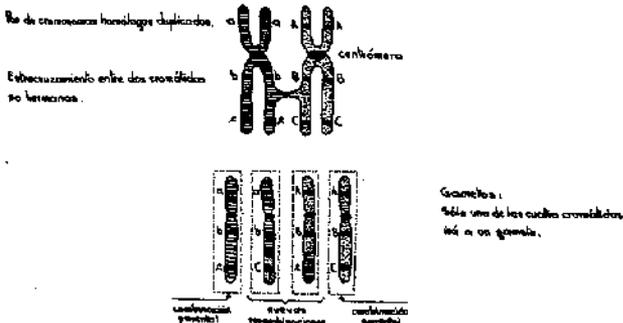


FIGURA 1. El entrecruzamiento entre los genes B-C separa el gen C de la combinación parental y origina nuevas recombinaciones.

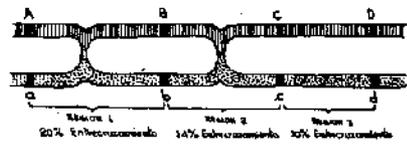


FIGURA 2. Ocurrencia de doble entrecruzamiento.

$$\text{Coincidencia} = \frac{\text{No. doble entrecruzamiento observado}}{\text{No. doble entrecruzamiento esperado}}$$

$$\text{Interferencia} = 1 - \text{Coincidencia}$$

Se ha encontrado que la interferencia se presenta en relación inversa a las distancias entre los genes, esto es, a menor distancia entre dos genes, mayor interferencia. La coincidencia va de 1 a 0. A mayor coincidencia, menor interferencia.

OBJETIVOS DEL LABORATORIO

A. Demostrar experimentalmente que los genes ligados no se recombinan independientemente.

- B. Distinguir experimentalmente las clases parentales de las recombinantes.
- C. Con base en la frecuencia de recombinación observada, medir las distancias entre varios pares de genes.
- D. Estimar experimentalmente la interferencia en regiones cromosómicas adyacentes.

MATERIALES

- Cepa de *Drosophila melanogaster* con todos sus genes normales.
- Cepas de *Drosophila melanogaster* con las siguientes mutaciones en el cromosoma X: ojos blancos (w); crossveinless, o sin venas transversales en las alas (cv); forked o con quetas recortadas (f).
- Cuartos de litro o frascos pequeños con una longitud aproximada de 9 cm y diámetro de 3 cm.
- Pincel No. cero, de punta muy delgada.
- Estereo microscopio.
- Una cartulina de 8 cm x 16 cm.

(Para las instrucciones relacionadas con el manejo de la *Drosophila* y preparación de alimentos consultar a Moreno, J. y M. Zuleta, 1975).

PROCEDIMIENTO

CRUCE P₁ x P₁

$$\frac{w \quad cv \quad f}{w \quad cv \quad f} \quad 5 \text{ ♀} \times 5 \text{ ♂} \quad \frac{+ \quad + \quad +}{\text{muy}}$$

Fecha _____

Para hacer este cruce, se toman 5 hembras vírgenes homocigóticas para ojos blancos (w), crossveinless (cv) y forked (f), y se cruzan con 5 machos jóvenes silvestres. El cruce consiste en colocar los machos y las hembras vírgenes juntos en un frasco con alimento fresco.

Rotular los frascos con la fecha y los fenotipos de los padres.

Después de una semana se matan los padres.

CRUCE F₁ x F₁

$$\frac{w \quad cv \quad f}{+ \quad + \quad +} \quad 15 \text{ ♀} \times 15 \text{ ♂} \quad \frac{w \quad cv \quad f}{\text{muy}}$$

Fecha: _____

A los 15 días de iniciado el cruce P₁, cuando haya suficiente número de F₁, se cruzan 15 ♀ F₁ con 15 ♂ F₁ en un cuarto de litro.

Rotular los frascos con la fecha y los genotipos de los padres.

Este cruce se entrega a los estudiantes.

Después de unos 6 a 8 días de iniciado este segundo cruce, saque los padres, obsérvelos al microscopio de disección, compare cada característica mutada con la normal y mate los padres machos. Transfiere cada 4 días las madres a un nuevo frasco con alimento. Esto con el fin de obtener suficiente número de hijos de la F₂, aproximadamente 1.000.

Contaje de la F₂

Después de 12 a 14 días de iniciado el cruce F₁ x F₁ se empieza a contar diariamente los hijos F₂. El contaje puede continuar hasta que el cruce ajuste 17 días y puede hacerse con cada uno de los frascos en los que transfirió las madres F₁.

Clasifique todos los hijos F₂ de acuerdo con el fenotipo y el sexo. Anote el número encontrado de cada fenotipo en las casillas correspondientes de la tabla. Debe contar un número mínimo de 300 moscas F₂ pero, si le es posible, cuente hasta 1000 hijos.

