

UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

**TESIS DOCTORAL
ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO Y MOLECULAR
DEL ADN REPETITIVO EN ANFIBIOS**

**PRESENTADA POR:
KATERINA GUZMAN**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. MÓNICA BULLEJOS MARTÍN**

JAÉN, 25 DE SEPTIEMBRE DE 2017

ISBN 978-84-9159-329-4

El presente trabajo se ha realizado en el Área de Genética del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén.

Parte de los resultados de este trabajo se han presentado en los siguientes congresos y seminarios:

VII Seminario de Citogenética: Vigo (España) 27-30 Jun. 2012. "Conference on Cytogenetic and molecular analysis of a satellite DNA family, BamHI-800, in several species of the family Bufonidae" Autores: Guzmán K, Roco A, Bullejos M.

XXXVIII Congreso SEG-2011 (Sociedad Española de Genética) Murcia (España) 21-23 Sept. 2011

“Caracterización de una nueva familia de ADN satélite (BamHI-800) en la familia *Bufonidae*” Autores: Guzmán K., Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“Caracterización de una nueva familia de ADN satélite (BamHI-210) en el género *Bufo*” Autores: Guzmán K., Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“Caracterización de un nuevo ADN satélite (AluI-300) en la especie *Bufo bufo*” Autores: Martínez-Padilla A, Guzmán K., Roco A, Bullejos M.

XVIII International Chromosome Conference 29 Aug-2 Sept 2011 Manchester U.K.

“Characterization of a novel satellite DNA in the family *Bufonidae*” Autores: Guzmán K, Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“Characterization of a new satellite DNA family in *Bufo bufo*” Autores: Martínez-Padilla A, Guzmán K, Roco A, Bullejos M.

IV Seminario de Citogenética Córdoba (España) 29 Sep-2 oct. 2010. "En busca de los cromosomas sexuales de *X. tropicalis* y *B. bufo*". Autores: Roco A, Guzmán K, Martínez-Padilla A, Bullejos M.

La doctoranda ha disfrutado de un contrato de técnico investigador licenciado asociado al Proyecto: “Alteraciones en el Desarrollo testicular asociadas al Síndrome de Down y su relación con su elevada frecuencia de tumores de células germinales: estudio de modelos murinos de Síndrome de Down” (P07-CVI-02486 FEDER (PAIDI 2007-2013) Universidad de Jaén. Responsable del Proyecto: Mónica Bullejos Martín). También ha disfrutado de una beca EMBO Short-Term Fellowship concedida por European Molecular Biology Organization, que le ha permitido la

realización de una estancia de 3 meses en el laboratorio de la Dra Ruth Massey en la Universidad de Bath en Reino Unido.

Este trabajo se ha financiado con dos proyectos concedidos por Ministerio de Educación y Ciencia/Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto BFU2006-01969/BFI y CGL2009-08894), cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional; y por la Junta de Andalucía, a través del programa de “Ayudas a Grupos de Investigación” (BIO-220).

Una rana es muy útil. Te ves obligado a simplificar extremadamente el mundo para que te comprenda y, a veces, eso alivia.

Fred Vargas "Más allá, a la derecha"

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento:

A todos los colaboradores de este trabajo: Rosanna Falconi, Dagmar Wilhelm, Francesco Zaccanti, Matthias Stöck y Enrique García-Muñoz, por el material proporcionado.

A la directora de esta investigación, Dra. Mónica Bullejos, por la orientación, el seguimiento y la supervisión de la misma, por haberme dado ejemplos dignos de superación y entrega, y, sobre todo, por enseñarme como es “el mundo de la ciencia” y porque gracias a ella, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

A todo el personal del Departamento de Biología Experimental, por su ayuda directa o indirecta. Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de los profesores Dr. Pedro Lorite y Dr. Antonio Sánchez, con los que me encuentro en deuda por el ánimo infundido, la confianza que depositaron en mí y por todos los momentos en los que más que como profesores, se han comportado como buenos amigos.

A los compañeros del laboratorio, por la cooperación desinteresada de todos y cada uno de ellos, por su apoyo en el trabajo y en el día a día, sobre todo a Ana Belén Martínez Padilla, Jaime Jiménez Ruiz, Ana Isabel Garrido Godino, Verónica Martínez Fernández, Mercedes Cervera Alamar, Migle Ziemite y Marcelo Fernández Rivero. Destacar a Álvaro S. Roco, por el gran trabajo previo realizado.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, la paciencia y el ánimo recibidos de toda mi familia, sobretodo de mi madre Halina Markevich, mi hermano Ernest-Erik Guzmán y mi padre Claudio Cesar Guzmán, que siempre han estado de forma incondicional a mi lado, suponiendo un remanso de paz y tranquilidad.

En general quisiera agradecer, desde lo más profundo de mi corazón, a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, en especial a María Simón Aznar, Gabriel Sancho Julve, Francisca Fernández Miralles y Francisco Javier Yagüe Lance por su apoyo, ánimo, cariño y amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Consejería de Medio Ambiente (Junta de Andalucía), por los permisos proporcionados para la captura de animales silvestres, y a todas las personas que han colaborado en la captura de los animales empleados.

A los organismos públicos que han financiado la realización de este trabajo: Ministerio de Educación y Ciencia/Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto BFU2006-01969/BFI y CGL2009-08894, cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional); y Junta de Andalucía a través del programa de “Ayudas a Grupos de Investigación” (BIO-220).

Finalmente, no por ello menos importante, al Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	x
ÍNDICE.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
1. Anfibios.....	1
1.1. Historia y evolución de los anfibios.....	1
1.2. Características y peculiaridades fisiológicas de los anfibios	3
1.3. Reproducción y metamorfosis	4
1.4. Declive anfibio.....	6
1.5. Anfibios en la Península Ibérica y en las Islas Baleares	8
1.6. Estado actual de la taxonomía de la familia Bufonidae	9
2. Estudios citogenéticos y moleculares en Anfibios	12
2.1. Bandeos cromosómicos	12
2.2. Cariotipos en la familia Bufonidae	15
2.3. Cromosomas sexuales.....	16
2.4. Poliploidía.....	18
2.5. Características de los genomas de anfibios	18
3. ADN Repetitivo.....	21
3.1. Clasificación del ADN repetitivo.....	23
3.2. Organización del ADN repetido.....	26
3.3. Función del ADN repetitivo	27
3.4. Modelos de evolución de ADN repetidos	28
3.5. Mecanismos implicados en la homogeneización de las secuencias	32
3.6. Dinámica evolutiva del ADN repetitivo	34
3.7. Ejemplos de ADNs repetitivos en anuros.....	36
OBJECTIVES.....	44
MATERIAL Y MÉTODOS	48
1. Material Analizado	48
1.1. Animales utilizados.....	48
1.2. Líneas celulares	49
2. Métodos	49
2.1. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos	49
2.2. Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa.....	50

INDICE

2.3.	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	51
2.4.	Electroforesis en geles de Agarosa.....	52
2.5.	Aislamiento y amplificación de secuencias de ADN repetitivo	52
2.6.	Clonación de fragmentos de ADN	55
2.7.	Marcaje de ácidos nucleicos	58
2.8.	Comprobación de la eficiencia de marcaje	59
3.	Identificación de secuencias específicas de ADN en membranas de nailon.....	61
3.1.	“Southern-Blot”	61
3.2.	Identificación de clones positivos mediante hibridación sobre plásmidos.....	63
3.3.	“Dot- Blot” de ADN genómico (semicuantitativo)	63
3.4.	Análisis del grado de metilación de secuencias repetidas	63
4.	Técnicas citogenéticas.....	64
4.1.	Obtención de cromosomas metafásicos	64
5.	Bandeo cromosómico	65
5.1.	Bandeo C	66
5.2.	Tinción con plata (tinción Ag-NOR)	66
5.3.	Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	67
6.	Herramientas bioinformáticas	70
6.1.	Bases de datos.....	70
6.2.	Análisis de secuencias y oligos	70
6.3.	Filogenias.....	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		74
1.	Análisis cromosómico.....	74
1.1.	Bandeo C	74
1.2.	Tinción Ag-NOR	76
1.3.	Hibridación in situ genómica (GISH).....	79
2.	Identificación de secuencias de ADN repetido en la especie <i>Bufo bufo</i>	82
3.	Análisis de la familia de ADN repetido BamHI-800 en la especie <i>Bufo bufo</i>	85
3.1.	Patrones de hibridación	85
3.2.	Clonación y análisis de las secuencias BamHI-800 en <i>B. bufo</i>	85
3.3.	Patrón de metilación del ADN satélite BamHI-800	92
3.4.	Localización cromosómica de BamHI-800 en la especie <i>B. bufo</i>	93
4.	Análisis de la familia de ADN repetido BamHI-800 en las especies <i>Epidalea calamita</i> y <i>Bufo viridis</i>	95
4.1.	Patrones de hibridación	96
4.2.	Clonación y análisis de secuencias BamHI-800 en <i>E. calamita</i> y <i>B. viridis</i>	96

INDICE

4.3.	Localización cromosómica de BamHI-800 en las especies <i>E. calamita</i> y <i>B. viridis</i>	100
5.	Secuencias BamHI-800 en otras especies de la familia Bufonidae	102
5.1.	Patrones de hibridación y amplificación por PCR	102
5.2.	Clonación y análisis de las secuencias BamHI-800 en otras especies de la familia Bufonidae	104
5.3.	Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-800 mediante "Dot-Blot" sobre ADN genómico	113
5.4.	Análisis filogenético de las secuencias BamHI-800	114
6.	Familias de ADN repetido BamHI-210	125
7.	ADN repetido BamHI-210A	126
7.1.	Patrones de hibridación de BamHI-210A en <i>B. bufo</i>	126
7.2.	Clonación y análisis de las secuencias BamHI-210A de <i>B. bufo</i>	127
7.3.	Análisis de la metilación de las secuencias BamHI-210A de <i>B. bufo</i>	131
7.4.	Localización cromosómica de las secuencias BamHI-210A en <i>B. bufo</i>	132
7.5.	Patrones de hibridación de las secuencias BamHI-210A en <i>Epidalea calamita</i> y otras especies de la familia Bufonidae	137
7.6.	Análisis de las secuencias BamHI-210A en <i>Epidalea calamita</i> y otras especies de la familia Bufonidae	138
7.7.	Localización de las secuencias BamHI-210A en <i>Epidalea calamita</i> y <i>Bufo viridis</i>	140
7.8.	Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-210A mediante "Dot-Blot" sobre ADN genómico	141
8.	ADN repetitivo BamHI-210A-inserto	142
8.1.	Patrones de hibridación del ADN repetitivo BamHI-210A-inserto	142
8.2.	Clonación y análisis del ADN repetitivo BamHI-210A-inserto	144
8.3.	Localización de las secuencias BamHI-210A-inserto en la familia Bufonidae	148
8.4.	Análisis filogenético de las secuencias BamHI-210A-inserto	149
9.	ADN repetitivo BamHI-210B	152
9.1.	Patrones de hibridación del ADN repetitivo BamHI-210B en <i>B. bufo</i>	153
9.2.	Localización de las secuencias BamHI-210B en <i>B. bufo</i>	156
9.3.	Análisis de las secuencias BamHI-210B en otras especies de la familia Bufonidae	156
10.	Familia de ADN Repetitivo BamHI-190 en <i>B. bufo</i>	165
11.	Resumen	168
	CONCLUSIONS	174
	BIBLIOGRAFÍA	178
	CURRICULUM VITAE	194

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Anfibios

La clase Amphibia fue el primer grupo de vertebrados que desarrolló patas y que consiguió salir del agua para conquistar la tierra. Aunque en ocasiones se considera a estos animales simples y primitivos, los anfibios muestran una gran diversidad de estrategias de supervivencia que les permiten ocupar gran parte de hábitats terrestres y de agua dulce.

1.1. Historia y evolución de los anfibios

La clase Amphibia se originó en el Devónico (Era Paleozoica), hace aproximadamente 350 millones de años, y sufrió una gran diversificación durante el Carbonífero y el Pérmico, apareciendo por un lado los antepasados de los anfibios actuales y, por el otro, los animales que más tarde darán lugar a los reptiles.

Los anfibios evolucionaron a partir de peces de aletas lobuladas (clase Sarcopterygii, orden Osteolepiformes), desarrollando adaptaciones fisiológicas importantes como pulmones, narinas internas y extremidades tipo quiridido, aunque el origen de los anfibios actuales sigue siendo controvertido.

Según algunos autores, existieron cuatro grandes grupos de anfibios primitivos (Clack 2007). El primer grupo, orden **Ichthyostegalia**, incluye a los primeros animales que salieron del agua, dando lugar al resto de grupos de anfibios antiguos. Un segundo grupo, el clado **Reptiliomorpha**, contiene a los antepasados de los amniotas (reptiles, aves y mamíferos), y estaba formado por animales con adaptaciones más avanzadas para la vida en tierra, aunque seguían poniendo sus huevos en el agua y tenían formas larvarias con branquias (los primeros amniotas, que eran capaces de poner los huevos en tierra, no se independizaron del medio acuático hasta finales del Carbonífero). Finalmente, los otros dos grupos, ambos candidatos a ser los ancestros de los anfibios modernos, están formados por el orden **Temnospondyli**, el grupo más diverso de anfibios primitivos que sobrevivió hasta a principios del Cretácico, y orden **Lepospondyli**, animales primitivos que aparecieron a principios del Carbonífero y que desaparecieron a finales del Pérmico.

Alternativamente, para explicar el origen de los anfibios se consideran tres subclases: **Labyrinthodontia**, **Lepospondyli** y **Lissamphibia**. De éstas, sólo la última tendría representantes vivos, con registros fósiles desde el Triásico (Era Mesozoica), hace aproximadamente 170 millones de años. Las otras dos subclases, ya extintas hace millones de años, corresponden a los anfibios fósiles desde finales de la Era Paleozoica (Devónico) hasta principios de la Mesozoica

INTRODUCCIÓN

(Triásico). De éstos, los Labyrinthodontia fueron quienes dieron lugar a los primeros reptiles durante el Carbonífero (Era Paleozoica), hace aproximadamente 250 millones de años.

Independientemente del origen inicial, los tres órdenes principales de la clase Amphibia se establecen durante el Triásico: Caudata o Urodelos (salamandras y tritones), Anura (ranas y sapos) y Gymnophiona (cecilias o ápodos). A lo largo del Jurásico y Cretácico aparece en el orden Anura el suborden Neobatrachia, que a finales de Cretácico - comienzo del Paleógeno dará lugar al desarrollo de Nobleobatrachia, donde se incluye la familia Bufonidae (Figura 1). Finalmente, a principios de la era Cenozoica todos los órdenes sufren su mayor diversificación (Roelants *et al.* 2007).

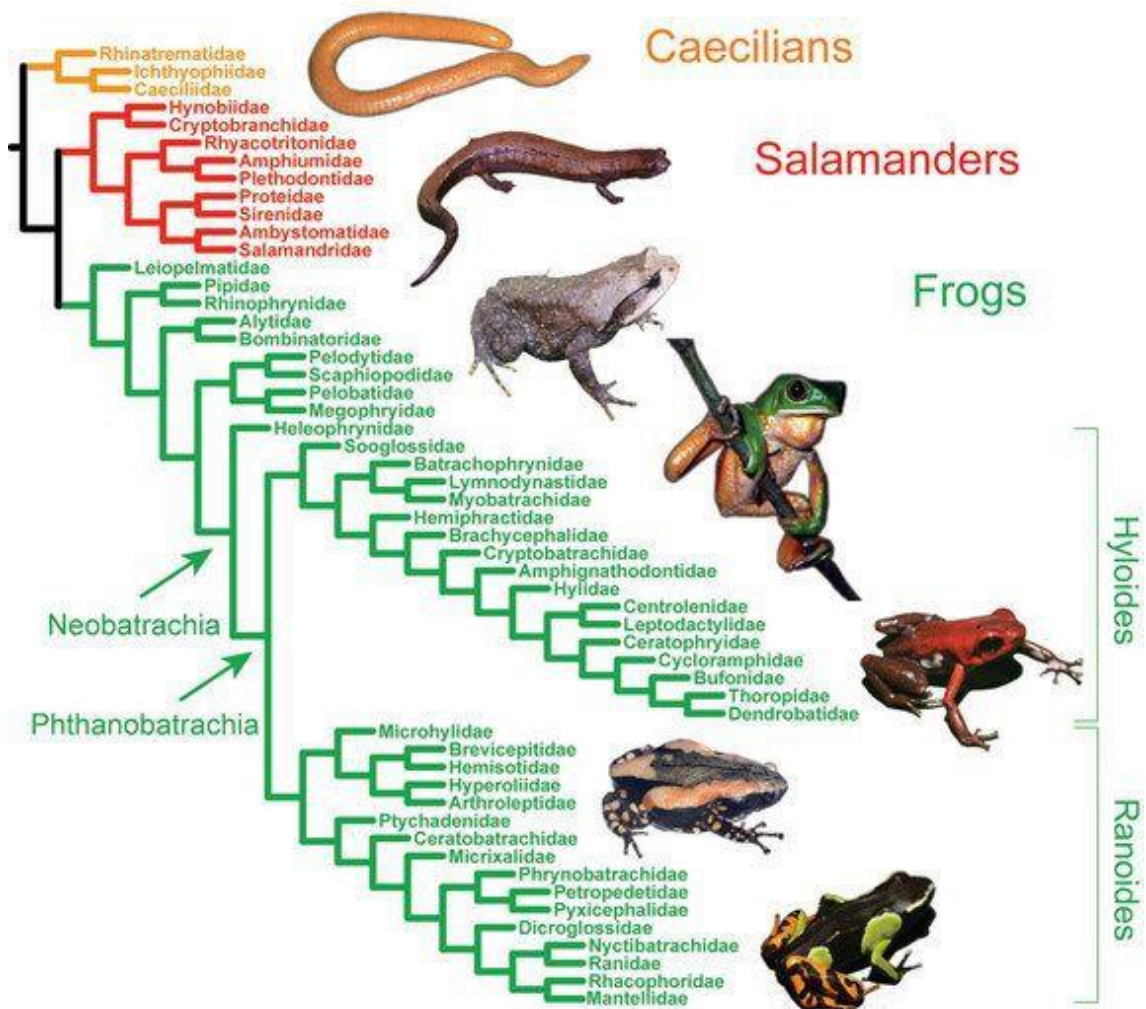


Figura 1. Propuesta de clasificación global de anfibios basada en los trabajos de Frost *et al.* (2006) y otros. Sacado de <http://www.livescience.com> y <http://www.amnh.org>.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se conocen 7.530 especies pertenecientes a la clase Amphibia (Frost 2016), y siguen describiéndose especies nuevas. De ellas, 6.624 especies (57 Familias) son del orden Anura, 701 pertenecen al orden Caudata y 205 son del orden Gymnophiona (Ortega-Andrade *et al.* 2012; Jungfer *et al.* 2016).

Su distribución es cosmopolita, exceptuando las regiones árticas y antárticas, los desiertos más áridos y la mayoría de las islas oceánicas, por la escasez de agua dulce y las dificultades de colonización. De esta forma, los anuros se distribuyen por todo el planeta, desde el trópico hasta las regiones subárticas (salvo la Antártida), con su máxima diversidad en los trópicos. Las salamandras, por otro lado, prefieren las zonas templadas del Hemisferio Norte, y las cecilias las zonas tropicales, a excepción de Australia, Madagascar y Nueva Guinea.

1.2. Características y peculiaridades fisiológicas de los anfibios

Los anfibios son vertebrados anamniotas, tetrápodos y ectotermos (regulan su temperatura a partir de la temperatura ambiental). Este hecho les hace ser muy vulnerables a variaciones en la temperatura ambiental y del agua, ya que ésta influye directamente en su desarrollo, crecimiento y ciclo reproductivo. De hecho, las variaciones latitudinales y altitudinales están relacionadas con variaciones en sus ciclos biológicos (Morrison *et al.* 2003). Por este motivo, no es de extrañar que las regiones con mayor diversidad de anfibios sean las zonas templadas o cálidas.

Cuando las temperaturas bajan, los anfibios pueden hibernar, entrando en estado latente, reduciendo su actividad y ralentizando su metabolismo. Esta atenuación de funciones vitales también se puede dar en casos de sequía extrema o calor intenso, en cuyo caso recibe el nombre de estivación.

Las adaptaciones fisiológicas y morfológicas que permitieron a los anfibios ancestrales adaptarse para vivir en la tierra son, en gran parte, sistemas fisiológicos simples y primitivos a partir de los cuales se desarrollaron y evolucionaron sistemas similares que observamos en animales superiores. Entre estas adaptaciones están el sistema respiratorio, con respiración branquial durante la fase larvaria y pulmonar al alcanzar el estado adulto; el aparato circulatorio, con doble circuito (arterial y venoso); el desarrollo de extremidades de tipo quiridio (esquema anatómico básico que, con algunas variantes, se repite en reptiles, aves y mamíferos); el desarrollo de órganos sensoriales, con una importante mejora en la visión, audición, olfato y tacto; y los sistemas muscular, esquelético, renal, nervioso y tegumento entre otros. Todas estas características hacen de los anfibios animales modelo útiles en estudios de los sistemas fisiológicos mencionados (Burggren *et al.* 2007).

INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un buen bioindicador por la necesidad que tienen para su subsistencia tanto del medio acuático como del terrestre. Así, por un lado, su ciclo biológico les hace vulnerables a alteraciones producidas tanto en medios acuáticos como en medios terrestres. Por otro lado, su piel es muy sensible a contaminantes disueltos en el agua, a la lluvia ácida o a las radiaciones (Freda 1991; García-Muñoz *et al.* 2009, 2010).

1.3.Reproducción y metamorfosis

Los anfibios son dioicos, es decir, poseen sexos separados, y con frecuencia presentan dimorfismo sexual en forma de diferencias en el tamaño de los individuos (la hembra suele ser mayor que el macho), en la coloración, en la habilidad para emitir ciertos sonidos o en los órganos reproductores.

En anfibios la determinación del sexo es genética, lo que implica que la diferenciación gonadal se pone en marcha por un interruptor genético (bien por un gen localizado en el cromosoma específico de sexo, o por la diferencia de dosis de genes entre el sexo homogamético y el heterogamético).

En función de la constitución genética del individuo, la gónada se diferenciará como ovario o como testículo. Existen, sin embargo, casos curiosos en los que la diferenciación gonadal resulta de especial interés. Este es el caso de los individuos de la familia Bufonidae (excepto en el género *Melanophryniscus*), que tanto los machos como las hembras poseen un pequeño ovario rudimentario, llamado órgano de Bidder, localizado en la región craneal de la gónada y que contiene ovocitos no funcionales. En ausencia de la gónada, el órgano de Bidder puede desarrollarse como un ovario funcional, independientemente del sexo genético del individuo, convirtiéndose el individuo en una hembra fértil. Esta particularidad hace que los animales de la familia Bufonidae sean de especial interés en estudios relacionados con la evolución y el desarrollo del sistema reproductor y la determinación de sexo (Farias *et al.* 2002; Falconi *et al.* 2007; Scaia *et al.* 2011).

Independientemente de la presencia de un gen determinante del sexo en anfibios, el sexo gonadal de algunas especies puede cambiar en función de factores externos como la temperatura, la presencia de hormonas, etc. Así, en algunas especies las temperaturas extremas pueden causar reversión sexual (Wallace *et al.* 1999). Esto es lo que ocurre en *Pleurodeles waltl*, donde altas temperaturas pueden producir masculinización, o en *Bufo vulgaris*, donde las temperaturas bajas causan feminización (Wallace *et al.* 1999).

INTRODUCCIÓN

Otro factor que afecta a la diferenciación sexual son las hormonas. En general, los renacuajos de las familias Ranidae e Hylidae producen individuos de sexo masculino cuando son tratadas con testosterona o con altas concentraciones de estradiol (el estradiol a dosis bajas a veces causa una feminización leve o temporal). En la mayoría de anfibios y en urodelos, sin embargo, el tratamiento con estradiol produce individuos de sexo femenino, mientras que la testosterona normalmente reprime el desarrollo de las gónadas. El efecto del tratamiento hormonal puede ser temporal (reversión sexual temporal), como ocurre en *Bufo americanus*, donde un tratamiento con estradiol da lugar a una población femenina que, al cesar el tratamiento, se convierte en una población de machos e individuos indiferenciados (debidos al efecto del tratamiento, que causa la supresión del crecimiento de oviducto y la esterilidad en las hembras y, por tanto, una baja tasa de hembras fértiles) (Wallace *et al.* 1999).

El periodo reproductivo habitualmente coincide con la llegada de las estaciones lluviosas. Sin embargo, el inicio del periodo reproductor puede ser muy variable a lo largo del rango de distribución de la especie. Por ejemplo, en *Bufo bufo* y *Epidalea calamita* puede ir desde diciembre, en algunas áreas meridionales, hasta mayo o junio en la alta montaña del centro y norte de la Península Ibérica.

Durante el periodo reproductivo los anfibios se agrupan y muestran una alta filopatría, retornando a los mismos lugares de puesta año tras año. Por este motivo los animales pueden recorrer varios kilómetros desde sus zonas de hibernación hasta sus lugares de cría habituales. Los machos son los primeros en acercarse al lugar de reproducción y suelen emitir vocalizaciones para atraer a las hembras. La fecundación es externa en medio acuático (anuros), aunque hay casos de reproducción interna (caudata), en su mayor parte ovíparos. Durante la fecundación externa, tanto el macho como la hembra descargan sus gametos en el agua, donde se unen para formar los embriones. Para asegurar el éxito de la reproducción es importante que la liberación de los gametos tenga lugar de manera simultánea. Es por ello que en muchas especies de sapos y ranas el macho se aferra fuertemente a la hembra con sus extremidades anteriores, provistas de callosidades especiales que proporcionan mejor adhesión. Esta forma de acoplamiento para la reproducción se denomina amplexo, es característica de anuros, y permite a la hembra liberar sus huevos al tiempo que el macho deposita sus espermatozoides.

Para realizar las puestas los anfibios prefieren masas de agua profunda, estable, duradera y con vegetación acuática. En zonas montañosas también utilizan charcas pequeñas y arroyos, siempre que sean estables. Sin embargo, en zonas áridas del sur son capaces de aclimatarse a la temporalidad de los medios acuáticos disponibles (Kulkarni *et al.* 2011; Gomez-Mestre *et al.*

INTRODUCCIÓN

2013). En este sentido, algunos anfibios, como *Pelobates cultripes*, pueden acortar su periodo de desarrollo larvario hasta un 30% cuando hay desecación del medio acuático. Esta plasticidad conlleva, sin embargo, importantes costes biológicos para los animales, como una disminución considerable del tamaño del animal, o un elevado estrés oxidativo debido a la aceleración de su metabolismo. Por todo ello, la destrucción de las zonas acuáticas de reproducción de anuros, el gran problema de la Península Ibérica debido a sequías prolongadas o a la desecación de los pantanos, resulta impactante para las poblaciones de anuros.

Las puestas están formadas por multitud de pequeños huevos cubiertos por una o varias membranas que los protegen, unidos todos ellos entre sí por una sustancia gelatinosa. El proceso que sufren las larvas hasta llegar a la fase adulta se denomina metamorfosis y se puede dividir en tres etapas. La primera consiste en el crecimiento del individuo, durante la segunda se desarrollan las extremidades posteriores y en la tercera se produce la transformación de la larva en un individuo juvenil.

Las larvas de anuros sufren una metamorfosis bastante compleja que transforma un renacuajo de vida acuática en un adulto de vida terrestre. Por este motivo, durante la metamorfosis deberá perder las branquias y adquirir pulmones, además de tener que adaptar otras estructuras corporales a su nuevo hábitat. En general este proceso dura de tres a cinco meses, aunque es posible detenerla artificialmente.

Las larvas son bastante diferentes entre especies, pero reúnen algunas características comunes. Inicialmente todas dependen de las reservas de nutrientes que les aporta el vitelo. Cuando éste se agota, la larva deberá ser capaz de alimentarse por sí misma a partir del medio acuático donde se desarrolla. En todos los casos se trata de formas móviles que necesitan vivir en agua y que respiran mediante branquias y respiración cutánea.

1.4. Declive anfibio

Desde los años 50 se observa un declive dramático en las poblaciones de anfibios de todo el mundo, caracterizado por colapsos de poblaciones y extinciones masivas localizadas. Este declive se ha vuelto más lento en los últimos 30-35 años, pero sigue siendo continuado, con una desaparición global, incluso en áreas de menor influencia humana (Blaustein *et al.* 1990). Según los últimos datos de la UINC *Red List*, el 32% de especies de anfibios (unas 2.063) se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. Además, el 43% de las poblaciones están en recesión, por lo que el número de especies amenazadas puede aumentar en el futuro. Solo un 24% de las poblaciones se encuentran estables, y únicamente el 1% muestran crecimiento. Hasta la fecha se han extinguido alrededor de 160 especies, unas 120 no han sido documentadas en estado

INTRODUCCIÓN

salvaje en los últimos años, y no hay datos suficientes que permitan determinar con precisión el estado del 25% de las especies. Los últimos datos indican que el declive sigue aumentando, y se plantea considerarlo una extinción masiva de anfibios (Wake *et al.* 2008; Butchart *et al.* 2010).

El declive anfibio afecta a miles de especies en todo tipo de ecosistemas, y constituye una de las amenazas más críticas a la biodiversidad global, ya que este grupo representa un escalón importante en la cadena trófica. Existen numerosas hipótesis para explicar el origen de este declive y, aunque su origen es global, debe estar causado por varios factores que amenazan a poblaciones de anfibios en mayor o menor grado. Las principales amenazas descritas son:

- ✓ Destrucción, modificación y fragmentación del hábitat (impacta en el 90% de las especies). Entre las causas más importantes están: la desecación de las tierras húmedas o la construcción de barreras que dificultan los desplazamientos reproductores anuales; la desecación de charcas, humedales y áreas encharcadas a causa de la sobreexplotación de los acuíferos; el desarrollo urbano que conlleva la eliminación de masas de agua; muertes por atropello; los incendios forestales; la agricultura intensiva; la desaparición de riberas naturales y ribazos (Cushman 2006).
- ✓ Contaminación química, agropecuaria y urbana-industrial de aguas dulces, charcas y lagunas, que acumulan pesticidas (herbicidas e insecticidas), fertilizantes (nitratos y nitritos) o sufren el efecto de la lluvia ácida, haciendo que súbitamente mueran las larvas, se disminuya o se distorsione su desarrollo y aumente la incidencia de enfermedades infecciosas. También tienen una influencia negativa muchos fitosanitarios e insecticidas de aplicación directa sobre especies de la cadena trófica de los anfibios.
- ✓ Cambio climático; modificaciones de temperatura y precipitación, que alteran los microclimas y afectan a patrones reproductivos de los anfibios.
- ✓ Aumento de la radiación ultravioleta (UV-B) que daña la piel de los adultos y afecta a la viabilidad y desarrollo de huevos y larvas.
- ✓ Comercio con las especies de coloración más llamativa; muerte directa producida por su ancestral mala fama, uso en rituales o en juegos.
- ✓ Pesca y captura; ya sea como deporte o como alimento, provocando como consecuencia indirecta un excesivo desarrollo de mosquitos y plagas asociadas.
- ✓ Introducción de especies foráneas para favorecer la pesca deportiva (salmónidos, cangrejos y galápagos), que representan un gran problema para los anfibios, pues favorecen la depredación excesiva de adultos, larvas y puestas, la competencia trófica y la transmisión de enfermedades.

INTRODUCCIÓN

- ✓ Enfermedades infecciosas emergentes: por iridovirus, muy contagiosas y mortales; por bacterias como *Aeromonas hydrophila*, que en grandes concentraciones provoca mortalidades en masa de adultos y larvas; por protistas del género *Saprolegnia*, que causan gran mortandad de huevos y larvas de anfibios; y por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que provoca la quitridiomycosis, causante de la muerte masiva de anfibios en todo el mundo.

1.5. Anfibios en la Península Ibérica y en las Islas Baleares

En la Península Ibérica habitan treinta y tres especies de anfibios de los órdenes Anura y Caudata. Existen representantes de las familias Salamandridae (Caudata), Alytidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Bufonidae, Hylidae y Ranidae (Anura). De las 33 especies, tres se consideran introducidas (*Discoglossus pictus*, *Bufoles balearicus*, *Lithobates catesbeianus*), aunque actualmente existen poblaciones estables de éstas. De las restantes, 15 especies son endémicas de la Península Ibérica, 1 es endémica de las Islas Baleares (Palma de Mallorca) (*Alytes muletensis*) y 5 son de distribución más amplia (Península Ibérica, sur de Francia y norte de África). De todas las especies presentes en España, 6 se consideran amenazadas según UINC *Red List* (Vié *et al.* 2009).

Las tres especies de la familia *Bufonidae* presentes en España son *Bufo bufo*¹ o sapo común, *Epidalea calamita*², comúnmente conocido como sapo corredor o sapo verde y *Bufoles balearicus*³ o sapo balear.

B. bufo se distribuye por Asia noroccidental, pequeñas regiones del noreste africano, y por toda Europa salvo Irlanda, Islandia y algunas islas mediterráneas. En la Península Ibérica *B. bufo* (ssp *spinusus*) se extiende por el sur hasta el noroeste de África, y por el norte hasta el suroeste de Francia, quedando aún por determinar la zona de separación de las otras subespecies de *B. bufo*. Ocupa todos los hábitats, desde las áreas termomediterráneas hasta la alta montaña del área crioromediterránea, y aparece sobre cualquier substrato geológico, desde el nivel del mar hasta los 2.600 m en los Pirineos.

E. calamita se encuentra ampliamente distribuida por toda Europa, desde la Península Ibérica hasta Bielorrusia y el oeste de Ucrania. El límite norte de su distribución está en el Reino Unido,

¹ Actualmente se propone la denominación *B. bufo* ssp *spinusus* o *B. spinusus*.

² Anteriormente conocida como *Bufo calamita*.

³ Previamente conocida como *Bufo balearicus* o *Pseudepidalea balearicus*.

INTRODUCCIÓN

el sureste de Irlanda y el sur de Suecia, mientras que el límite por el sur está en el norte de Austria y Eslovaquia, corriendo al pie de los Alpes.

B. balearicus, la especie menos estudiada, es autóctona de Palma de Mallorca, aunque parece tener una estrecha relación filogenética y evolutiva con *Bufo viridis*.

1.6. Estado actual de la taxonomía de la familia Bufonidae

La clasificación actual de la clase Amphibia resulta bastante polémica. Prueba de ello es que los anfibios son uno de los grupos animales con mayor actividad taxonómica. De hecho, a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral la nomenclatura y clasificación taxonómica de la familia Bufonidae, con 589 especies, ha cambiado 4 veces.

Se ha discutido mucho sobre el origen monofiletico o parafiletico de familia Bufonidae, aunque la mayoría de autores coinciden en que se trata de una gran familia taxonómica de origen monofiletico. Sin embargo, sus taxones más pequeños necesitan ser revisados por no estar muy claro el origen monofiletico o parafiletico de éstos (Graybeal 1997; Pramuk *et al.* 2008; Van Bocxlaer *et al.* 2010).

Los primeros cambios producidos en la taxonomía implicaban clasificar a numerosos géneros de este taxón como subgéneros (Smith *et al.* 2006), dejando el género *Bufo* restringido a aquellas especies inicialmente consideradas dentro del grupo *Bufo bufo* (Frost *et al.* 2006). Esto ocasionó que numerosas especies fueran excluidas de este género, quedando en el limbo taxonómico de “*Bufo*” a la espera de su asignación a un género.

A continuación, se describirán los principales cambios en la taxonomía de la familia Bufonidae que han afectado a las especies que se han utilizado en este trabajo.

1.6.1. *Bufo bufo*⁴

Tradicionalmente se ha considerado que todas las poblaciones de *B. bufo* pertenecen a la misma especie, aunque sea posible diferenciar poblaciones utilizando microsatélites y marcadores mitocondriales. De hecho, se han encontrado similitudes entre algunas poblaciones de la Península Ibérica y poblaciones de las islas Británicas (Martínez-Solano *et al.* 2008; Beukema *et al.* 2013). Sin embargo, existen autores que consideran la existencia de distintos linajes evolutivos de *B. bufo*, entre los que distinguen el linaje Ibérico, considerándolo como una subespecie de *B. bufo* (*B. bufo ssp. spinosus* frente a *B. bufo ssp. bufo*) (García-Porta *et al.* 2012). Hoy día se vislumbra un nuevo cambio, ya que algunos autores consideran que los *B. bufo* de la

⁴ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Bufo bufo*, especificando la procedencia geográfica.

INTRODUCCIÓN

península Ibérica pertenecen a una especie: *Bufo spinosus*, diferente de *Bufo bufo*, y se propone una posible zona de contacto para ambas especies, a pesar de no estar clara la distribución geográfica de ambos taxones (Schneider *et al.* 2004; Recuero *et al.* 2012; Arntzen *et al.* 2013a; Arntzen *et al.* 2013b).

1.6.2. *Bufotes ssp.*⁵

Tradicionalmente se ha considerado que las especies de este género pertenecían al grupo *Bufo viridis*. Sin embargo, en su revisión sobre la clasificación de los anfibios, Frost *et al.* (2006) proponen situarlas en un nuevo género, *Pseudepidalea*, debido a la distancia genética que presentan con *Epidalea calamita*, especie con la que previamente se había asumido un parentesco monofilético basado en las distribuciones geográficas de individuos diploides y triploides (Borkin *et al.* 2000).

El debate sobre la clasificación de este grupo puede resumirse en tres posturas: algunos autores defienden la existencia de una relación estrecha entre estos sapos y el género *Bufo* (Smith *et al.* 2006; Speybroeck *et al.* 2010); otros autores proponen situarlos alejados filogenéticamente tanto del género *Bufo*, como del género *Epidalea* (Van Bocxlaer *et al.* 2009; Van Bocxlaer *et al.* 2010); finalmente, también se propone su posible relación con el género *Schismaderma* (Pyron *et al.* 2011). Actualmente se plantea recurrir al antiguo nombre genérico propuesto por Rafinesque en 1815, *Bufotes*, considerándolo como un género nuevo (Dubois *et al.* 2010).

1.6.3. *Epidalea calamita*⁶

En el año 1882 esta especie fue catalogada como bufónido, sinónimo de *Bufo* (Boulenger 1966). Sin embargo, en 2006 se proponen dos nuevas clasificaciones: situar a este anfibio en un género nuevo, *Pseudoepidalea*, junto con algunas especies del género *Bufotes* (Stöck *et al.* 2006). Alternativamente, se propone dejar a esta especie como único representante del género *Epidalea* (Smith *et al.* 2006).

La posición de este género dentro de la familia Bufonidae tampoco está clara. Hay autores que lo consideran un taxón próximo a *Bufo* (Van Bocxlaer *et al.* 2009; Van Bocxlaer *et al.* 2010; I. 2014), si bien hay trabajos que sugieren que el género *Epidalea* está más próximo al género *Leptophryne* que a *Bufo* (Pyron *et al.* 2011).

⁵ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Bufotes ssp.*

⁶ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Epidalea calamita*.

INTRODUCCIÓN

1.6.4. *Barbarophryne brongersmai*⁷

Desde que fue descrita por Hoogmoed (1972), se consideró que esta especie pertenecía al género *Bufo*. A partir de 2009 su clasificación está menos clara. Inicialmente se propuso su inclusión en el género *Pseudepidalea* (Frost 2009), aunque posteriormente se propone crear el género *Barbarophryne* para incluirla (Beukema *et al.* 2013), siendo por tanto, la única representante de dicho género.

1.6.5. *Duttaphrynus melanostictus*⁸

Desde el año 1931 existen trabajos que reportan la presencia de este sapo en distintas regiones de Asia, si bien en cada caso se utiliza una nomenclatura diferente. También conocida como *Bufo melanostictus* de Nepal (Anders *et al.* 2002), a partir del año 2000 comienzan a proponerse distintos géneros para clasificar a esta especie. Así, se sugiere que se encuentra alejada del género *Bufo* y se propone situarla en el género *Duttaphrynus* (Frost *et al.* 2006), que debe ser un subgénero de *Bufo* (Smith *et al.* 2006); que esta especie es próxima al género *Pelophryne* (Matsui *et al.* 2007), o que debe estar situada junto con *Schismaderma* y *Phrynoidis* (Pramuk *et al.* 2008). En los últimos años se han publicado evidencias moleculares sobre la proximidad del género *Duttaphrynus* con *Xanthophryne*, situándolo en el mismo grupo parafilético que el género *Bufotes* (Van Bocxlaer *et al.* 2010; Pyron *et al.* 2011).

1.6.6. *Rhinella marina*⁹

Originalmente todas las especies del género *Rhinella* estaban incluidas en el género *Bufo*, por lo que en la mayoría de los artículos que se refieren a esta especie aparece como *Bufo marinus* de Sudamérica. Las primeras propuestas de separar a los Bufos de Ecuador y Perú del resto de bufónidos son del año 2003 y se apoyan en filogenias moleculares de los Bufos de América (Pramuk *et al.* 2003; Pauly *et al.* 2004). Inicialmente se propuso separarlos en dos géneros parafiléticos: *Chaunus* y *Rhamphophryne*, que posteriormente fueron considerados sinónimos de *Rhinella* (Kwet *et al.* 2006; Pramuk 2006). A partir de entonces se han propuesto varias clasificaciones para el género *Rhinella* (Pramuk 2006). Así, ha sido considerado tanto como subgénero del género *Bufo* (Van Bocxlaer *et al.* 2010), como un género independiente (Maciel *et al.* 2010).