Nota: Para facilitar la comprensión del informe, se anotaron en la tabla de conteo los resultados de un experimento.

INFORME

I. RESULTADOS

- Presente los resultados en la tabla de conteo, en la cual debe aparecer el número total de cada una de las clases fenotípicas observadas en la F₂.
- Con base en los datos observados calcule lo siguiente:
 - Frecuencia relativa de las dos clases fenotípicas parentales.
 - Frecuencia relativa de los dos fenotipos producidos por un solo entrecruzamiento en la región 1. (En el ejemplo, esta frecuencia es igual a 11.6o/o).
 - Frecuencia relativa de los fenotipos recíprocos producidos por un sólo entrecruzamiento en la región 2.
 - Frecuencia relativa de los fenotipos recíprocos producidos por doble entrecruzamiento (uno en la región 1 y el otro en la región 2). (En el ejemplo, esta frecuencia es igual a 2.4o/o).

Anote estas frecuencias en la tabla de conteo, en la columna correspondiente.

II. ANALISIS Y CONCLUSIONES

- Cuál de las observaciones en este experimento indica que los 3 pares de genes con los que se trabajó, están ligados?

- Aplique el test de significancia X² para demostrar que los resultados observados en este experimento *no están de acuerdo* con la hipótesis de que estos 3 pares de genes segregan independientemente. (Cuando se supone que los pares de genes segregan independientemente se espera que las combinaciones fenotípicas posibles aparezcan con igual frecuencia).

$$\text{Fórmula de } X^2 = \sum \left[\frac{(\text{No. obs} - \text{No. esp})^2}{\text{No. esp.}} \right]$$

En el ejemplo que aparece en la Tabla de conteo el X² tiene el siguiente valor:

$$\begin{aligned} X^2 = & \frac{(383 - 206.5)^2}{206.5} + \frac{(387 - 206.5)^2}{206.5} + \frac{(94 - 206.5)^2}{206.5} \\ & + \frac{(98 - 206.5)^2}{206.5} + \frac{(329 - 206.5)^2}{206.5} + \frac{(321 - 206.5)^2}{206.5} \\ & + \frac{(18 - 206.5)^2}{206.5} + \frac{(22 - 206.5)^2}{206.5} \end{aligned}$$

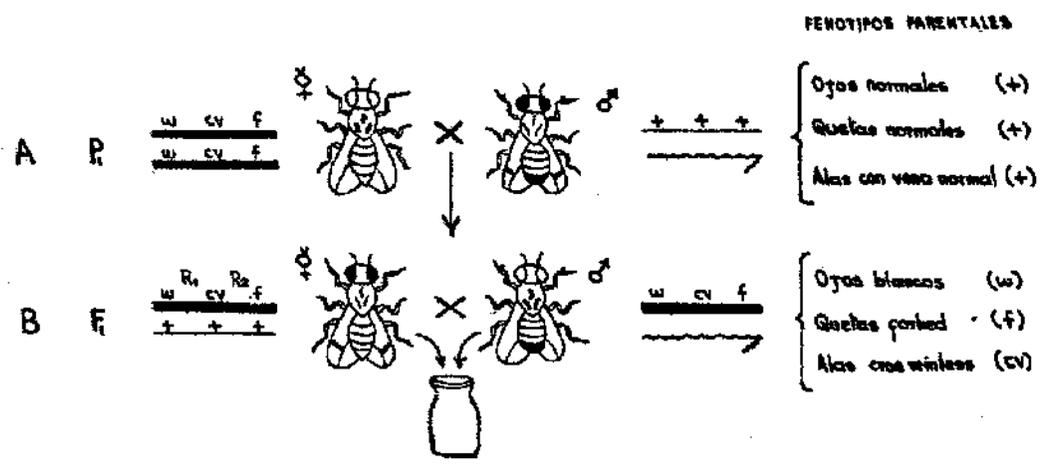
$$\text{Valor de } X^2 = 900; \text{ Grados de Libertad} = 7; \text{ P} = \text{tiende a cero.}$$

III. CONSTRUCCION DEL MAPA.

- Establezca las distancias entre los diferentes pares de genes. Utilice el porcentaje de recombinación como medida de distancia. El análisis de recombinación se hace considerando de a dos genes que limiten una región, sin tener en cuenta los demás genes. Detalle los sumandos utilizados para encontrar cada distancia.