Rhinella marina es una especie ampliamente distribuida por América central y del sur, desde donde se introdujo en numerosas islas del pacífico, en Australia, en Japón, etc. Dado que hoy

⁷ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Barbarophryne brongersmai*.

⁸ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Duttaphrynus melanostictus*.

⁹ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Rhinella marina*.

INTRODUCCIÓN

día es difícil distinguir poblaciones y subespecies de esta especie, se considera más un grupo (grupo *Rhinella marina*) que una única especie.

1.6.7. *Amietophrynus arabica*¹⁰

Inicialmente se conocía a esta especie como *Bufo arabicus* o *Bufo orientalis* (Dubois *et al.* 1999) o, incluso, como especie del grupo de *Bufo viridis*. A partir del año 2000 se cuestiona su pertenencia al grupo de *Bufo viridis* (Stöck *et al.* 2001) y es excluida del género *Bufo* (Frost *et al.* 2006), pero no se coloca en ningún otro género. Portik *et al.* (2015), basándose en estudios filogenéticos y moleculares, proponen situar a esta especie en el género *Amietophrynus* debido a su proximidad con otras especies de este género. Posteriormente, sin embargo, se ha propuesto cambiar el nombre del género *Amietophrynus* por *Sclerophrys* (Ohler *et al.* 2016).

2. Estudios citogenéticos y moleculares en Anfibios

Los anfibios, a pesar de ser uno de los grupos de animales más antiguos de la Tierra y de haber logrado superar cuatro extinciones masivas (Wake *et al.* 2008), han sido poco estudiados si se les compara con otros grupos de vertebrados.

Sobre los anfibios se conoce bastante bien su fisiología, son de fácil mantenimiento en cautividad, la fecundación y el desarrollo son externos y puede analizarse el efecto de distintos compuestos simplemente adicionándolos al agua (Browne *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2009).

A pesar de todas estas ventajas, los análisis citogenéticos y moleculares en especies de este grupo siguen siendo escasos. Por ejemplo, si se compara la información existente en bases de datos de secuencias sobre mamíferos con la que existe sobre anfibios, la diferencia entre ambos grupos es notable (Pruitt *et al.* 2014). De hecho, para mamíferos existen 136 proyectos genoma, 33 de ellos terminados y ensamblados en cromosomas, mientras que en anfibios solo existen 4 proyectos genoma, dos como versión preliminar (*Ambystoma mexicanum* (Keinath *et al.* 2015) y *Nanorana parkeri* (Sun *et al.* 2015)) y dos completos (*Xenopus tropicalis* (Hellsten *et al.* 2010) y *Xenopus laevis* (Session *et al.* 2016)).

2.1. Bandeos cromosómicos

En los años 80s y principio de los 90s se realizaron importantes aportaciones a las descripciones cromosómicas de muchas especies de anuros y salamandras utilizando distintas técnicas de bandeo cromosómico, (ver la serie “Chromosome banding in Amphibia” publicada por M. Schmid y diversos colaboradores en “Chromosoma” y “Cytogenetic and Genome Research”).

¹⁰ En este trabajo se ha utilizado el nombre *Amietophrynus arabica*.

INTRODUCCIÓN

Estos trabajos permitieron distinguir citogenética y molecularmente familias, géneros y especies de anfibios.

Las principales técnicas de bandeo cromosómico utilizadas en este grupo son:

- **Bandas G:** Los cromosomas se digieren de manera controlada con tripsina para ser posteriormente teñidos con Giemsa. Las bandas G (oscuras) se replican más tarde en la fase S, son regiones ricas en A+T, y contienen cromatina más condensada y menos activa transcripcionalmente. Las bandas R (claras) suelen replicarse temprano en la fase S, están menos condensadas y suelen ser regiones ricas en G-C.
- **Bandas Q:** El tratamiento es similar al del bandeo G, salvo por el hecho de que los cromosomas se tiñen con un colorante fluorescente, la quinacrina (Q) (a veces pueden utilizarse otros compuestos fluorescentes como la cromomicina A o el DAPI). Con esta técnica de bandeo las regiones ricas en AT presentan fluorescencia positiva, mientras que las regiones ricas en GC son menos fluorescentes.
- **Bandas C:** los cromosomas se tratan con una solución alcalina (NaOH o (Ba)₂OH), se lavan en solución salina caliente y se tiñen con Giemsa. Con esta técnica se identifican regiones de heterocromatina constitutiva, que corresponden principalmente a secuencias de ADN altamente repetitivas. Las bandas C positivas se encuentran principalmente en centrómeros, en telómeros, en el ADN satélite y, en ocasiones, en constricciones secundarias como las NORs (Regiones Organizadoras Nucleares).
- **Tinción Ag-NOR:** mediante esta técnica se tiñen las NOR activas, debido a la afinidad de las proteínas asociadas a estas regiones por el nitrato de plata. La tinción con plata no es exclusiva de las regiones NOR, ya que la plata también puede presentar afinidad por otras proteínas ácidas (no histonas) responsables de señales positivas distintas de las NOR (Haaf *et al.* 1984).

2.1.1. Bando G, bandeo Q y bandeo C en anfibios

En urodelos las bandas G, Q y C coinciden a menudo (Birstein 1982), mientras que en anuros no suelen identificarse patrones claros de bandas G o Q (Schmid 1978).

Se ha propuesto que la ausencia de bandas G en anfibios se debe a que las proteínas eliminadas con el tratamiento se distribuyen uniformemente a lo largo de los cromosomas. De este modo, las estructuras cromoméricas son más susceptibles al ataque de agentes desnaturalizantes que en los cromosomas de mamíferos (Birstein 1981). Otros autores proponen que la ausencia de bandas G se debe al alto grado de espiralización de los cromosomas de anfibios, que haría que

INTRODUCCIÓN

las bandas G se colocasen tan próximas entre sí en estos cromosomas que no se podrían distinguir al microscopio óptico (Greilhuber 1977; Schmid 1978; Aleksandrovskaia *et al.* 1979).

Las bandas Q son dependientes del estado de condensación de los cromosomas. Así, cuanto más contraídos estén los cromosomas, más uniformemente se distribuye la fluorescencia y menos evidentes son las bandas. Según esto, la falta de bandas Q en los cromosomas de anuros podría atribuirse al grado de condensación de los cromosomas en metafase. Existen algunas excepciones a la ausencia de bandas Q en anuros. Este es el caso de la especie *X. mulleri*, en la que mediante bandeo Q es posible identificar el satélite AT, que constituye el 4% del genoma total de esta especie (Pardue 1974).

La mayoría de anfibios estudiados presentan bandas C positivas centroméricas en casi todos los cromosomas, algo que no es de extrañar dado que el bandeo C pone de manifiesto la presencia de regiones heterocromáticas, que suelen asociarse a la presencia de ADN satélite (Obara *et al.* 1975; Schmid 1978; Birstein 1981). Con el tratamiento adecuado también es posible observar bandas C en los telómeros de la mayoría de cromosomas, además de una señal positiva asociada a la constricción secundaria en la que se localiza la NOR. En algunas especies también se han observado 1 a 5 bandas intersticiales, responsables de la variación cariotípica intra- e inter-específica observada.

El empleo combinado de un tratamiento con $(Ba)_2OH$ (bandeo C) y una tinción posterior con quinacrina (bandeo Q) permite mejorar la resolución de las bandas de heterocromatina constitutiva terminales e intersticiales (Schmid 1978). De este modo se han encontrado bandas C que coinciden con las bandas Q heterocromáticas en la constricción secundaria y en los telómeros de algunas especies de las familias Bufonidae e Hylidae de (Schmid 1978).

Las comparaciones entre bandas Q y C en la familia Bufonidae muestran, con algunas excepciones, que las regiones heterocromáticas fluorescentes siempre son C-positivas. Las excepciones (*B. terrestris*, con una banda Q intersticial en el brazo largo del cromosoma 7 y *B. viridis*, con 2 bandas intersticiales en ambos brazos del cromosoma 9) pueden deberse a que el bandeo C no proporcione suficiente resolución por tratarse de bandas intersticiales muy pequeñas.

En general, las especies de bufos de Norte-América presentan heterocromatina fluorescente en las regiones teloméricas de los cromosomas 7 a 11, mientras que entre las especies europeas esto solo ocurre en *B. viridis* y en las africanas se observan bandas intersticiales en los

INTRODUCCIÓN

cromosomas medianos y pequeños y, a veces, una banda telomérica en la pareja 10 en la especie *B. mauritanicus*.

2.1.2. Tinción Ag-NOR en anfibios

Las NOR suelen ser muy conservadas en número, normalmente en una pareja cromosómica, pero no así en la posición, que suele ser muy variable entre especies del mismo género (Schmid 1978). La variación intraespecífica también es posible, habiéndose descrito polimorfismos intraespecíficos en la posición y en el número de las NORs (Schmid 1978).

Si las NORs se localizan en los cromosomas sexuales, los polimorfismos para el tamaño de las NORs pueden estar ligados a los cromosomas sexuales. Por ejemplo, en *B. buergeri* y en *R. marina* las diferencias en el tamaño y la posición de las NORs, respectivamente, parecen estar ligadas a los cromosomas sexuales (Schmid *et al.* 1993; Abramyan *et al.* 2009).

Las regiones Ag-NOR también pueden estar asociadas a heterocromatina constitutiva C positiva, como ocurre en la familia Bufonidae. Si se tiene en cuenta que en el género *Bufo* las rupturas cromosómicas ocurren preferentemente en las regiones de heterocromatina constitutiva, esta asociación podría explicar por qué las NORs en la familia Bufonidae están flanqueadas por bloques de heterocromatina, (Bogart 1980).

2.2. Cariotipos en la familia Bufonidae

En anfibios existe una tendencia evolutiva hacia la adquisición de cariotipos de cromosomas meta- y submetacéntricos con un bajo número de cromosomas (Morescalchi 1973; Morescalchi 1977).

Los sapos de la familia Bufonidae, dada su amplia distribución, pueden agruparse por regiones geográficas en americanos, europeos, africanos y asiáticos. Los cariotipos de estas especies, independientemente de la región geográfica a la que pertenezcan, presentan algunas características comunes:

- El cariotipo es muy conservado, con $2n=22$ cromosomas (Beccari 1926; Makino 1932; Volpe *et al.* 1968; Odierna *et al.* 2007; Baraquet *et al.* 2011; Al-Shehri *et al.* 2012). Son excepciones el género *Amietophrynus* (*Sclerophrys*), con un número de cromosomas que puede variar entre $2n=20$, 40 o 44 según la especie, y *B. viridis*, que puede ser diploide, triploide o tetraploide (Stöck *et al.* 1999; Stöck *et al.* 2002).
- Las 11 parejas cromosómicas se pueden dividir en dos grupos: 6 pares grandes y 5 pequeñas. Las parejas grandes contienen el 80% del genoma total y las pequeñas el 20% restante (Kuramoto 1990).

INTRODUCCIÓN

- La tinción con plata revela que todas las especies analizadas de esta familia tienen una única pareja de cromosomas portadora de NOR. Esto es cierto también en *B. viridis* tetraploides, debido a la re-diploidización de las NORs (Stöck *et al.* 2002; Odierna *et al.* 2004). La posición de las NORs, sin embargo, es variable entre especies. Los sapos americanos, por ejemplo, tienen la NOR en el brazo corto de la pareja 7, y en la mayoría de ellos no hay heterocromatina asociada a las NORs (exceptuando *R. ictericus* (Azevedo *et al.* 2003)). En los sapos asiáticos, por otro lado, la posición de la NOR depende de la especie y puede estar localizada en la pareja 6 (*B. viridis*), en la pareja 5 (*B. latastii*), o en la o pareja 7 (*D. melanostictus*) (Stöck *et al.* 2001; Odierna *et al.* 2004; Saba *et al.* 2014). Finalmente, en los sapos europeos las parejas portadoras de NOR son la 6 (*B. bufo*) y la 11 (*E. calamita*) (Schmid 1978). También es frecuente la existencia de polimorfismos para el tamaño de la NOR, que pueden deberse a diferencias en la actividad de cistrones ribosomales (Amaro-Ghilardi *et al.* 2008), o a diferencias reales en el tamaño de éstos (Abramyan *et al.* 2009).

La tinción Ag-NOR y el bandeo C y permiten identificar polimorfismos en especies, subespecies o poblaciones relativos a estas características citogenéticas (Birstein *et al.* 1982; Foote *et al.* 1991; Miura 1995; Spasic-Boskovic *et al.* 2000; Gigantino *et al.* 2002). Esto hace de estas técnicas una herramienta fácil, útil como primera aproximación a la hora analizar especies, subespecies o poblaciones de anfibios.

2.3. Cromosomas sexuales

Los cromosomas sexuales se originan a partir de autosomas (Ohno 2013), pero difieren en la información genética que portan ya que son diferentes en ambos sexos, y activan o reprimen la diferenciación gonadal específica de un sexo.

El sexo heterogamético produce dos tipos de gametos, cada uno con un cromosoma sexual diferente, mientras que el sexo homogamético produce un solo tipo de gametos. A los cromosomas sexuales de las especies con heterogamia masculina se les llama X e Y (las hembras son XX y los machos son XY). A los cromosomas sexuales de las especies con heterogamia femenina se les llama Z y W (los machos son ZZ, mientras que las hembras son ZW).

La presencia de ambos tipos de heterogamia en anfibios sugiere que los cromosomas sexuales evolucionaron varias veces en este linaje (Ogata *et al.* 2008). De hecho, los cromosomas sexuales están todavía en el proceso activo de evolución. Prueba de ello es la coexistencia de ambos sistemas de cromosomas sexuales en la especie *Rana rugosa*, en la que es posible encontrar poblaciones con cromosomas ZZ/ZW heteromórficos, o con cromosomas XX/XY homo- o

INTRODUCCIÓN

heteromórficos (Nishioka 1993, Miura 1998). Otro ejemplo interesante lo proporciona la especie *X. tropicalis* en la que coexisten tres cromosomas sexuales: Y, Z y W, y los dos tipos de heterogametismo. De este modo, es posible identificar tres tipos de machos (YZ, YW y ZZ), y dos de hembras (ZW y WW), todos ellos viables y fértiles (Roco *et al.* 2015).

El heteromorfismo de los cromosomas sexuales no es frecuente en anfibios. De hecho, en el 95% de las especies analizadas los cromosomas sexuales son homomórficos y no es posible distinguirlos entre sí. Esto podría explicar la elevada frecuencia de especiación poliploide y de poliploidía espontánea observada en anfibios.

La existencia de cromosomas sexuales heteromórficos en anuros ha sido atribuida principalmente a tres tipos de eventos: 1) inversiones (Nishioka *et al.* 1993; Nishioka *et al.* 1994; Miura *et al.* 1996; Miura *et al.* 1997), 2) heterocromatinización (Yadav *et al.* 1975; Schmid 1983; Schmid *et al.* 1990) y 3) translocación (Hanada 2002). Según esto, podemos encontrar especies con cromosomas sexuales completamente heteromórficos que pueden diferenciarse fácilmente entre sí, especies en las que es necesario alguna técnica de bandeo para poner de manifiesto las diferencias, o especies en las que no es posible la diferenciación.

Los cromosomas sexuales de *Amolops mantzorum*, con un sistema del tipo XX/XY, son un ejemplo de cromosomas sexuales heteromórficos identificables a simple vista donde el cromosoma Y es subtelocéntrico con una banda C intensa en el brazo largo, mientras que el cromosoma X es metacéntrico y no presenta esta banda C intensa (Wu *et al.* 1987; Yang 1993). Algo similar ocurre en *Pyxicephalus adspersus*, con un cromosoma W mucho más pequeño que el cromosoma Z, y con su brazo corto completamente heterocromático (Schmid 1980), o con *D. melanostictus*, donde es posible identificar la pareja de cromosomas sexuales por diferencias de tamaño (Saba *et al.* 2014).

En ocasiones los cromosomas sexuales homomórficos pueden diferenciarse utilizando alguna técnica citogenética, como ocurre con la pareja de cromosomas sexuales de *Rana margaretae*. En esta especie, se pone de manifiesto la presencia de una banda C intersticial en el cromosoma X, mientras que en el cromosoma Y la banda C es telomérica (Yang 1993). En *Buergeria buergeri* los cromosomas sexuales homomórficos pueden identificarse mediante bandeo C, G y tinción Ag-NOR. Además, el cromosoma Z de esta especie tiene asociado un ADN satélite específico (Hanada 2002). Otros ejemplos de técnicas citogenéticas que han permitido identificar cuál es la pareja de cromosomas sexuales son los patrones de replicación en *B. viridis* (Odierna *et al.* 2007), o la tinción Ag-NOR en *R. marina* (Abramyan *et al.* 2009).

2.4. Poliploidía

Se conocen 50 especies de anuros poliploides, con distintos niveles de ploidía en la misma especie o en especies muy próximas (Bogart 1980; Stöck *et al.* 2002; Evans *et al.* 2012). Las ploidías en la familia Bufonidae se han estudiado principalmente en el grupo de *Bufo viridis*, donde se han encontrado individuos poliploides en *Bufoles danatensis* (4n), *Amietophrynus* (*Sclerophrys*) sp. (2n y 4n) y *B. pseudoraddei*, *B. zugmayeri* y *B. asiomontanus* (3n y otros).

Las especies de este grupo de sapos ofrecen un sistema de ploidías particularmente interesante porque incluye tres niveles de ploidías (2n=22, 3n=33 y 4n=44), siendo uno de los pocos ejemplos de vertebrados que incluye poblaciones naturales de individuos poliploides bisexuales y fértiles (Stöck *et al.* 2010). Esto es lo que ocurre con la especie *B. danatensis* en la región de Asia Central, donde se observan zonas de reemplazamiento de diploides por tetraploides a lo largo de la transición vertical desde tierras bajas hasta las montañas (Borkin *et al.* 2013). Los individuos tetraploides habitan las regiones montañosas, mientras que las estepas y las llanuras de la misma área están ocupadas generalmente por poblaciones diploides. Por otro lado, en algunas áreas como la cordillera del Karakórum, existen poblaciones estables de individuos triploides con reproducción bisexual (Stöck *et al.* 2002).

La poliploidización proporciona la materia prima para la evolución del genoma a través de la redundancia génica. Las alteraciones posteriores de estas copias se traducirán en la adquisición de nuevas funciones y en especiación. Además, la coexistencia de pares de homólogos puede dar lugar a la rediploidización mediante la eliminación o el silenciamiento de partes redundantes del genoma (Odierna *et al.* 2004; Stöck *et al.* 2005; Ainouche *et al.* 2010; Buggs *et al.* 2011; Braasch *et al.* 2012). Algunos autores sugieren que la poliploidización, seguida de eventos genéticos y epigenéticos, condujo a la diversificación rápida en Anura (Becak 2014).

2.5. Características de los genomas de anfibios

2.5.1. Contenido en GC y metilación del genoma de anfibios

En general, un incremento en el contenido en G+C proporciona estabilidad al ADN, al ARN y a las proteínas. De hecho, los codones ricos en GC codifican preferentemente aminoácidos que confieren estabilidad térmica a las proteínas correspondientes.

El rango de variación del porcentaje en G+C depende del tamaño del genoma: entre los genomas de menor tamaño se observa el mayor rango de variación para el porcentaje en G+C, pero a medida que aumenta el tamaño de los genomas el rango de variación se hace menor (Vinogradov 1998). Por otro lado, aunque en anuros el tamaño del genoma muestra gran

INTRODUCCIÓN

variación entre especies en comparación con otros vertebrados, el rango de variación en el porcentaje de G+C es mayor cuando se comparan especies de distintos géneros o familias que cuando se comparan especies del mismo género (Vinogradov 1998).

El elevado porcentaje de G+C, junto a la gran cantidad de secuencias repetidas presentes en el genoma de anfibios, le confiere estabilidad física y una cierta protección frente al daño químico si el ADN repetitivo enriquecido en G+C se sitúa en la periferia del núcleo, ya que puede absorber más eficazmente los efectos de los mutágenos químicos, que tienen mayor afinidad por la guanina. Esto explicaría una cierta presión selectiva en favor del ADN repetitivo enriquecido en G+C, por su posible función protectora del genoma.