En el ejemplo dado se obtienen los siguientes datos:

- Frecuencia de recombinación entre (w) y (cv):



	COMBINACIONES FENOTIPICAS	GENOTIPO ♀	Número de ♀	GENOTIPO ♂	Número de ♂	TOTAL	%
Parentales sin Entrecruzamiento	 ojos (w) quetlas (f) alae (cv)	$\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	190	$\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$ ~~~~~	193	383	46.6%
	 ojos (+) quetlas (+) alae (+)	$\frac{+}{+} \frac{+}{+} \frac{+}{+}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	195	$\frac{+}{+} \frac{+}{+} \frac{+}{+}$ ~~~~~	192	387	
Simple Entrecruzamiento en R ₁	 ojos (+) quetlas (f) alae (cv)	$\frac{+}{+} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	45	$\frac{+}{+} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$ ~~~~~	49	94	11.6%
	 ojos (w) quetlas (+) alae (+)	$\frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{+}{+}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	80	$\frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{+}{+}$ ~~~~~	48	98	
Simple Entrecruzamiento en R ₂	 ojos (+) quetlas (f) alae (+)	$\frac{+}{+} \frac{+}{+} \frac{f}{f}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	166	$\frac{+}{+} \frac{+}{+} \frac{f}{f}$ ~~~~~	163	329	39.4%
	 ojos (w) quetlas (+) alae (cv)	$\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$	162	$\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$ ~~~~~	159	321	
Doble Entrecruzamiento R ₁ y R ₂	 ojos (+) quetlas (f) alae (+)	$\frac{+}{+} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$	8	$\frac{+}{+} \frac{cv}{cv} \frac{+}{+}$ ~~~~~	10	18	2.4%
	 ojos (w) quetlas (f) alae (+)	$\frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{f}{f}$ $\frac{w}{w} \frac{cv}{cv} \frac{f}{f}$	13	$\frac{w}{w} \frac{+}{+} \frac{f}{f}$ ~~~~~	9	22	
TOTAL			829		823	1.652	100%

FIGURA 3. Representación de las ocho combinaciones fenotípicas y genotípicas de los hijos del cruce B. Se anota el número observado de cada tipo de hijos.



$$(94 + 98 + 18 + 22) \cdot \frac{232}{1652} = 0.14$$

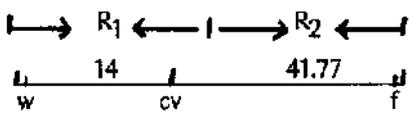
(sume las moscas que presenten ojos (w) y alas (+) u ojos (+) y alas (cv).)

— Frecuencia de recombinación entre (cv) y (f):

$$(329 + 321 + 18 + 22) \cdot \frac{690}{1652} = 0.4177$$

(sume todas las moscas con ojos (w) y quetas (+) u ojos (+) y quetas (f).)

2. Ordene los genes linealmente con base en las distancias encontradas. (En los dos extremos debe colocar los genes entre los cuales haya ocurrido más frecuencia de recombinación.



NOTE que la frecuencia de recombinación observada entre los dos genes más distantes no es igual a la suma de la frecuencia de recombinación en la región 1 más la frecuencia de recombinación en región 2.

Esto se debe a que no se sumó la frecuencia de doble entrecruzamiento ocurrida entre (w) y (f) por no haberse observado recombinación entre dichos genes. Para hacer la corrección agregue dos veces la frecuencia de doble entrecruzamiento a la frecuencia de recombinación observada por un solo entrecruzamiento. Ej: $0.51 + 2(0.024) = 0.558$

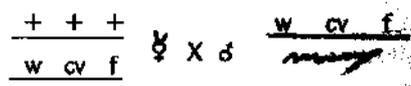
3. Calcule el coeficiente de coincidencia y la interferencia entre los dos genes (w) y (f)

Coincidencia =

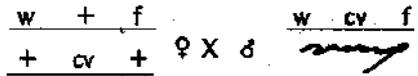
Interferencia =

IV. PREGUNTAS

De acuerdo con sus resultados y conclusiones, repetir el cruce que aparece a continuación:



1. ¿Cuál es la probabilidad de tener hijos (machos o hembras) del fenotipo ojos blancos, alas crossveinless, quetas forked?
2. ¿Cuál es la probabilidad de tener machos silvestres para los tres genes?
3. De un total de 1.000 descendientes, a) cuál sería el número esperado con ojos blancos, alas normales y quetas normales? b) Cuál sería el número esperado con ojos blancos, alas normales y quetas forked?
4. Si se hace el cruce



- a. ¿Cuál es la probabilidad de obtener descendientes con ojos blancos?
- b. ¿Cuáles tipos de hijos serán los menos posibles?

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a la Profesora Amparo Ochoa por la elaboración de las Figuras que aparecen en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Strickberger, MW. (1978). Ligamento, Recombinación y Mapa genético de Diploides. Genética, pp 313-365. Ediciones Omega.

Moreno, J. y M. Zuleta. (1973). Técnicas empleadas en el manejo de la Drosophila. Actualidades Biológicas. Vol. 2 No. 4. pp. 46-49.