Los genomas de peces y anfibios están, en promedio, dos veces más metilados (1,7% y 1,98% respectivamente) que en mamíferos (0,88%), aves (1,02%) y reptiles (1%) (Jabbari *et al.* 1997; Jabbari *et al.* 2004). En cultivos celulares se observan diferencias similares (por ejemplo, un 4% en cultivos celulares de *X. laevis* comparado con el 1-2,9% en mamíferos (Browne *et al.* 1977). Dado que los niveles medios de G+C están cerca del 42,5% en estas cinco clases de vertebrados, esto significa que aproximadamente el 9% de todas las citosinas se metilan en peces y anfibios frente al 4,5% en mamíferos, aves y reptiles. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la proporción de secuencias repetidas, que es mayor en peces y anfibios (59-77%), que en reptiles, mamíferos y aves (27-41%) (Olmo *et al.* 1989).

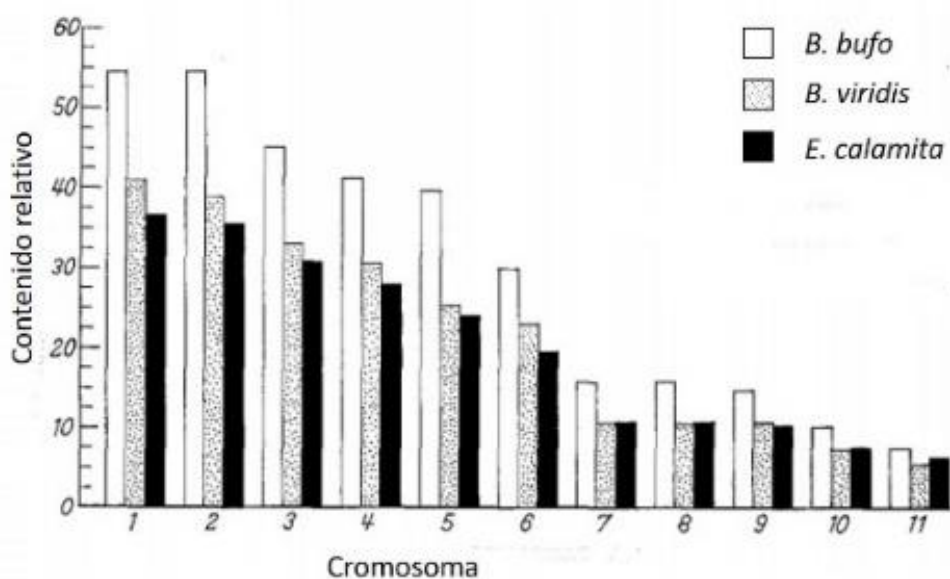


Figura 2. Comparación del tamaño de los cromosomas de las especies *B. bufo*, *B. viridis* y *E. calamita*. Extraído de Ullerich (1966).

INTRODUCCIÓN

La metilación del ADN eucariota se produce habitualmente en la posición 5 del dinucleótido CpG (5mC). Sin embargo, al contrario de lo que cabría esperar, la frecuencia del dinucleótido CpG disminuye con el aumento en el contenido en G+C, por lo que la metilación del ADN de anfibios debe localizarse en sitios diferentes a CpG.

2.5.2. Tamaño del genoma en anfibios

Los anfibios se caracterizan por tener una elevada cantidad de ADN nuclear, que puede ser 10, 100 ó 1.000 veces superior a la de mamíferos (Morescalchi 1973; Fredga 1977). Por ejemplo, a comparación de los cromosomas humanos con los de algunas especies de la familia Bufonidae muestra que el contenido medio de ADN por nm de longitud de un cromosoma metafásico es 1,5 a 3 veces mayor en *Anura* (Schmid 1978).

Por regla general, en la mayoría de géneros de anuros el tamaño del genoma en las especies del sur es más pequeño que en las especies del norte (Morescalchi 1977). Este hecho podría estar relacionado con la correlación inversa en anuros entre contenido de ADN nuclear y la velocidad de desarrollo embrionario: en animales con mayor tamaño del genoma la metamorfosis se completa más tarde que en las especies con genomas más pequeños.

La cantidad de ADN por núcleo muestra un alto grado de variabilidad interespecífica (2 a 25 pg/núcleo), incluso entre especies pertenecientes al mismo género y con un número similar de cromosomas (1,5 2,0 pg/núcleo) (Bachmann *et al.* 1978; Olmo *et al.* 1978).

Por ejemplo, se ha estimado que el contenido relativo de ADN en las especies *B. bufo*, *B. viridis* y *E. calamita* es 6,03, 4,69 y 4,16 pg/núcleo respectivamente (Vinogradov 1998)). Por otro lado, el contenido relativo de ADN por núcleo en estas tres especies se corresponde con el tamaño relativo de sus cromosomas. De hecho, los cromosomas de *B. bufo*, *B. viridis* y *E. calamita* guardan respectivamente la siguiente proporción: 1,49:1,07:1,00; exceptuando los 5 pares de cromosomas pequeños que presentan un tamaño similar en *B. viridis* y *E. calamita* (Figura 2) (Ullerich 1965; Ullerich 1966).

Podría pensarse que las diferencias de tamaño entre los genomas de distintas especies están relacionadas con diferencias en los patrones de heterocromatina. Sin embargo, no existen evidencias claras de ello, ya que el número de bandas C y Q por cromosoma es el mismo en las tres especies de la familia Bufonidae (Schmid 1978). Dado que las diferencias en el contenido de ADN no pueden atribuirse a la heterocromatina constitutiva visible, es posible que las diferencias se deban al ADN moderadamente repetitivo.

2.5.3. Organización genómica

Los primeros trabajos sobre organización genómica señalan que el aumento de tamaño del genoma parece estar relacionado con el aumento en la cantidad de ADN repetitivo (Straus 1971; Morescalchi *et al.* 1974; Rosbash *et al.* 1974). Esta hipótesis se confirmó mediante estudios de cinética de reasociación del ADN y el análisis de su composición mediante centrifugación en gradiente de CsCl.

En anfibios urodelos la centrifugación en gradiente de CsCl diferencia 3 fracciones: mayor, menor y satélite, mientras que en anuros solo se observan 2, no habiéndose encontrado la fracción correspondiente al ADN satélite. La ausencia de la fracción de ADN satélite en anuros indica que el ADN repetitivo de estos animales probablemente presente una composición similar a la del resto de genoma. De este modo, independientemente de si este ADN satélite se encuentra disperso en el genoma u organizado en tándem, pasará desapercibido en experimentos de centrifugación en gradiente de CsCl.

El análisis de las curvas de reasociación de fragmentos de ADN pequeños también revela diferencias entre especies. Así, la diferencia entre el tamaño de genoma de *X. laevis* y *B. bufo* (3 y 7 pg por genoma respectivamente) probablemente se deba a diferencias en la fracción de ADN altamente y moderadamente repetido, ya que el contenido en ADN de copia única es muy similar en las dos especies (1,5 pg por genoma haploide) (Baldari *et al.* 1976, 1977).

El ADN moderadamente repetido parece ser el principal responsable de los cambios en el contenido de ADN, aunque las estructuras repetidas son muy distintas en cada caso. Las especies con alto contenido de ADN/núcleo, como *B. bufo*, presentan secuencias de copia única más cortas (760 pb) que las especies con menor cantidad de ADN/núcleo, como *X. laevis*, con secuencias de copia única más largas (1600 pb). Por otro lado, el tamaño medio de las secuencias de ADN repetitivo no varía en longitud a lo largo de la evolución (300-400 pb), pero sí en número de copias. Esto explica por qué las 11 parejas de cromosomas de la familia Bufonidae han mantenido su morfología, con todos los cromosomas metacéntricos o submetacéntricos a lo largo de la evolución de la familia Bufonidae, aunque muestran distinto tamaño cuando se comparan entre especies.

3. ADN Repetitivo

La cantidad de ADN por genoma (valor C) es característica de cada especie, pudiendo variar no solo entre organismos de grupos taxonómicos diferentes, sino entre especies próximas. El tamaño del genoma de un organismo no está directamente relacionado con su complejidad. De

INTRODUCCIÓN

hecho, a medida que aumenta la complejidad de los organismos los rangos de tamaño de los genomas son más amplios (Figura 3).

A excepción de las plantas, los anfibios constituyen el grupo de organismos en el que el rango de variación de la cantidad de ADN es más amplio. La gran diferencia en el tamaño del genoma de estos animales probablemente se deba al ADN repetido. En humanos entre el 5% y 10% del genoma está constituido por secuencias de copia única. De éstas, las secuencias que codifican para proteínas representan el 2% del total, incluyendo regiones intergénicas, intrones y secuencias reguladoras (20.000 y 25.000 genes) (Lander *et al.* 2001). El resto del genoma representa el ADN repetitivo y secuencias no codificantes.

El porcentaje de ADN repetitivo (fragmentos de ADN que están presentes en múltiples copias en el genoma) puede variar en eucariotas entre el 30% y el 99% del genoma (Elgar *et al.* 2008). Estas secuencias presentan un alto número de polimorfismos debido a la variación en el número de unidades de repetición. Además, las secuencias repetitivas son elementos dinámicos que pueden

modificar el genoma en el que se encuentran mediante la generación de reordenamientos, invadiendo o arrastrando genes y modulando el patrón de expresión de éstos. Este dinamismo da lugar a divergencias evolutivas que se pueden utilizar en la identificación de especies, la inferencia filogenética o en estudios de mutaciones esporádicas y selección natural. De este modo, la hipervariabilidad entre las secuencias de ADN repetitivo de organismos relacionados y no relacionados convierte a estas secuencias en excelentes marcadores filogenéticos.

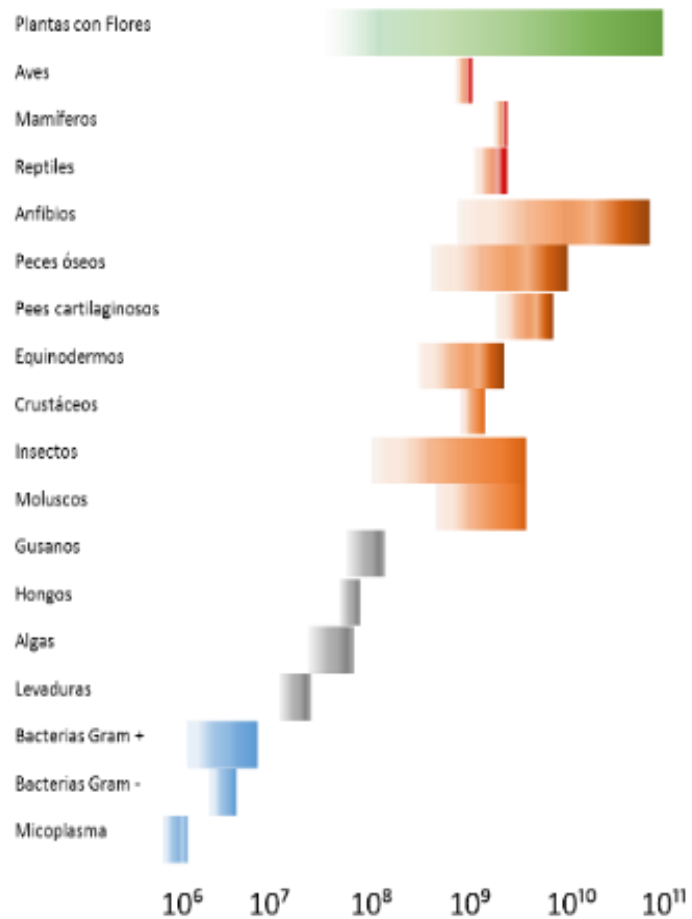


Figura 3. Rango de variación en el tamaño del genoma haploide (pb) en diferentes grupos de organismos.

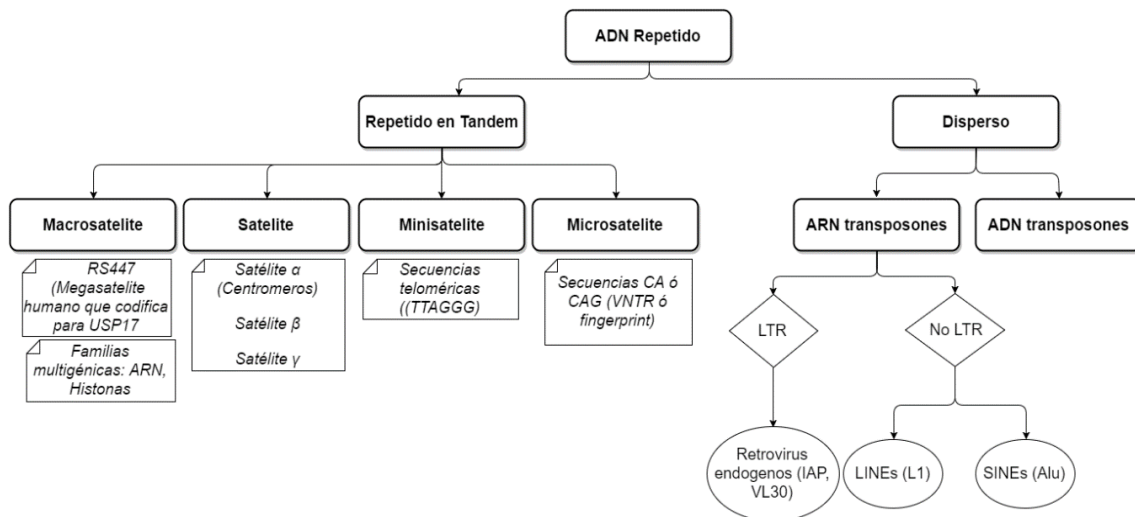


Figura 4. Clasificación de ADNs repetitivos. Tomado de Pathak y Ali (2012), con algunas modificaciones.

3.1. Clasificación del ADN repetitivo

Existen numerosos criterios para clasificar al ADN repetitivo: según el número de copias que presenta, por la forma en la que está organizado, según su función, o según forme parte o no de la heterocromatina. Ninguno de estos criterios se adapta completamente a todos los casos, y siempre es posible encontrar excepciones. En esta tesis hemos adoptado la clasificación propuesta por Pathak y Ali (2012) con algunas modificaciones (Figura 4).

Según esta clasificación, el genoma total puede dividirse en dos grandes grupos de secuencias:

- Secuencias de copia única; representan la fracción menor del genoma y están presentes en una o pocas copias por genoma. Entre estas secuencias se incluyen las secuencias que codifican para proteínas, las secuencias reguladoras, los espaciadores y los intrones.
- Secuencias repetidas; se encuentran entre 10 y más de 10^6 copias por genoma. Su tamaño es muy variable, entre pocas pares de bases y unas 5kb, aunque estas últimas son poco frecuentes (el tamaño medio es de 300 pb). Independientemente del tipo de secuencias o de su tamaño, éstas pueden estar dispersas por el genoma, o pueden estar agrupadas en tándem.

Dentro de los ADNs repetidos solía considerarse la categoría de ADNs satélite, en la que se incluyen moléculas de ADN repetido organizadas en tándem que forman heterocromatina, independientemente de la longitud del monómero, de su secuencia, de la complejidad o de su abundancia. Hoy día se sabe que los ADNs satélite, repetitivos inicialmente identificados mediante centrifugación en gradiente de CICs, también pueden localizarse en regiones eucromáticas. Por este motivo, hemos optado por no separar a los ADNs satélite en un grupo

INTRODUCCIÓN

independiente, clasificando a los **ADNs repetidos organizados en tándem** en función del tamaño de la unidad que se repite en:

Microsatélites: también conocidos como SSRs (“simple sequence repeats”) o STRs (“short tandem repeats”). Se pueden encontrar tanto en regiones codificantes como no codificantes, incluidas las secuencias reguladoras. Las repeticiones en tándem de tri- o hexa- nucleótidos son más frecuentes en las regiones codificantes, ya que no afectan el marco de lectura. Estas secuencias presentan una alta tasa de variación en el número de copias, y una tasa de mutación entre 10 y 10⁵ veces superior a la del resto del genoma. Esta particularidad hace de estas secuencias herramientas útiles para estimar la diversidad genética inter- e intrapoblacional. Los mecanismos implicados en su expansión/contracción son el deslizamiento sobre la hebra (“strand-slippage”) que puede tener lugar durante la replicación, y el entrecruzamiento desigual. Estas secuencias repetidas son elementos inestables del genoma que permiten la evolución, ya sea causando importantes desordenes genéticos, como ocurre con los síndromes de Huntington o el del X frágil (Orr H 2007), o permitiendo adaptaciones beneficiosas, como en el caso del promotor del receptor de la vasopresina, o como el microsatélite de *Drosophila melanogaster* implicado en la adaptación del ciclo circadiano y la compensación de temperatura.

Minisatélites: son secuencias algo más grandes que las anteriores, entre 6-100 pb por unidad repetida. Pueden estar organizadas en tándem (como ocurre en las regiones subteloméricas o pericentroméricas), pero también pueden estar dispersas en las regiones transcritas y reguladoras. En el genoma humano, y con un porcentaje similar en otros eucariotas, el 17% de los genes contienen repeticiones intragénicas en sus marcos de lectura abiertos (Gemayel *et al.* 2010).

Curiosamente, los minisatélites suelen predominar en los genes que codifican para proteínas extracelulares o de superficie celular, mientras que los microsatélite son más frecuentes en los genes implicados en la regulación, incluyendo algunos factores de transcripción y proteínas de unión a ADN y ARN (Legendre *et al.* 2007)

Satélite: El tamaño de las unidades monoméricas suele estar entre 100 y 1.000 pb. En general, se trata de secuencias de ADN altamente repetido agrupadas en tándem, que representan un porcentaje importante del genoma total, siendo el componente principal de la heterocromatina.

Entre los ADNs satélite más conocidos se encuentran:

- ✓ **El satélite centromérico:** se extienden sobre casi todos los centrómeros nativos y la heterocromatina pericentromérica circundante. Las secuencias de los satélites

INTRODUCCIÓN

centroméricos pueden variar no solo entre especies sino entre diferentes parejas de cromosomas. Este tipo de ADN repetitivo es fundamental para la función centromérica, permitiendo la compactación de la cromatina y la interacción con proteínas específicas. Paradójicamente, mientras que la función centromérica se conserva en todos los eucariotas, la secuencia de los ADNs satélite en esta región es casi siempre específica de especie (Plohl *et al.* 2008).

- ✓ **El satélite telomérico:** puede localizarse en la región telomérica y subtelomérica, y se asocia a las ribonucleoproteínas que forman el complejo que protege a los cromosomas impidiendo el acortamiento de los extremos por la replicación. La secuencia satélite telomérica es bastante conservada y consta de varios miles de repeticiones de hexanucleótidos (5'-TTAGGG-3' en todos los vertebrados analizados).

Macrosatélites: suelen ser secuencias largas, de ≈ 1 kb, repetidas en tándem a lo largo de varias Kb o Mb. A este grupo pertenecen varias familias multigénicas como:

- **ADN ribosómico:** es uno de los ejemplos más conocidos de familia multigénica. Juegan un papel importante en la síntesis de las proteínas que forman parte de los ribosomas. Constan de 3 genes ribosómicos (18S, 5.8S, 28S) y sus espaciadores internos (ITS) y externos (ETS), separados por un espaciador no transcrito (NTS) (los dos últimos constituyen el espaciador intergénico (IGS)). Los ADNs ribosómicos están organizados en unidades repetidas en tándem, que habitualmente se localizan en la NOR. El número de repeticiones en eucariotas varía entre 39 y 19.300 por genoma, y su evolución depende del componente que se analice. Así, por ejemplo, el ADNr 18S tiene una evolución muy lenta, mientras que los espaciadores presentan una tasa evolutiva muy alta. Esto permite utilizar las secuencias de los ADNr 18S y 28S como marcadores de grandes grupos filogenéticos, mientras que los espaciadores permiten distinguir relaciones filogenéticas entre especies próximas, siendo útiles en estudios poblacionales.
- **Histonas:** son genes organizados en tándem que codifican para proteínas implicadas en la correcta función y formación del nucleosoma. Suelen localizarse en grandes clústeres, aunque no siempre organizadas en tándem. El número de copias varía según la especie, aunque su secuencia es muy conservada.

En relación a los **ADNs repetidos dispersos**, éstos se originan a partir de transposones, secuencias que, por sí solas o con ayuda de otros elementos, son capaces moverse por el genoma. Se han encontrado transposones, o restos degenerados de éstos, en todos los

INTRODUCCIÓN

organismos analizados. Debido a su alta capacidad para moverse, son esenciales en la evolución del genoma, aunque su efecto puede ser tanto beneficioso como perjudicial. Así, dependiendo del sitio de inserción, pueden resultar beneficiosos generando nuevas funciones, o perjudiciales, provocando desórdenes genéticos (Konkel *et al.* 2010). De hecho, se consideran precursores de elementos importantes del genoma, como las secuencias teloméricas, y juegan un papel importante en la estructura de cromatina y en la regulación de la expresión génica y el control epigenético.

Según su mecanismo de transposición se pueden dividir en **retrotransposones** (transposones de ARN) y **transposones de ADN**. Entre los primeros destacan los LTRs (de las siglas en inglés de “Long Terminal Repeats”) y los no LTRs, también conocidos como LINEs (“Long Interspersed Nuclear Elements”) y SINEs (“Short Interspersed Nuclear Elements”). A la segunda clase pertenecen elementos como los transposones *Mariner* (poco frecuentes en el genoma humano (3%) pero muy abundantes en *Xenopus tropicalis* (Hellsten *et al.* 2010).

3.2. Organización del ADN repetido

Los ADNs repetitivos pueden estar distribuidos por el genoma en forma dispersa o pueden estar agrupados en tándem. Estos últimos, a su vez, pueden organizarse en forma de unidades complejas de repeticiones (HOR de las siglas en inglés de “higher-order repeats”) (Modi *et al.* 2004).

Las repeticiones de orden superior tienden a formarse en regiones con bajas tasas de recombinación, como ocurre en la heterocromatina, donde los monómeros repetidos tienden a formar repeticiones de orden superior a partir de dos o más monómeros y secuencias repetidas cortas, pudiendo ir acompañadas de inversiones de subunidades completas (Mravinac *et al.* 2005; Mravinac *et al.* 2010). Las HORs son el resultado de la homogeneización conjunta de variantes monoméricas adyacentes, que da lugar a repeticiones más largas que mantienen una alta similitud de secuencia entre HORs pero no entre los monómeros que las componen, preservando una estructura repetitiva de orden superior. Esto es lo que ocurre en el α -satélite humano, donde las unidades monoméricas y las HOR tienen distintas tasas evolutivas a la hora de acumular mutaciones, divergiendo las HORs mucho más rápido que los monómeros (Rudd *et al.* 2006).

Aunque los tamaños de los monómeros pueden ir desde solo unos pocos pb hasta la Kb, los tamaños de monómeros entre 150-180 y 300-360 pb parecen estar favorecidos evolutivamente. Estos tamaños se corresponden aproximadamente con la longitud de una hebra de ADN que envuelve a uno o a dos nucleosomas, por lo que esta preferencia para el tamaño de los

INTRODUCCIÓN

monómeros podría estar ligada a una función estructural de estos ADN repetitivos. De hecho, aproximadamente el 50% de las secuencias de ADN repetitivo estudiadas son capaces de formar estructuras terciarias lo suficientemente prominentes como para tener un significado estructural y/o funcional (Fitzgerald *et al.* 1994). Por otro lado, independientemente de la longitud de las unidades monoméricas, las inserciones y deleciones son escasas y la longitud del monómero frecuentemente permanece fija, por lo que es posible que sea necesario mantener un espaciamiento adecuado de los sitios funcionales de los monómeros.

Según todo lo anterior, no es de extrañar que los cambios en la secuencia nucleotídica de los ADN repetidos tengan lugar siempre y cuando la estructura general no se vea afectada. Esto es lo que ocurre con el satélite S1 de especies del género *Rana* (Picariello *et al.* 2002; Feliciello *et al.* 2005, 2006). Se trata en realidad de dos ADN satélite homólogos (S1a y S1b) originados por eventos de deleción diferentes. Ambos satélites se localizan en la misma región heterocromática y pueden recombinar entre ellos. Sin, embargo, las variantes repetidas de S1 difieren de la secuencia consenso genómica en un número limitado de posiciones variables (5-6 posiciones nucleotídicas de 70 posibles posiciones variables), mostrando todas las repeticiones diferentes combinaciones de bases variables. La presencia de un gran número de variantes con una variabilidad restringida podría indicar que la acumulación de mutaciones se produce, pero sólo en posiciones específicas de la unidad repetitiva. Esto implica la presencia de algún mecanismo que elimina las unidades repetidas con mutaciones en las posiciones “no permitidas”, seleccionando únicamente las unidades funcionales (por ejemplo, aquellas capaces de mantener una unión “correcta” con las proteínas de la cromatina). Según esto, la variabilidad intraespecífica de un ADN satélite estaría determinada por las restricciones estructurales y funcionales de éste, y no por su origen.

Otra particularidad observada con bastante frecuencia en los ADN repetidos es la presencia de secuencias duplicadas invertidas, tanto en el ADN satélite en general, como en las unidades monoméricas de éste. Estas secuencias duplicadas invertidas pueden ser reconocidas por diversos mecanismos de transposición, haciéndolas evolutivamente favorables e importantes para la dispersión del ADN repetitivo.

3.3. Función del ADN repetitivo

Los ADN repetidos son uno de los componentes más abundantes de los genomas eucariotas. A principio de los años 70s se consideraba que este componente del genoma era “ADN basura”. La ausencia de regiones codificantes para proteínas, la extrema diversidad de los ADN repetitivos y la falta de evidencia directa de cualquier función propició que el término de “ADN

INTRODUCCIÓN

basura” permaneciera durante un largo período de tiempo. Sin embargo, esta hipótesis no resolvía una pregunta clave: si los ADNs satélites y la heterocromatina no aportan ningún beneficio evolutivo, ¿por qué estas fracciones genómicas tan grandes no se pierden o disminuyen?

En las últimas décadas se han ido acumulando evidencias que apuntan a la importancia funcional del ADN repetitivo. De hecho, la alta variabilidad y la tasa de mutación de las secuencias repetitivas están en contraposición con la conservación y preservación evolutiva de la organización, tamaño y localización del ADN repetitivo.

En estas secuencias nunca se han encontrado marcos de lectura abiertos, y no se han identificado patrones típicos de traducción. Sin embargo, cada vez existen más evidencias sobre la importancia funcional de este tipo de secuencias, apoyadas por su transcripción activa y por la presencia de promotores activos y sitios de unión para factores de transcripción. Por el momento no se conoce el papel funcional de la mayoría de los transcritos identificados, aunque se propone su implicación en la modificación epigenética de la cromatina, en la regulación de la expresión de genes, en la actividad de ribozimas y en el reclutamiento de factores para el corte y empalme del ARN, como ocurre con el satélite III en humanos. Estos ejemplos sugieren un papel activo de los transcritos de ADNs repetitivos en la modulación de la cromatina, en la regulación de la transcripción y en la maduración de los transcritos. Dado que la transcripción de la mayoría de los ADNs repetidos se regula de forma temporal y específica de tejido, es plausible que estos transcritos sean responsables del ajuste fino de la expresión génica (Ugarkovic 2005).

Finalmente, la dinámica evolutiva de los ADN repetitivos puede ampliar la barrera reproductiva entre diferentes grupos de organismos, favoreciendo la aparición de secuencias nuevas y promoviendo de esta forma la especiación, como indican los trabajos sobre ADN repetido en híbridos (Malik *et al.* 2001; Ferree *et al.* 2009).

3.4. Modelos de evolución de ADN repetidos

La evolución de un ADN repetitivo está determinada por una compleja red de interacciones que dependen de la propia secuencia del ADN repetitivo, de sus interacciones funcionales, de su ubicación en el genoma, de la tasa de homogeneización/fijación y de factores poblacionales (Navajas-Perez *et al.* 2009). Es por esto que un mismo ADN repetitivo puede presentar diferencias en la dinámica de las secuencias y distintas tasas de evolución, no solo entre especies

INTRODUCCIÓN

diferentes, sino entre distintas agrupaciones de secuencias localizadas en varias regiones del mismo genoma (Kuhn *et al.* 2008).

A continuación, se indican los principales modelos evolutivos propuestos para explicar cómo cambian las secuencias de ADN repetitivo a lo largo del tiempo.

3.4.1. Evolución Concertada

En general, cualquier secuencia de ADN acumula mutaciones a lo largo del tiempo, de modo que dos secuencias divergen con una tasa inversa a las limitaciones impuestas por dichas secuencias.

Inicialmente se supuso que el ADN repetitivo seguía un modo de evolución neutral. Sin embargo, la divergencia entre monómeros generalmente es más baja de lo que cabría esperar teniendo en cuenta la tasa de mutación. Esta homogeneidad de las secuencias de ADN repetitivo es el resultado de una evolución no independiente de las unidades que se repiten. Esto significa que las mutaciones no se acumulan de forma independiente en las secuencias monoméricas, sino que se propagan entre unidades repetidas o se eliminan. Este modo particular de evolución, conocido con el nombre de evolución concertada (“molecular drive”), surge como consecuencia de dos procesos: 1) la homogeneización de las secuencias de un genoma mediante mecanismos de transferencia no recíproca de secuencias, y 2) la fijación de los cambios en la población mediante su propagación a todos los individuos como el resultado de la reproducción sexual (debido al reordenamiento aleatorio del material genético que tiene lugar en la meiosis y en la segregación cromosómica) (Dover *et al.* 1982; Dover *et al.* 1986).

La baja variabilidad entre las unidades monoméricas del ADN repetitivo es, por tanto, el efecto neto de dos procesos contrarios, la acumulación de mutaciones, por un lado, y su velocidad de propagación o eliminación por el otro.

En organismos aislados reproductivamente los ADNs repetitivos evolucionan de forma divergente porque la tasa a la que ocurre la homogeneización intraespecífica es mayor que la tasa a la que aparecen mutaciones, pero menor que la tasa de fijación. De esta forma la evolución concertada da lugar a una homogeneización intraespecífica y una divergencia interespecífica de las secuencias repetidas mayor que en otras regiones del genoma.

Según el modelo de evolución concertada, las mutaciones se acumulan y se propagan gradualmente dentro de los ADN repetidos, permitiendo detectar las tasas de divergencia en la especie (Bachmann *et al.* 1993; Garrido-Ramos *et al.* 1999), la población o el ecotipo (Hall 1999).

INTRODUCCIÓN

Si en la evolución concertada no tiene lugar la fijación, como ocurre en organismos con reproducción asexual, la variabilidad de los monómeros del ADN repetitivo es comparable en todos los niveles taxonómicos (Mantovani 1998; Lorite *et al.* 2004). Por otro lado, en los casos en los que no existe homogeneización de secuencias, se produce una evolución no concertada del ADN repetitivo, con acumulación de mutaciones sin posibilidad de propagación o eliminación. Este es el patrón que se observa en el ADN repetitivo de organismos con un número limitado de reproductores, como las termitas (Luchetti *et al.* 2006). Por consiguiente, estos ADNs repetitivos se conservan durante largos periodos evolutivos, en los que predomina la acumulación de mutaciones, una propagación limitada y una evolución no concertada.

3.4.2. Bibliotecas de ADNs repetidos

Las diferencias en la composición de las secuencias de ADN satélite entre especies estrechamente relacionadas pueden explicarse como consecuencia de la evolución gradual de estas secuencias en linajes separados (Dover *et al.* 1982; Strachan *et al.* 1985; Dover *et al.* 1986).

Existe, sin embargo, una hipótesis que permite explicar diferencias en la aparición de un perfil específico de especie a partir de amplificaciones y/o contracciones diferenciales en un conjunto de secuencias compartidas por genomas relacionados (Fry *et al.* 1977). Las primeras evidencias experimentales a favor de esta última hipótesis se encontraron en el género *Palorus* (Mestrovic *et al.* 1998). Los cuatro ADNs satélite altamente repetidos específicos de especie identificados en el género *Palorus* en realidad están presentes en bajo número de copias en todas las especies analizadas. Cuando se comparan las variantes monoméricas del ADN altamente repetido de una especie con el mismo ADN repetido de otra especie en la que está en bajo número de copias, se observa una alta conservación interespecífica de las secuencias y una completa ausencia de mutaciones diagnósticas de especie (Mestrovic *et al.* 1998).

Actualmente se cree que este modelo de evolución probablemente representa el modo más común de evolución del ADN repetido (Lin *et al.* 2006; del Bosque *et al.* 2011; Quesada del Bosque *et al.* 2013; Rojo *et al.* 2015).

A modo general, la biblioteca de ADNs repetidos representa una fuente permanente de secuencias que coexisten en el genoma de la especie y que pueden amplificarse de forma independiente en ADNs altamente repetidos o dominantes. Estas bibliotecas no solo estarían formadas por diferentes ADNs repetidos, sino también por variantes de monómeros de un solo repetitivo (bibliotecas de variantes), que podrían estar distribuidas en número de copias variable en especies relacionadas (Cesari *et al.* 2003).

INTRODUCCIÓN

Estos resultados sugieren dos fases diferentes en la evolución del ADN repetitivo:

- En la primera fase se constituye la biblioteca, formándose un conjunto de nuevos ADNs repetitivos a partir de un ancestro común, que cambiarían impulsados por una evolución concertada y modulados por restricciones funcionales.
- Durante la segunda fase, las secuencias de ADN repetitivo permanecen conservadas durante largos periodos, sometiéndose posteriormente a amplificación diferencial en genomas relacionados. Los análisis de mutaciones sugieren que en la segunda fase se acumulan cambios, pero éstos no se propagan entre los monómeros. Según estos datos, los mecanismos de homogeneización actuarían sobre el conjunto de monómeros de ADNs repetitivos favoreciendo la persistencia de secuencias ancestrales.

En algunos casos particulares las variaciones en el número de copias que presentan distintas variantes de un ADN repetitivo centromérico están relacionadas con la evolución cariotípica de los cromosomas (Bulazel *et al.* 2007). Así, las contracciones en los ADNs satélite centroméricos suelen asociarse a fusiones cromosómicas, mientras que las expansiones de estos ADNs satélite son consecuencia de eventos de translocación.

Las bibliotecas de ADNs repetitivos contribuyen a la estabilidad genómica al mismo tiempo que ofrece una variabilidad significativa a través del proceso de amplificación diferencial de las variantes. Según esto, las altas tasas de cambios de secuencias observadas durante la evolución concertada no son la única causa posible que puede explicar la diversidad entre ADNs repetitivos de especies relacionadas. Por otro lado, la distribución de los ADNs repetitivos en la biblioteca, en términos de presencia/ausencia en genomas relacionados, puede utilizarse como estudio complementario de la filogenia (Meštrović *et al.* 2009).

3.4.3. Evolución de las familias multigénicas por el modelo de “nacimiento y muerte génica”.

La mayoría de familias multigénicas y las secuencias asociadas a éstas presentan demasiada diversidad intraespecífica (genética y funcional), una característica que no es coherente con la existencia de un mecanismo de homogeneización como el que se espera en la evolución concertada. Para explicar esta elevada diversidad intraespecífica se ha propuesto un nuevo modelo de evolución por nacimiento y muerte génica (“birth and death”) (Nei *et al.* 1992). Este modelo se basa en niveles diferenciales de duplicación de genes y la subsiguiente pérdida o mantenimiento de copias de genes dentro de una familia multigénica. Algunos ejemplos de este tipo de evolución del ADN repetido los encontramos en familias multigénicas como la de las histonas o el ADNr.

INTRODUCCIÓN

Cuando la duplicación da lugar a nuevas copias de un gen y estas copias no evolucionan por ningún otro modelo, algunas de las copias pueden persistir en el genoma durante largos períodos de tiempo. Eventualmente, las copias divergen de tal manera que ya no son idénticas ni poseen extensas regiones de similitud. Por otro lado, algunas copias del gen original pueden degenerar en pseudogenes o pueden ser eliminadas del genoma.

Si no se realiza un análisis exhaustivo y no ha pasado suficiente tiempo para la divergencia de los genes duplicados, este modelo puede pasar desapercibido o confundirse con el de evolución concertada. En los genes codificadores de proteínas la causa de la restricción de secuencias puede ponerse de manifiesto analizando los niveles de divergencia de los sitios sinónimos frente a los no sinónimos, que revelarán si se deben a la selección purificadora y no la evolución concertada. De hecho, bajo selección purificadora los sitios sinónimos también presentan divergencia, incluso cuando los sitios no sinónimos no muestran ninguna variación (Piontkivska *et al.* 2002). En el caso de las secuencias no codificantes, como los ADNr y los espaciadores, el análisis es aún más complejo ya que es necesario el estudio de sustituciones nucleotídicas y la comparación entre divergencias de regiones conservadas y de los intrones, espaciadores intergénicos y regiones flanqueantes (Rooney 2004).

Teniendo en cuenta que este modelo evolutivo eventualmente puede actuar después o en combinación con la evolución concertada (Nei *et al.* 2005; Teruel *et al.* 2014), puede concluirse que la evolución del genoma repetido es un proceso complejo en el que pueden interactuar combinaciones de modelos y mecanismos evolutivos que aún están por descubrir.

3.5. Mecanismos implicados en la homogeneización de las secuencias

La homogeneización del ADN repetitivo se produce por mecanismos de transferencia no recíproca de secuencias como ocurre en: entrecruzamientos desiguales (Dover *et al.* 1986), conversión génica (Smith 1976; Mravinac *et al.* 2005; Glinka *et al.* 2006), replicación por el modelo del círculo rodante (Walsh 1987; Feliciello *et al.* 2006; Cohen *et al.* 2009), y transposición (Okumura *et al.* 1987; Miller *et al.* 2000; Cafasso *et al.* 2003).

✓ Cruzamiento desigual

La tasa de recombinación por entrecruzamientos desiguales en secuencias repetidas depende de factores como la divergencia entre los monómeros, la longitud total del ADN repetido y su posición en el cromosoma. Todos estos factores conducen a la diferenciación de grupos determinados de ADN repetido.

INTRODUCCIÓN

Por norma general, la eficiencia de recombinación disminuye a medida que aumenta la divergencia entre las secuencias. Sin embargo, en el α -satélite se ha demostrado que el entrecruzamiento desigual entre monómeros tolera hasta un 30% de divergencia entre las secuencias. Este umbral puede variar según el ADN repetitivo, pero las partes conservadas de las secuencias monoméricas podrían ser suficientes para que éstas recombinen.

✓ Conversión génica

La conversión génica es otro mecanismo de recombinación homóloga que se considera implicado en la homogeneización de repeticiones en tándem. Puede ser fácilmente identificada en secuencias de ADN repetido en forma de tramos de mutaciones compartidas por un grupo de variantes monoméricas, a menudo de longitud más pequeña que el monómero (Mravinac *et al.* 2005).

✓ Transposición

Ésta se ha observado tanto en animales (Miller *et al.* 2000), como en plantas (Cafasso *et al.* 2003). Este mecanismo presenta estrecha relación con distintos transposones, ya que éstos en su estructura pueden contener regiones hipervariables con pequeñas secuencias repetidas o regiones de secuencias invertidas, ambas susceptibles de ser amplificadas como ADN satélite. Aunque la similitud entre transposones y algunas secuencias monoméricas de ADN repetido es evidente, no se conoce el mecanismo exacto de amplificación, por lo que no puede descartarse que los fragmentos de ADN repetitivo sean capturados por elementos genéticos móviles (Kejnovsky *et al.* 2006).

✓ Círculo rodante

Las secuencias de ADN repetido pueden ser un componente común del ADN extracromosómico circular. Es por esto que se supone que en la evolución de las repeticiones del ADN repetitivo juegan un papel importante la escisión, la replicación por el método del círculo rodante y la reinserción del ADN extracromosómico circular (Walsh 1987; Cohen *et al.* 2009).

Algunos autores van más allá y proponen que este mecanismo sirve no solo como motor para la homogeneización de las secuencias en la evolución concertada, sino que está implicado en los procesos de reparación y mantenimiento de la funcionalidad de ADNs repetitivos heterocromáticos (Felicciello *et al.* 2006).

Según el mecanismo propuesto por Walsh (1987), la homogeneización por el círculo rodante es un proceso ocasional y al azar, que conlleva la rápida expansión de mutaciones en las posiciones

INTRODUCCIÓN

invariables y causa una pérdida de la estructura específica del satélite. Esto no es lo que ocurre con el satélite S1 de *Rana*, en el que las unidades repetidas se amplifican selectivamente reemplazando a las unidades “funcionalmente mutadas”. Teniendo en cuenta la alta variabilidad en la organización de este ADN satélite, podría tratarse de un nuevo mecanismo de reparación del ADN satélite, frecuente y altamente direccional. Este mecanismo no requiere de la desnaturalización de la heterocromatina, ya que puede actuar reconociendo las unidades repetidas no funcionales, reemplazándolas por bloques de unidades repetidas funcionales. Al permanecer la heterocromatina siempre ensamblada se evita la recombinación no homologa de las unidades repetidas, manteniendo así el cariotipo de forma estable.

3.6. Dinámica evolutiva del ADN repetitivo

Comprender la dinámica de los ADNs repetitivos es importante por dos razones. En primer lugar, porque al constituir estas secuencias una fracción significativa de los genomas, conocer los mecanismos que controlan su número de copias ayudará a entender por qué los genomas eucariotas difieren tanto en tamaño, estructura y función. En segundo lugar, porque la dinámica evolutiva del ADN repetitivo puede ayudar a descifrar la interacción entre los factores selectivos y neutros en la evolución de los genomas, un aspecto muy polémico en el campo de la genómica comparativa. Al mismo tiempo, debe tenerse en cuenta que las restricciones evolutivas impuestas tanto en la longitud de los monómeros como en la estructura inducida por la curvatura de la hélice de ADN pueden explicar la forma en la que evolucionan algunos ADNs repetitivos (Plohl *et al.* 1998).

En la secuencia nucleotídica de los ADNs repetitivos suelen quedar reflejadas marcas características que permiten el seguimiento de su historia evolutiva y la contribución de cada uno de estos mecanismos en su evolución. De este modo, en los ADNs repetidos se pueden identificar distintos patrones evolutivos:

✓ **Diversificación intragenómica de ADNs repetitivos en tándem**

Los monómeros de ADNs repetitivos pueden formar grupos o subfamilias, de modo que es posible observar mayor grado de similitud entre repeticiones adyacentes que entre repeticiones obtenidas al azar. Esto indica que la eficiencia de la homogeneización es mayor entre monómeros adyacentes, menor entre distintos clústeres del mismo cromosoma, y aún menor entre clústeres de cromosomas homólogos o heterólogos (Plohl 2010). Como consecuencia, se produce una acumulación de divergencias entre distintos clústeres del mismo ADN repetitivo. Es decir, los ADNs repetitivos pueden presentar alta divergencia dentro del genoma, llegando a

INTRODUCCIÓN

formar variantes monoméricas específicas de cromosomas o subfamilias. Esta acumulación de divergencias reduce la eficiencia de homogeneización, hasta que finalmente llega a suprimirla por completo. Así, por ejemplo, las variantes mutadas en los extremos de las repeticiones en tándem largas pueden amplificarse en un nuevo ADN repetitivo, ya que son demasiado divergentes para ser homogeneizadas junto con el clúster original (Mravinac *et al.* 2007).

✓ Homogeneidad genómica de los ADNs repetitivos en tándem

Algunos ADN repetidos no muestran signos de diversificación intragenómica, sino que se muestran uniformemente homogeneizados en todos los cromosomas.

El ADN satélite S1 en *Rana* es un ejemplo claro de la implicación de distintos procesos de homogeneización en la evolución del ADN repetitivo (Feliciello *et al.* 2006). La estructura y la secuencia de las repeticiones S1 son homogéneas en el genoma de distintas especies del género *Rana*. Esta homogeneidad del ADN repetitivo S1 dentro de cada genoma y cada especie indica la presencia de un mecanismo de evolución concertada que mantiene una secuencia consenso característica en todos los individuos de la misma especie (explicado más adelante). Por otro lado, la heterogeneidad restringida a unas posiciones de las variantes monoméricas (variabilidad no aleatoria, Apartado 3.2) es responsable de la homogeneidad de las variantes repetidas en individuos de diferentes poblaciones de la especie. El mantenimiento de la misma variabilidad no aleatoria en todas las poblaciones, incluso cuando éstas están separadas por barreras geográficas que impiden el flujo genético recíproco, indica que la estructura de las repeticiones específicas se ha mantenido en cada especie mediante un mecanismo no estocástico.

La homogeneidad intraespecífica del ADN repetitivo S1a en muestras de la especie *R. temporaria* obtenidas de poblaciones aisladas geográficamente no se puede explicar por recombinación homóloga, cruzamiento desigual o conversión génica entre unidades repetidas de un ADN satélite (ver apartado 3.5), dado que cada una de las de variantes repetidas encontradas en una población tiene una distribución diferente de mutaciones en las mismas posiciones variables. Para explicar esta homogeneización se propone la acción conjunta de un mecanismo de amplificación por círculo rodante (extra- o intra-cromosómico), seguido por la inserción/sustitución-reparación por recombinación homóloga de las repeticiones amplificadas en el genoma (Feliciello *et al.* 2005, 2006).

Las expansiones o contracciones rápidas de subpoblaciones de unidades repetidas específicas de cada población pueden ocurrir mediante la producción de matrices amplificadas que reemplacen segmentos de ADN satélite con una organización diferente mediante

INTRODUCCIÓN

recombinación homóloga. De esta forma, la amplificación aleatoria de unas variantes con mutaciones determinadas en posiciones variables causaría la expansión rápida de estas variantes. Por otro lado, únicamente serían amplificadas y utilizadas para reemplazar las variantes defectuosas aquellas variantes que mantengan intacta su función. Esto explicaría la presencia en la especie de un número muy grande de variantes repetidas con una variabilidad restringida en las posiciones nucleotídicas que cambian.

✓ **ADNs repetitivos conservados evolutivamente**

Algunos ADN repetitivos pueden presentar bajas tasas de evolución, permitiendo diferenciar rangos taxonómicos más altos, como el género o la familia. En estos ADNs repetitivos las diferencias intraespecífica e interespecífica son similares, indicando que estas secuencias de ADN han persistido en los genomas durante largos períodos evolutivos (Plohl 2010). Esta estabilidad podría explicarse si algunos monómeros presentan ventajas evolutivas (ya sea por una posible función, por una combinación de nucleótidos o por una particularidad estructural) de modo que estas secuencias se ven favorecidas por los mecanismos de homogeneización (Strachan *et al.* 1985). Otra posibilidad es que la baja frecuencia de recombinación de la heterocromatina, junto con otros factores biológicos-reproductivos de la especie, ralenticen los procesos de mutación, homogeneización y fijación de las secuencias de ADN satélite (Luchetti *et al.* 2006).

3.7. Ejemplos de ADNs repetitivos en anuros

Los ADNs repetitivos y la heterocromatina siguen siendo los compartimentos genómicos menos comprendidos por tres motivos:

- Falta de interés causada por su inicial identificación con ADN basura.
- Evolución peculiar, que se rige por reglas y mecanismos diferentes a los que afectan a cualquier otro componente genómico.
- Organización en tándem de secuencias repetidas que dificulta su secuenciación, ensamblaje y mapeo, por lo que son subestimados notablemente (Wang *et al.* 2008).

A pesar del gran número de secuencias repetitivas descritas gracias a la secuenciación masiva, los estudios centrados en la organización, la localización, la función, el origen y la evolución de éstos, son escasos y revelan una alta complejidad en su evolución (Plohl *et al.* 2012). Estas dificultades pueden resolverse en parte por los métodos clásicos de búsqueda de ADNs repetidos en tándem, que permitan analizar la estructura compleja de estas secuencias de ADN.

INTRODUCCIÓN

A continuación, se resumen algunos ADNs repetitivos identificados en anfibios utilizando métodos clásicos para su búsqueda:

ADNs repetitivos derivados de transposones

El ADN altamente repetido R.e./Tc1 de *Rana esculenta* está organizado en tándem y su unidad monomérica presenta una estructura compleja: la región interna de 40 pb, que probablemente deriva de la transposasa Tc1 de *Haematobia irritans*, se encuentra flanqueada por repeticiones directas de 9 pb, seguidas de otra región de 22 pb homóloga al gen del síndrome de Werner de *Homo sapiens* (Pontecorvo *et al.* 2000). La unidad monomérica tiene una longitud de 650 pb y presenta altos niveles de metilación en las citosinas del par CpG. Se localiza en los centrómeros de cuatro parejas cromosómicas.

ADNs repetitivos derivados de secuencias teloméricas: ITRs

En algunas especies del género *Xenopus* (incluida *Xenopus tropicalis*) es posible observar secuencias teloméricas en posiciones intersticiales. Así, por ejemplo, en *X. borealis* y *X. muelleri* estas secuencias teloméricas se localizan en la posición de la NOR, mientras que en el cariotipo de *X. clivii* se observan múltiples señales intersticiales no necesariamente asociadas a telómeros ancestrales, y que probablemente forman parte de otros ADNs altamente repetidos (Nanda *et al.* 2009).

ADN Satélite 1 de *X. laevis*

Uno de los componentes principales del genoma de *X. laevis* es un ADN repetitivo llamado Satélite 1 (puede representar hasta el 1,35% del total) que se encuentra altamente conservado en ésta y otras especies relacionadas (*X. borealis* y *X. muelleri*) (Lam *et al.* 1983). La unidad monomérica tiene una longitud de unos 750 pb, aunque puede llegar a 1.050 pb por la presencia de inserciones en algunas variantes (Pasero *et al.* 1993), y presenta una estrecha relación con las SINEs (Okada 1991). Este ADN repetitivo está organizado en tándem formando largos arrays que se transcriben en los oocitos (Ackerman 1983). La organización compleja que presenta el ADN satélite 1 dentro de los clústeres le permite adoptar una curvatura intrínseca en la hélice de ADN. Esta curvatura es altamente conservada y está asociada con la estructura de la fibra cromatínica y, por consiguiente, con su función.

ADN satélite pBv en *B. viridis*

La unidad monomérica del ADN repetitivo pBv de *B. viridis* tiene una longitud de 420 pb y un contenido bajo en A+T (45.9%) (Odierna *et al.* 2004). pBv está presente en todas las poblaciones de *B. viridis* analizadas, mostrando el mismo patrón de bandas que en *B. bufo* y *B. mauritanicus*, pero diferente al de *B. regularis*, o al de otros dos miembros de la familia Bufonidae,

INTRODUCCIÓN

Wolterstorffina sp. y *Werneria mertensi*, en los que solo se observa hibridación para los monómeros. Estas secuencias se encuentran dispersas por todos los cromosomas de *B. viridis*, aunque también se observa una fuerte señal positiva en la región pericentromérica del brazo corto del tercer par cromosómico.

ADN satélite S1 en el género *Rana*

El ADN S1 es un ADN repetitivo identificado en distintas especies del género *Rana* (*R. graeca*, *R. italica*, *R. temporaria*, *R. dalmatina*, *R. pirenaica*, *R. arvalis*, *R. camerani*, *R. holtzi*, *R. macrocnemis* y *R. m. tavasensis*) pero no en *Pelophylax kl. esculentus* (Rosati et al. 1993), siendo uno de los ADNs satélites de anfibios mejor caracterizados (secuencias, organización, localización, evolución, especificidad etc) (Cardone et al. 1997; Picariello et al. 2002; Feliciello et al. 2005, 2006; Picariello et al. 2016).

Un estudio detallado revela que en realidad son dos ADNs satélites relacionados: S1a (con 494-476 pb) y S1b (con 363-281 pb) ambos ligeramente ricos en A+T%. En algunas especies como *R. temporaria* y las ranas de Anatolia (*R. macrocnemis*, *R. macrocnemis tavasensis*, *R. camerani* y *R. holtzi*) solo está presente el ADN S1a. Los satélites S1a y S1b se organizan en agrupaciones separadas, pero también pueden formar unidades complejas compuestas de una o más copias de cada uno de los satélites. Cuando ambos satélites están presentes, muestran distintos patrones de bandas en el "Southern Blot", lo que indica que ambos repetitivos presentan organizaciones diferentes en cada una de las especies. Así, por ejemplo, S1a es más abundante en *R. graeca* que en *R. italica*; en *R. italica* predominan los arrays separados de cada uno de los satélites (S1a y S1b), mientras en *R. dalmatina* solo una pequeña fracción de S1 está organizada en tándem separados, prevaleciendo los largos tándem de combinación de ambos (S1a-S1b). En conjunto representa aproximadamente entre 2% y 0,1% del genoma total en distintas especies, siendo este repetitivo más abundante en las especies europeas que en las ranas de Anatolia.

No se observan diferencias significativas entre las secuencias nucleotídicas de las unidades S1a de todas las especies, pero sí en las S1b. El análisis de estas secuencias revela que el satélite S1b deriva del S1a por una delección de 213 pb en *R. italica*, de 133 pb *R. graeca* y de 162 pb en *R. dalmatina*, siendo la similitud entre las regiones correspondientes de ambos repetitivos aproximadamente del 97%. Estos datos indican que el satélite S1b podría haberse originado a partir de la repetición S1a por delecciones completamente diferentes en cada una de las especies. Por otro lado, todas las secuencias S1a parecen haberse originado a partir de un ancestro común.

INTRODUCCIÓN

S1 presenta una distribución cromosómica específica en cada especie. Así, en *R. italica* se localiza principalmente en las regiones centroméricas y pericentroméricas de todos los cromosomas, mientras que en *R. graeca* estas secuencias se localizan en posición pericentromérica de cuatro parejas cromosómicas (1p/1q, 4p, 5p y 8q).

ADNs repetitivos en *Discoglossus*

pDS

El ADN satélite pDS está presente en 4 especies de *Discoglossus* (*D. pictus*, *D. galganoi*, *D. montalentii* y *D. sardus*) (Odierna *et al.* 1999). La unidad monomérica de este ADN satélite es de 288 pb, es ligeramente rico en A+T (58,3%) y está organizado en tándem. La hibridación sobre cromosomas de *D. pictus* muestra una distribución dispersa por todos los cromosomas y, ocasionalmente, en regiones centroméricas y pericentroméricas de algunos cromosomas.

Dp-Sat1

La digestión del ADN genómico de *D. pictus* con distintas enzimas (*SpeI* y *HindIII*), pone de manifiesto bandas de ADN repetido. La clonación y el análisis de las secuencias obtenidas reveló que se trata de un ADN satélite (Dp-sat1) cuya unidad monomérica (HC) está representada por la suma de dos fragmentos homogéneos en tamaño y en secuencia (HA+HB). Este ADN repetido está organizado en tándem a lo largo del genoma, pudiendo representar hasta el 6% del genoma total de *D. pictus*. Tiene una composición rica en A+T (71%), completa ausencia de repeticiones internas, y una divergencia entre las variantes monoméricas del 4 al 30%. La hibridación sobre cromosomas de *D. pictus* muestra la presencia de señal en 7 parejas de cromosomas pequeños (parejas 8-13), en posición centromérica, pericentromérica o disperso en ambos brazos. La pareja 13 presenta un polimorfismo asociado al ADN repetitivo Dp-sat1 que podría estar ligado al sexo, y que indicaría que ésta es la pareja de cromosomas sexuales.

La distribución del ADN satélite (y por tanto de los cromosomas pequeños) es un poco peculiar durante la interfase, ya que la heterocromatina que contiene al ADN Dp-sat1 se localiza solamente en uno de los polos del núcleo (Amor *et al.* 2009).

Mediante hibridación se ha confirmado la presencia de Dp-sat1 en 5 especies del género *Discoglossus* (*D. montalentii*, *D. galganoi*, *D. pictus*, *D. sardus* y *D. scovazzi*), mostrando en todas ellas un patrón de bandas muy similar. Estos resultados podrían indicar que se trata de un ADN satélite específico del género *Discoglossus*, ya que no se ha observado en especies de otros géneros (*Alytes dickhilleni*) o familias (*X. laevis*, *R. temporaria*).

Dp-sat2 y Dp-sat3

INTRODUCCIÓN

De la digestión del ADN genómico de *D. pictus* con *StuI* se aisló una banda que, tras la clonación y secuenciación, resultó estar formada por dos tipos de fragmentos distintos: Dp-sat2 (de 150 pb aproximadamente) y Dp-sat3 (de 180 pb). Dp-sat2 representa el 2.6% del genoma total de esta especie (2.3×10^6 copias por genoma diploide), tiene un contenido ligeramente rico en A+T (58%) y una similitud entre los monómeros del 84%-97%. Dp-sat3 representa el 2.2% del genoma total (1.6×10^6 copias por genoma diploide), también presenta un alto contenido en A+T (56%) y una similitud entre monómeros del 89-95%. La hibridación sobre ADN genómico de otras especies de este género (*D. pictus*, *D. sardus*, *D. scovazzi*, *D. galganoi* y *D. montalentii*) demuestra su alta conservación. Los dos ADNs repetidos presentan un patrón de bandas en escalera, típico de un ADN repetido en tándem, en las cuatro primeras especies. En la especie de *D. montalentii* la cantidad de estos satélites es inferior y/o las secuencias son muy diferentes y predomina otra organización. La distribución cromosómica en la especie de *D. pictus* muestra que ambos satélites (Dp-sat2 y Dp-sat3) están localizados de forma dispersa en todos los cromosomas, predominando grandes clústeres en regiones centroméricas y pericentroméricas de los cromosomas grandes (parejas 2-5). Sin embargo, a diferencia de Dp-sat1, estos dos satélites no presentan una distribución localizada en el núcleo durante la interfase.

OBJETIVOS

OBJECTIVES

1. To characterize cytogenetically the individuals of the species *B. bufo*, *E. calamita* and *B. viridis* analysed in this study.
2. To search for repetitive DNA sequences in the genome of *B. bufo*.
3. To perform a molecular and cytogenetic characterization of the repetitive DNAs identified in *B. bufo*.
4. To evaluate the extent of these repetitive DNA sequences in other species of the Bufonidae family and to perform a molecular and cytogenetic characterization those species where these sequences are present.
5. To analyze the evolution of the repetitive DNAs found in the Bufonidae family.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Analizado

1.1. Animales utilizados

Los animales silvestres utilizados fueron capturados tras la obtención de los correspondientes permisos de captura por parte de las autoridades competentes (Junta de Andalucía). Además de animales silvestres, también se han utilizado animales mantenidos en cautividad. En todos los casos, el mantenimiento, manipulación y sacrificio de los animales vivos empleados en este estudio se ha realizado con el visto bueno del Comité de Bioética de la Universidad de Jaén, y siguiendo la normativa según la legislación nacional y comunitaria vigente.

En este trabajo se han utilizado 16 especies de anfibios pertenecientes a las familias Bufonidae (13), Alytidae (1), Pipidae (1) y Ranidae (1). En la Tabla 1 se muestra el origen de los individuos y de las líneas celulares utilizados en este trabajo.

Especie	Familia	Población	2N	Cultivos celulares
<i>Bufo bufo</i>	Bufonidae	Italia (Bologna)	2n=22	
<i>Bufo bufo</i>	Bufonidae	España (Jaén)	2n=22	Bbu12 P6; Bbu12 P16; Bbu12 D1; Bbu12 D2; Bbu12D P7
<i>Bufo bufo</i>	Bufonidae	España (Jaén-Cañada)	2n=22	
<i>Bufo bufo</i>	Bufonidae	Marruecos	2n=22	
<i>Epidalea calamita</i>	Bufonidae	España (Jaén)	2n=22	Bca 3.2 P15 M4 Bca 3.2 P15 M6
<i>Epidalea calamita</i>	Bufonidae	España (Ardales)	2n=22	
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	Bufonidae	Grecia	2n=22	
<i>Bufotes viridis</i>	Bufonidae	Grecia	2n=22	Bvir P13 n2 Bvir P15 n5
<i>Bufotes boulengeri</i>	Bufonidae	Marruecos	2n=22	
<i>Bufotes latastii</i>	Bufonidae	Pakistán	2n=22	
<i>Bufotes luristanicus</i>	Bufonidae	Irán	2n=22	
<i>Bufotes surdus</i>	Bufonidae	Irán	2n=22	
<i>Bufotes siculus</i>	Bufonidae	Italia (Sicilia)	2n=22	
<i>Bufotes balearicus</i>	Bufonidae	Italia (Sicilia)	2n=22	
<i>Sclerophrys arabica</i>	Bufonidae	Yemen	2n=20	
<i>Rinella marinus</i>	Bufonidae	Australia	2n=22	

MATERIALES Y METODOS

Especie	Familia	Población	2N	Cultivos celulares
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Bufoidea	Nepal	2n=22	
<i>Discoglossus galganoi</i>	Alytidae	España	2n=28	Dgal P3
<i>Silurana tropicalis</i>	Pipidae	Nigeria (laboratorio)	2n=20	Xt F2 P5 H Xt M 1b Xt M 2b
<i>Pelophylax perezi</i>	Ranidae	España (Jaén)	2n=26	

Tabla 1. Especies de anfibios utilizados en este trabajo. Para cada especie se indica la familia a la que pertenece, la procedencia, el número de cromosomas y, en su caso, el nombre de línea celular establecida.

1.2. Líneas celulares

Para evitar tener que utilizar individuos adultos para la obtención de cromosomas metafásicos, se han establecido líneas celulares a partir de cultivos primarios y secundarios realizados a partir de larvas. Las líneas celulares disponibles se indican en la Tabla 1.

2. Métodos

2.1. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos

2.1.1. Obtención de ADN genómico de alto peso molecular

Como material de partida para la obtención de ADN genómico se ha utilizado tejido fijado en etanol al 70%, tejido fresco y células procedentes de cultivos celulares. En todos los casos el protocolo de extracción de ADN genómico fue el mismo. Para la extracción y aislamiento del ADN se siguió el método de Sambrook *et al.* (2001) con algunas variaciones.

- Homogeneizar unos 100 mg de tejido utilizando N₂ líquido. Cuando la extracción se realiza a partir de células procedentes de cultivos celulares se omite la homogeneización inicial, resuspendiendo el pellet de células directamente en el tampón de extracción. Resuspender el tejido homogeneizado en 800 µl de tampón de extracción¹¹. Añadir 2,5 µl de proteinasa K¹² y 200 µl de tampón de lisis¹³. Mezclar por inversión e incubar 10-15 horas a 56°C.
- Añadir 10 µl de solución de RNasa¹⁴ e incubar a 37°C durante 3 horas.
- Extraer con fenol utilizando un volumen igual al de muestra. Mezclar por inversión (6-8 veces) y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.

¹¹ Tampón de extracción: 10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM NaCl; 2mM EDTA.

¹² Proteinasa K: 10 mg/ml en H₂O ultrapura estéril. Conservar a -20°C.

¹³ Tampón de lisis: 10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM NaCl; 2mM EDTA; 5% SDS.

¹⁴ Solución RNasa: 10mg/ml en 10mM Tris-HCl pH 7,5; 15 mM NaCl. Para inactivar posibles DNasas, la solución se calienta a 100°C durante 15 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente. Conservar a -20°C.

MATERIALES Y METODOS

- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y volver a extraer con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (proporciones 25:24:1) utilizando un volumen igual al de muestra. Mezclar por inversión y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y extraer con cloroformo:alcohol isoamílico (proporción 24:1) utilizando un volumen igual al de muestra. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar el ADN. Para ello se añade NaCl 5M (concentración final 0,2 M) y dos volúmenes de etanol al 100%. Mezclar suavemente por inversión y dejar enfriar al menos 30 min a -20°C.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min. Decantar el etanol. Lavar con etanol al 70% (un volumen). Centrifugar 13.000 r.p.m. durante 10 min. Decantar el sobrenadante y dejar secar hasta que todo el etanol se haya evaporado. Resuspender el ADN en H₂O ultrapura estéril. Almacenar a 4°C.

2.2. Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa

El aislamiento y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo mediante protocolo basado en la técnica descrita por Duro *et al.* (1993).

- Cortar el bloque de agarosa que contiene la banda de ADN de interés con un bisturí estéril y separar del resto del gel. Es muy importante evitar la exposición prolongada del ADN a la luz U.V. para evitar los daños que ésta pueda ocasionar sobre el ADN.
- Depositar el bloque de agarosa dentro de un cono de papel de filtro, que se encuentra a su vez encajado dentro de un tubo eppendorf con el fondo perforado. Este montaje se introduce en otro tubo eppendorf sin perforar y se centrifuga 15 min a 14.000 rpm.
- Precipitar el ADN presente en el eluido con NaCl 5 M (concentración final 0.2 M), 1 µl de glicógeno y dos volúmenes de etanol absoluto. Incubar la mezcla a -20°C durante 10-15 horas.
- Recuperar el ADN centrifugando a 14.000 rpm durante 30 min.
- Lavar con etanol al 70%.
- Decantar el sobrenadante, dejar secar y resuspender en 10 µl de H₂O milliQ.

2.2.1. Purificación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

Para el aislamiento de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos se empleó el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (2001). Brevemente:

MATERIALES Y METODOS

- Sembrar una colonia de bacterias en 5 ml de LB líquido e incubar en agitación a 37°C durante 10-12 h.
- Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 min. Tirar el sobrenadante.
- Resuspender las bacterias en 100 µl de Solución I¹⁵ fría.
- Añadir 200 µl de Solución II¹⁶, mezclar por inversión 6-8 veces. Incubar en hielo 5 min.
- Añadir 150 µl de Solución III¹⁷, mezclar por inversión 6-8 veces. Incubar en hielo 5 min.
- Centrifugar durante 15 min a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- Precipitar el ADN plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto y mezclar por inversión 6-8 veces. Incubar la mezcla a -20°C durante 10-15 horas.
- Centrifugar 10 min a máxima velocidad.
- Decantar, lavar con etanol al 70% y centrifugar 10 min a máxima velocidad.
- Decantar y dejar secar.
- Resuspender en 50 µl de H₂O ultrapura estéril. Conservar a -20°C.

2.2.2. Purificación de ADN plasmídico mediante kits comerciales

Si el plásmido iba a ser utilizado en reacciones de secuenciación, para su extracción se utilizó el kit comercial “Qiaprep spin minipreps kit” (Qiagen) o el kit “MiniSpin Plasmid” (MN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y pureza del ADN obtenido se realiza por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Para la medida de la concentración de ADN se tiene en cuenta que a una absorbancia de 1 medida a 260 nm le corresponde a una concentración de ADN de cadena doble de 50 ng/µl.

Para medir la pureza de la muestra se obtiene el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). Este valor indica si existe contaminación con proteínas. Se considera que una solución de ADN está limpia cuando este cociente tiene un valor entre 1,8 y 2 (Wilfinger *et al.* 1997).

La concentración de ADN también puede estimarse por comparación de la muestra problema con un ADN patrón de concentración conocida tras la electroforesis de ambas en un gel de agarosa.

¹⁵ Solución I: 50mM glucosa, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 100 µl/ml RNasa A.

¹⁶ Solución II: 0.2M NaOH, 1% SDS.

¹⁷ Solución III: 3M acetato potásico.

2.4. Electroforesis en geles de Agarosa

Las muestras de ADN pueden separarse según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello se utilizan geles de agarosa al 1% en tampón TAE¹⁸ 1x, a un voltaje de 5V/cm. De este modo es posible visualizar las muestras de ácidos nucleicos y determinar la calidad de las mismas.

2.5. Aislamiento y amplificación de secuencias de ADN repetitivo

2.5.1. Aislamiento de ADN repetitivo mediante restricción de ADN genómico

Reacción de restricción
5-10 µg ADN genómico 4 µl Tampón 10x 1-3 U enzima H ₂ O ultrapura estéril Volumen final = 40 µl

Tabla 2. Reacción de digestión del ADN genómico

Las restricciones del ADN genómico fueron realizadas según la reacción que se indica en la Tabla 2. La mezcla obtenida se incubaba a la temperatura óptima de cada enzima de restricción, siendo la más frecuente de 37°C.

Una vez digerido, el ADN se separa mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1x y con un voltaje de 5V/cm.

Tras la electroforesis, los geles se tiñen en una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) y el ADN se visualiza mediante exposición a U.V. en un transiluminador. La fotografía del gel se toma junto con una regla, de modo que posteriormente se pueda estimar permite realizar una estimación del tamaño de las bandas obtenidas.

2.5.2. Amplificación de secuencias de ADN repetitivo

DISEÑO DE OLIGOS

La clonación de las bandas intensas que se observan tras la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción permite obtener secuencias de unidades monoméricas de distintas familias de ADN repetido. A partir de estas secuencias se diseñaron los cebadores específicos para cada una de estas familias de ADN repetido con el fin de obtener monómeros, dímeros, etc mediante PCR. Los cebadores utilizados en este trabajo se muestran en la

GEN		NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	Tamaño	Tm	%GC
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-F1	GGATCCATGCACATCAACAGGTATG	25	56,06	48
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-R1	GGATCCACACCTGACTGAAGAATG	24	55,23	50
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-F2	GACATCACAATAGACCCTTGCTG	25	56,06	48

¹⁸ Tampón TAE 50x: (Tris-Acetato EDTA): Disolver 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de una solución 0,5 M (pH=8) de EDTA en 1000 ml de H₂O milliQ.

MATERIALES Y METODOS

GEN		NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	Tamaño	Tm	%GC
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-R2	ATCATCCATGGATGCTGAAGGG	22	54,23	50
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-F1	CCAGACTTGAGGGATGGTAGAAG	24	56,75	54
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-R1	TCGCTGGGCTGAAGTCCATGA	22	58,24	54
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-F2	GGGACTTGGGCTCCAAGAGGAG	22	58,30	63
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-R2	CCTCTACCATCCCTGCAAGTCTGG	24	58,28	58
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-F1	GTTCTGGGCAGACATTTCCA	21	54,84	52
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-R	ATTTTCCGATTTTGCCCCGC	20	54,05	50
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-F2	CGGATGTCATGGAAGTATGG	21	54,89	52
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-Fint	AGCCAGTTTGATCTCATAGCTG	23	51,05	43
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-Rint	GTTCTTTTCTCAAACGGCCA	22	51,83	45
BbuBamHI	210B	BbuBam210B-F	ATAGAGCTTCTGCCTGGA	19	51,41	52
BbuBamHI	210B	BbuBam210B-R	ATCTGGCAACCAGAGAAGTG	20	51,69	50
BbuBamHI	210B	Bbu-BamHI-210B-int-R	CTACGGATCCGGATCCG	17	50,30	64
BbuBamHI	210B	Bbu-BamHI-210B-int-R2	ATCCGAGGGTAGCGTTCT	19	54,18	57
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-F1	GGATCCGCTAAACGCATAC	19	50,73	52
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-R1	GGATCCGTAATAATCATGCGG	21	52,04	47
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-int-F	GTGATCAATGACTGTGGTGATC	22	51,37	45
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-int-R	TCCCTGTAAGGCTCCATT	19	51,56	52

Tabla 3.

GEN		NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	Tamaño	Tm	%GC
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-F1	GGATCCATGCATCAACAGGTATG	25	56,06	48
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-R1	GGATCCACACTGACTGAAGAATG	24	55,23	50
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-F2	GACATCACAATAGACCCTTGCTG	25	56,06	48
BbuBamHI	800	Bbu-BamHI-800-R2	ATCATCCATGGATGCTGAAGGG	22	54,23	50
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-F1	CCAGACTTGAGGGATGGTAGAAG	24	56,75	54
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-R1	TCGCTGGGCTGAAGTCCATGA	22	58,24	54
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-F2	GGGACTTGGGCTCCAAGAGGAG	22	58,30	63
BbuBamHI	210A	Bbu-BamHI-210A-R2	CCTCTACCATCCCTGCAAGTCTGG	24	58,28	58
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-F1	GTTCTGGGCAGACATTTCCA	21	54,84	52
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-R	ATTTTCCGATTTTGCCCCGC	20	54,05	50
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-F2	CGGATGTCATGGAAGTATGG	21	54,89	52
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-Fint	AGCCAGTTTGATCTCATAGCTG	23	51,05	43
BbuBamHI	210ins	Bbu-BamHI-210ins-Rint	GTTCTTTTCTCAAACGGCCA	22	51,83	45
BbuBamHI	210B	BbuBam210B-F	ATAGAGCTTCTGCCTGGA	19	51,41	52
BbuBamHI	210B	BbuBam210B-R	ATCTGGCAACCAGAGAAGTG	20	51,69	50
BbuBamHI	210B	Bbu-BamHI-210B-int-R	CTACGGATCCGGATCCG	17	50,30	64

MATERIALES Y METODOS

GEN		NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	Tamaño	Tm	%GC
BbuBamHI	210B	Bbu-BamHI-210B-int-R2	ATCCGGAGGGTAGCGTTCT	19	54,18	57
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-F1	GGATCCGCTAAACGCATAC	19	50,73	52
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-R1	GGATCCGTA AAAATCATGCGG	21	52,04	47
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-int-F	GTGATCAATGACTGTGGTGATC	22	51,37	45
BbuBamHI	190	Bbu-BamHI-190-int-R	TCCCCTGTAAGGCTCCATT	19	51,56	52

Tabla 3. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los ADN repetitivos analizados en este trabajo. Para cada cebador se indican su nombre, su secuencia en dirección 5'-3', su tamaño, su Tm y el % GC.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ADN REPETIDO

Con los cebadores de la Tabla 3 se realizan PCRs para la amplificación de distintas unidades monoméricas de las familias de ADN repetido analizadas en este trabajo. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 4 sustituyendo los cebadores correspondientes y el tiempo de extensión requerido en cada caso en función del tamaño del amplicón. Para la obtención de dímeros, trímeros, etc, los tiempos de extensión se alargan lo suficiente.

PCR (Vf = 15 µl)	PERFIL DE TEMPERATURAS
0,5 µl plásmido con inserto (o bacterias) 0,6 µl dNTPs (10 mM) 0,6 µl MgCl ₂ 50 mM 0,6 µl cebador Forward 0,6 µl cebador Reverse 1,5 µl Tampón 10X 0,3 U Taq polimerasa (Bioline) 10,5 µl H ₂ O ultrapura estéril	95°C - 4 min 95°C - 30 s Tm°C - 30 s 72°C – según la longitud del inserto amplificado 1kb/min 72°C - 5 min

x 30 ciclos

Tabla 5. Reacción de PCR

REACCIÓN DE LIGADO - BANDAS DE DIGESTIÓN	INCUBACIÓN
vol. inserto (obtenido según fórmula anterior) 0,6 µl de vector pUC19 (0,5 µg/µl) 7,5 µl tampón 2X 1 µl Ligasa de T4 0,5 µl de ATP 20 mM H ₂ O ultrapura estéril (hasta 15 µl)	12-20h (19-22 °C)
REACCIÓN DE LIGADO - PRODUCTOS DE PCR	INCUBACIÓN
vol. inserto (obtenido según fórmula anterior) 1 µl de vector pGEM-T Easy (50 ng/µl) 7,5 µl tampón 2X 1 µl Ligasa de T4 0,5 µl ATP 20 mM H ₂ O ultrapura estéril (hasta 15 µl)	o/n (4°C)

Tabla 4. Reacciones de ligado empleadas en este trabajo en función del origen del inserto (digestión de ADN genómico o producto de PCR).

2.6. Clonación de fragmentos de ADN

2.6.0. Reacción de ligado

La reacción de ligado (Tabla 5) se realizó de dos modos distintos en función de si los fragmentos de ADN utilizados procedían de la digestión de ADN genómico con el enzima *Bam*HI, o de productos de PCR obtenidos mediante amplificación con *Taq* polimerasa.

En primer caso, para la clonación se empleó el vector pUC19 previamente digerido con el enzima *Bam*HI y desfosforilado (Fermentas). En el segundo caso, para la clonación se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega).

En la reacción de ligado se utilizó una relación inserto:vector de 3:1, que fue la relación que proporciona mejor eficiencia en la obtención de ADN recombinante. Teniendo esto en cuenta, para calcular la cantidad de inserto necesaria en cada reacción de ligado se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \times \text{Tamaño del inserto (Kpb)}}{\text{Tamaño del vector (Kpb)}} \times \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{cantidad inserto (ng)}$$

2.6.1. Obtención de bacterias competentes

Las bacterias empleadas pertenecen a la cepa JM109 de la especie *Escherichia coli*. Para la obtención de bacterias competentes se utilizó el siguiente protocolo en condiciones de esterilidad:

- Sembrar las bacterias en una placa de Petri con medio de LB-agar¹⁹.
- Incubar a 37°C durante 12-15h.
- Picar una colonia e inocular en 4 ml de LB²⁰ líquido.
- Incubar a 37°C en agitación, durante 12-15h.
- Inocular los 4 ml del cultivo anterior en 100 ml de medio TYM²¹ e incubar a 37°C en agitación hasta conseguir una densidad óptica a 550 nm entre 0,5 y 0,8.
- Enfriar el cultivo y alicuotar en dos tubos de 50 ml. A partir de este paso se debe trabajar en condiciones de frío y esterilidad.

¹⁹ Medio LB-agar: Disolver 10 gr de bacto-triptona, 5 gr de extracto de levadura y 10 gr de NaCl en 950 ml de H₂O ultrapura estéril. Añadir 15 gr de bacto-agar. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5N. Completar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar mediante autoclave.

²⁰ Medio LB - líquido (Luria-Bertani): Disolver 10 gr de bacto-triptona, 5 gr de extracto de levadura y 10 gr de NaCl en 950 ml de H₂O ultrapura estéril. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5N. Completar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar mediante autoclave.

²¹ Medio TYM: 2% Triptona; 0,5% extracto de levadura; 0,1% NaCl; 0,01% MgCl₂. Esterilizar mediante autoclave.

MATERIALES Y METODOS

- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 min a 4°C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender suavemente en 15-20 ml de Tfb I²².
- Incubar en hielo durante 15-30 min.
- Centrifugar durante a 3.000 rpm durante 8 min a 4°C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 2 ml de Tfb II²³.
- Incubar en hielo durante 30 min.
- Hacer alícuotas de 50 µl y congelar rápidamente sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido.
- Conservar a -80°C.

Para establecer el grado de competencia alcanzado por las bacterias, se realiza un análisis de la eficiencia de transformación. Para ello se transforman 50 µl de bacterias competentes con 100 pg de vector pUC19 (ver protocolo de transformación). La eficiencia de transformación se mide como el número de colonias transformadas por µg de ADN. Con este protocolo suelen obtenerse eficiencias de transformación que oscilan entre 10⁶ - 10⁸ (valores superiores a 10⁶ se consideran una buena eficiencia de transformación).

2.6.2. Transformación de bacterias competentes

Para introducir ADN exógeno en el interior de bacterias competentes se ha utilizado el protocolo de transformación mediante choque térmico. El protocolo seguido para transformar bacterias competentes es el siguiente:

- Añadir los 15 µl de la reacción de ligado a 50 µl de bacterias competentes.
- Incubar 30 min en hielo agitando suavemente cada 10 min.
- Incubar 2 min en un baño a 42°C.
- Colocar rápidamente en hielo durante 5 min.
- Añadir 950 µl de medio LB líquido e incubar durante 1 hora a 37°C.
- Sembrar 100 µl de bacterias transformadas en una placa con medio LB sólido con ampicilina/IPTG/X-Gal (medio selectivo).
- Centrifugar el resto de bacterias durante 5 min a 5000 rpm.
- Decantar, resuspender el sedimento y sembrar todo en una placa con medio LB sólido con ampicilina/IPTG/X-Gal.
- Incubar las placas a 37°C durante 10-12 h.

²² Medio Tfb I: 30 mM Acetato potásico; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15% glicerol. Esterilizar por filtración.

²³ Medio Tfb II: 10 mM NaMOPS pH 7,2; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15% glicerol. Esterilizar por filtración.

MATERIALES Y METODOS

Los vectores pGEM-T Easy y pUC19 permiten la identificación de clones recombinantes en medio LB sólido al que se añade ampicilina/IPTG/X-gal. En ese caso, los clones recombinantes serán de color blanco, mientras que los clones no recombinantes serán de color azul. En estas condiciones las bacterias no transformadas no crecerán, por ser sensibles a la ampicilina.

2.6.3. Identificación de clones recombinantes de interés

Los clones recombinantes positivos se identificaron por distintos métodos:

MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis de plásmidos recombinantes en geles de agarosa al 1% en TAE 1X permite identificar aquellos que tienen insertos de tamaño específico al compararlos con controles positivos (plásmidos con inserto de tamaño conocido) y negativos (plásmidos recircularizados sin inserto). Este método se utilizó en aquellos casos en los que el tamaño del inserto era superior a 500 pb.

MEDIANTE PCR CON LOS CEBADORES M13 F/R

Este método se utilizó principalmente para clones con insertos de tamaños menores de 500 pb, ya que la variación del tamaño del plásmido con y sin inserto no se aprecia con bastante claridad en la electroforesis de plásmidos. Se utilizaron cebadores genéricos M13 F/R y la reacción se muestra en la Tabla 6.

PCR (Vf = 15 µl)	PERFIL DE TEMPERATURAS
0,5 µl plásmido con inserto (o bacterias)	95°C - 4 min
0,6 µl dNTPs (10 mM)	95°C - 30 s
0,6 µl MgCl ₂ 50 mM	52°C - 45 s
0,6 µl cebador M13 Forward	72°C - 45 s
0,6 µl cebador M13 Reverse	} x 30 ciclos
1,5 µl Tampón 10X	
0,3 U Taq polimerasa (Bioline)	72°C - 5 min
10,5 µl H ₂ O ultrapura estéril	

Tabla 6. Reacción de PCR M13 F/R

MEDIANTE HIBRIDACIÓN SOBRE PLÁSMIDOS

Este método se utilizó en los casos cuando no se conocía el tamaño sobre los clones obtenidos y esta descrito en el apartado 3.2.

MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LOS CLONES

Las reacciones de secuenciación de ADN plasmídico se realizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL (Beckam Coulter). La secuenciación se ha llevado a cabo en los

MATERIALES Y METODOS

Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Jaén y en el Servicio de Secuenciación de ADN del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

2.6.4. Crio preservación de los clones

Los clones de interés se conservaron a -80°C . Para ello se realizaron cultivos en 3 ml en medio LB con ampicilina a 37°C en agitación durante toda la noche. Los cultivos se centrifugan (6.000 rpm, 5 min) y las células se resuspenden en 150 μl de medio LB:glicerol (1:1). El material así preparado se almacena a -80°C .

2.7. Marcaje de ácidos nucleicos

En este trabajo se han utilizado dos métodos diferentes para marcar sondas. El marcaje por PCR se ha utilizado cuando se conoce la secuencia del fragmento a marcar y, por tanto, es posible obtener de oligonucleótidos específicos para poder amplificar la región de interés. La técnica de marcaje mediante cebado al azar ("Random primer") permite marcar cualquier secuencia de ADN utilizando hexanucleótidos aleatorios como oligos para la síntesis de nuevas moléculas de ADN marcadas. Esta técnica se ha utilizado para marcar fragmentos de ADN de secuencia desconocida o fragmentos muy largos, como pueden ser plásmidos.

2.7.0. Marcaje por PCR

PCR ($V_f = 50 \mu\text{l}$)	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN
0,5 μl plásmido con inserto (10 ng plásmido) 1 μl biotina-16-dUTP® / dig-11-dUTP (Roche) 1 μl dNTPs para marcaje ²⁴ por PCR 1,25 μl MgCl_2 50 mM 1,25 μl cebador Forward 1,25 μl cebador Reverse 5 μl Tampón de Taq polimerasa 10X 1 U Taq polimerasa (Bioline) 36,75 μl H_2O ultrapura estéril	95°C 4 min 95°C 30 s Temperatura de Unión de cebadores 45 s 72°C Tiempo de Extensión 72°C 5 min X 30 ciclos

Tabla 7. . Reacción de PCR para marcaje de sonda.

En este trabajo se han utilizado sondas no radiactivas, marcadas con biotina-16-dUTP (Roche) (utilizadas en experimentos de FISH sobre cromosomas metafásicos), o con digoxigenina-11-dUTP (Roche) (utilizadas en experimentos de hibridación sobre membranas).

El protocolo de PCR utilizado está basado en el desarrollado por Lo et al. (1990) y se detalla en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** El programa de amplificación varía en función de la T_m de los oligonucleótidos utilizados y de la longitud del producto a amplificar.

²⁴dNTPs para marcaje: 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM dig-11-dUTP o biotin-16-dUTP.

MATERIALES Y METODOS

Las sondas marcadas se precipitan (ver apartado 2.7.2) y se conservan a -20°C.

2.7.1. Marcaje por "Random Primer"

Con este método se marcaron las bandas purificadas a partir de las digestiones del ADN genómico con *Bam*HI, así como insertos de clones recombinantes positivos que posteriormente se utilizaron en la identificación de clones recombinantes positivos. La reacción de marcaje se muestra en la Tabla 8. Para la desnaturalización, el ADN se incubó durante 10 min a 100°C y se enfrió rápidamente en el hielo, para evitar la renaturalización.

2.7.2. Precipitación de la sonda marcada

La precipitación de la sonda se realiza para eliminar restos de oligos y de otros reactivos presentes en la reacción de marcaje (ya sea por PCR o por "random primer") y que pueden interferir en reacciones posteriores. Para ello, una vez obtenida la sonda marcada con digoxigenina, se añade 1 µl de glicógeno, 10 µl de acetato amónico 10M, 5 µl de ADN de esperma de salmón (100µg/ml) y 100 µl de etanol absoluto. La mezcla se incubó durante toda la noche (10-15 h) a -20°C. Posteriormente se centrifuga 30 min a 13.000 rpm, se elimina el sobrenadante y se realiza un lavado con 1 volumen de etanol al 70%, centrifugando posteriormente 5 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se decanta y se deja secar el precipitado. Una vez seco, éste se resuspende en 30 µl de H₂O ultrapura. La sonda se conserva a -20°C.

En el caso cuando se trata de la sonda marcada con biotina (para realización de la FISH) se utiliza otra reacción para la precipitación: 1 µl de glicógeno, 3 µl de acetato sódico 3M a pH 5.2, 5 µl de ADN de esperma de salmón (100µg/ml), 5 µl de ARNt de levaduras (100µg/ml) y 150 µl de etanol absoluto. El resto del protocolo es idéntico que en el caso de marcaje con digoxigenina.

2.8. Comprobación de la eficiencia de marcaje

2.8.1. Dot-Blot

La eficiencia de marcaje de las sondas puede comprobarse mediante comparación con un ADN control marcado a una concentración conocida. El protocolo empleado es el siguiente:

- Realizar diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8, etc.) del ADN marcado control (100 ng/µl) y de la sonda marcada (concentración desconocida).
- Depositar estas diluciones en una membrana de nailon cargada positivamente (Amershan).
- Cuando la membrana esté seca, fijar el ADN a la membrana mediante exposición a luz U.V. durante 2 min.

MATERIALES Y METODOS

- Lavar²⁵ dos veces la membrana durante 2 min cada vez en tampón maléico²⁶.
- Incubar 1 hora en el tampón de bloqueo²⁷ para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo.
- Incubar la membrana durante 30 min en la solución de anticuerpo²⁸.
- Realizar dos lavados de 15 min cada uno en tampón maléico.
- Equilibrar la membrana durante 5 min en tampón alcalino²⁹.
- Incubar la membrana en la solución de color³⁰. La detección de la señal se lleva a cabo de forma indirecta, por la actividad de la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo, utilizando NBT/BCIP como sustrato.
- Incubar la membrana en oscuridad hasta que la señal adquiera la intensidad adecuada.
- Detener la reacción lavando la membrana con agua destilada.

La comparación de las señales obtenidas en las diluciones seriadas del ADN marcado control y con las señales de las diluciones de sonda marcada permite estimar de forma aproximada la cantidad de sonda marcada.

2.8.2. Electroforesis en gel de agarosa

Una estima menos precisa del grado de marcaje de una sonda puede realizarse comparando el tamaño de fragmento de ADN sin marcar con el del fragmento de ADN marcado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1x. La incorporación al ADN de bases modificadas (digoxigenina-11-dUTP o biotina-16-dUTP) da lugar a un retardo en la migración de las moléculas de ADN. Mayor retardo indica mayor grado de marcaje.

REACCIÓN DE MARCAJE	INCUBACIÓN
15 µl ADN desnaturalizado (0.1-3 µg) 2 µl mezcla de hexanucleótidos 10x (Roche) 2 µl mezcla de dNTPs para marcaje 1 µl (10 U) ADN polimerasa fragmento Klenow (Roche) Volumen final= 20 µl	37°C 10-15 h

Tabla 8. Reacción para marcaje de sonda por Random Primer.

²⁵ Todos los lavados se hacen en agitación, a temperatura ambiente salvo que se especifique lo contrario.

²⁶ Tampón Maléico: ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH=7.5.

²⁷ Tampón de Bloqueo: reactivo de bloqueo (Roche) al 1% en tampón maléico.

²⁸ Solución de Anticuerpo: anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, dilución 1:5.000 en tampón de bloqueo.

²⁹ Tampón alcalino: Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM pH=9.5.

³⁰ Solución de color: 20 µl de NBT/BCIP en 1 ml de tampón alcalino.

3. Identificación de secuencias específicas de ADN en membranas de nailon

3.1. "Southern-Blot"

La identificación de secuencias específicas de ADN (obtenidas mediante digestión de ADN genómico con enzimas de restricción, o mediante PCR) puede realizarse tras la separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa y su posterior transferencia a membranas de nailon mediante "Southern-blot". Para ello es necesario: transferir el ADN a una membrana, hibridar la membrana con una sonda marcada y detectar de la sonda.

3.1.1. Transferencia del ADN a una membrana

Los fragmentos de ADN, procedentes de la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción, o de resultado de reacciones de PCRs, son separados según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Finalizada la electroforesis, el ADN se transfiere a una membrana de nailon cargada positivamente. La transferencia se realizó por capilaridad, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001):

- Teñir el gel con bromuro de etidio y fotografiar con una regla. Lavar con agua destilada¹⁶.
- Incubar el gel en la solución de depurinación³¹ durante 10-20 min.
- Lavar 5 min con agua destilada.
- Incubar, dos veces 20 min cada una, en solución de desnaturalización³².
- Lavar 5 min con agua destilada.
- Incubar, dos veces 20 min cada una, en solución de neutralización³³.
- Transferir el ADN por capilaridad desde el gel a una membrana de nailon cargada positivamente utilizando 20xSSC (pH= 7.5) como solución de transferencia. La transferencia se realiza durante toda la noche, como se muestra en la Figura 5.

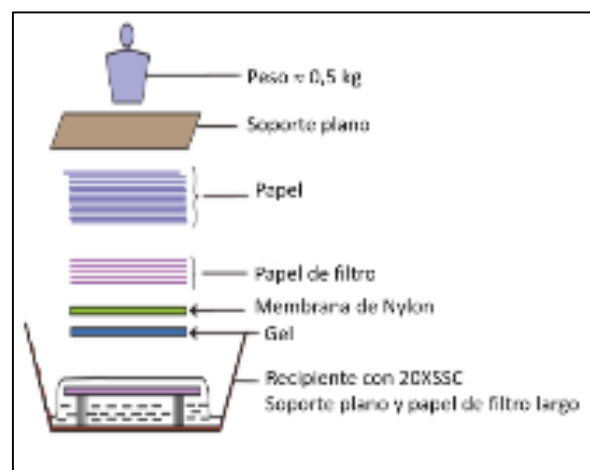


Figura 5. Esquema de la transferencia por capilaridad para Southern Blot.

³¹ Solución de depurinación: HCl 0.25 M.

³² Solución de desnaturalización: NaCl 1.5 M; NaOH 0.5 M.

³³ Solución de neutralización: Tris-ClH 0,5 M; NaCl 1.5 M, pH=7.4.

MATERIALES Y METODOS

- Lavar la membrana en 6xSSC durante 5 min y dejar secar.
- Fijar el ADN a la membrana mediante exposición a luz U.V. durante 2 min. La membrana se puede conservar durante 1 - 4 semanas a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro.

3.1.2. Hibridación

La hibridación se realizó como sigue:

- Incubar la membrana en solución de prehibridación³⁴ a 65°C, al menos durante 3 h.
- Preparar la sonda diluyendo el ADN marcado con digoxigenina a una concentración final de 25-50 ng/ml en solución de prehibridación. Desnaturalizar la sonda (incubar en agua hirviendo durante 10 min) y enfriar rápidamente en hielo. La sonda se puede reutilizar almacenándola a -20 °C.
- Añadir la sonda a la membrana e hibridar durante 10-15 horas a la temperatura de hibridación. La temperatura de hibridación empleada depende de la homología entre las secuencias que van a hibridar, de modo que cuanto mayor sea la temperatura, más específico será el apareamiento entre la sonda y el ADN que queremos detectar. Según esto, para la identificación de clones recombinantes positivos la hibridación se realizó a 68°C, mientras que para analizar el ADN repetitivo la temperatura de hibridación osciló entre 64°C y 68°C según la homología del repetitivo a detectar con la sonda utilizada. Las temperaturas de hibridación óptimas se obtuvieron de forma experimental.

3.1.3. Detección de la señal

Para el revelado se siguió el siguiente protocolo:

- Lavados post-hibridación 1: realizar dos lavados, de 15 min cada uno, en agitación y a temperatura ambiente en una solución de 2xSSC/0.1% SDS.
- Lavados post-hibridación 2: realizar dos lavados, de 30 min cada uno, a la temperatura de hibridación (64-68°C) en una solución de 0.5xSSC/0.1% SDS (ADN repetitivo) o de 0.1xSSC/0.1%SDS ("screening") o 0.2xSSC/0.1%SDS (productos de PCR).
- La detección de la sonda se llevó a cabo de forma indirecta, mediante métodos inmunológicos, utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. El protocolo seguido es el mismo que se indica en el apartado 2.8.1, comenzando a partir del lavado con tampón maleico.

³⁴ Solución de Prehibridación: 5XSSC; 0,1% N-lauroilsarcosina; 0.02% SDS; 1% reactivo de bloqueo.

3.2. Identificación de clones positivos mediante hibridación sobre plásmidos.

La identificación de clones positivos se realizó hibridando plásmidos inmovilizados en una membrana con sondas específicas. Para ello se depositan aproximadamente 100 ng de cada plásmido desnaturalizado³⁵ sobre una membrana de nailon. El ADN se fija a la membrana mediante exposición a luz U.V. durante dos minutos. A continuación se incuba la membrana en solución de desnaturalización³⁶ durante 10 min. Posteriormente, se retira esta solución y se trata la membrana con solución de neutralización³⁷ otros 10 min. A partir de este punto prosigue con la hibridación (ver apartado 3.1.2).

3.3. “Dot- Blot” de ADN genómico (semicuantitativo)

Para estimación aproximada de número de copias de ADN repetitivo en distintos genomas, se realizó la técnica de Dot-Blot con ADN genómico. En este caso se compara la intensidad de las diluciones de ADN genómico con la intensidad de diluciones de un plásmido de concentración y tamaño conocidos, que contiene como inserto una unidad monomérica del ADN repetitivo que se quiere cuantificar.

Sobre la membrana de nailon se depositan concentraciones decrecientes del ADN genómico desnaturalizado²⁵ que se quiere analizar, junto con diluciones decrecientes de un plásmido de concentración conocida positivo para una unidad monomérica del ADN repetitivo a cuantificar.

A partir de este punto se prosigue el protocolo descrito en el apartado 3.2 a partir del paso de fijación del ADN sobre la membrana mediante exposición a la luz U.V.

Para estimar el número de copias de ADN repetido por núcleo en las muestras de ADN genómico se utilizó la cantidad de ADN por núcleo en cada especie disponible en la “Animal Genome Size Database” (Release 2.0).

3.4. Análisis del grado de metilación de secuencias repetidas

El estudio del grado de metilación del ADN repetitivo se llevó a cabo mediante restricción del ADN genómico con parejas de isoesquizómeros en las que ambas enzimas reconocen la misma

³⁵ Plásmido (ADN) desnaturalizado: incubar el plásmido (ADN) durante 10 min en agua hirviendo y posteriormente enfriar en hielo.

³⁶ Solución de desnaturalización: NaCl 1,5 M y NaOH 1,5 M.

³⁷ Solución de neutralización: ³⁷ Tris-HCl 1 M y NaCl 1,5 M a pH= 7,4.

MATERIALES Y METODOS

secuencia diana, pero presentan diferente sensibilidad a la metilación del ADN: uno de ellos es insensible a la metilación, mientras que el otro es sensible a la metilación.

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión de ADNs genómicos con estas parejas de isoesquizómeros se separan por su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, y el ADN se transfiere a membranas de nailon mediante "Southern-blot".

Las membranas se hibridan con sondas marcadas. La aparición del mismo patrón de bandas con ambos isoesquizómeros indica que las secuencias analizadas no están metiladas en la diana para los enzimas de restricción utilizados, mientras que un patrón diferente indica la existencia de metilación en dichas secuencias.

4. Técnicas citogenéticas

4.1. Obtención de cromosomas metafásicos

La obtención de cromosomas metafásicos de diferentes especies de sapos se ha llevado a cabo a partir de células de la médula ósea de individuos, o utilizando cultivos realizados a partir de diversos tejidos de larvas en desarrollo.

4.1.1. Cromosomas metafásicos a partir de células de médula ósea

La obtención de cromosomas metafásicos a partir de células de la médula ósea de individuos adultos se llevó a cabo según el método descrito por Burgos *et al.* (1986). Brevemente:

- Inyectar por vía subcutánea una dosis de levaduras activadas³⁸ (0.2 ml/25 g de peso corporal). De este modo se consigue estimular la división de las células hematopoyéticas de la médula ósea.
- Pasadas 24 horas, inyectar, por vía intraperitoneal, una solución de colchicina en una dosis de 0.2 ml por cada 25 gr de peso corporal.
- Pasados 45 min, sacrificar al animal y recoger las células de la médula ósea de los huesos largos utilizando 8-10 ml de solución hipotónica de KCl al 0.56% en agua.
- Realizar un choque hipotónico incubando las células en la solución anterior durante 30-45 min.
- Centrifugar (1.100 rpm, 10 min) y desechar el sobrenadante.
- Fijar el material añadiendo 5-8 ml de fijador Carnoy³⁹.

³⁸ Levaduras activadas (*Saccharomyces cerevisiae*): mezclar 2-3 gr de levaduras, 5-6 gr de glucosa y 25 ml de agua. Calentar a 37°C hasta que las levaduras se activen.

³⁹ Fijador Carnoy: Metanol y ácido acético glacial, en proporciones 3:1.

MATERIALES Y METODOS

- Incubar a 4°C durante 1 h.
- Centrifugar (1.100 rpm, 10 min) y resuspender el material en 5-8 ml de fijador Carnoy frío.
- Repetir el paso anterior tres veces, resuspendiendo la última vez las células en 1-2 ml de fijador Carnoy. El volumen final depende de la densidad de células.
- Realizar la extensión del material sobre un portaobjetos húmedo para comprobar la cantidad y calidad de las metafases obtenidas.

Las suspensiones cromosómicas pueden almacenarse a -20°C.

4.1.2. Obtención de cromosomas metafásicos a partir de cultivos celulares

Para obtener cromosomas metafásicos a partir de cultivos celulares, se parte de 10 ml de cultivo de células confluentes:

- Añadir 100 µl de colchicina 10ng/µl (Colcemida, Karyomax) e incubar entre 5 y 6 horas a 28°C y 6% de CO₂.
- Tripsinizar el frasco de cultivo y recolectar las células centrifugando a 1.100 rpm durante 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 6 ml de KCl al 0.56% para realizar el choque hipotónico. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
- Prefijar añadiendo 1ml de fijador Carnoy frío (metanol y ácido acético en proporción 3:1), mezclando con suavidad.
- Centrifugar a 1.100 rpm durante 10 min y desechar el sobrenadante.
- Resuspender el material lentamente en 5-8 ml de fijador Carnoy frío e incubar a 4°C durante 1 hora (fijación).
- Centrifugar a 1.100 rpm durante 10 min. Desechar el sobrenadante.
- Realizar otros dos lavados con 5-8 ml fijador Carnoy frío.
- Tras el último lavado, resuspender en fijador Carnoy frío. El volumen final dependerá de la cantidad de material disponible.
- Las suspensiones cromosómicas se conservan a -20°C hasta su utilización, momento en el que se realizarán las extensiones del material sobre portas secos.

5. Bando cromosómico

En términos generales, las técnicas de bando cromosómico someten a los cromosomas metafásicos a desnaturalizaciones, digestión enzimática o ambas, seguido de una tinción con un colorante específico para ADN. Esto permite identificar bandas en los cromosomas en función de distintas características de la estructura cromosómica.

MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se han utilizado dos técnicas de tinción cromosómica: bandeado C y tinción Ag-NOR. No se ha empleado el bandeado G, ya que esta técnica no permite diferenciar bandas en anfibios (Schmid 1978; Birstein 1982).

El material utilizado en ambos casos fueron cromosomas metafásicos extendidos sobre portaobjetos, y envejecidos durante 24-36 horas mediante incubación a 37°C en estufa.

5.1. Bandeo C

Para la técnica de Banda C se utilizó el protocolo descrito por Sumner (1972) que permite poner de manifiesto la presencia de grandes regiones de heterocromatina, que suele asociarse a la presencia de ADN satélite. Brevemente:

- Los cromosomas envejecidos se incuban en HCl 0.15N durante 20 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente se incuban en Ba(OH)₂ al 5% durante 20 min a 50°C.
- Lavar con agua destilada.
- Incubar 45 min en 2XSSC (preparar a partir de 20xSSC⁴⁰) a 60°C.
- Lavar las muestras con agua destilada y teñir con Giemsa al 10% en PBS⁴¹ durante 30 min.
- Por ultimo las muestras se montan con agua destilada o aceite, sellando el cubreobjetos.
- Para la observación de las muestras y realización de fotos se utilizó microscopio convencional Olympus BX-51 con 40X o 100X aumentos.

5.2. Tinción con plata (tinción Ag-NOR)

La impregnación argéntica permite la tinción diferencial de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), en las que se localiza el ADNr. Como particularidad de la técnica, destacar que sólo aquellos cromosomas que presentaban las regiones NORs activas durante la interfase, presentarán esta tinción en la metafase mitótica posterior.

En este trabajo se ha aplicado la técnica descrita por Rufas *et al.* (1982), sobre cromosomas metafásicos envejecidos. Brevemente:

- Añadir 40 µl de solución fresca de nitrato de plata⁴² en una solución de ácido fórmico⁴³.
- Incubar en cámara húmeda a 60°C hasta que se produzca la tinción.

⁴⁰ 20xSSC: (Solución Salina Citrato) 3M NaCl, 0,3 M Citrato Sódico; disolver 176.32 g de NaCl y 88.2 g de citrato sódico dihidratado en 800 ml de H₂O. Ajustar a pH 7.0 con NaOH 1N y completar el volumen hasta 1 L (esterilizar).

⁴¹ PBS: (tampón fosfato salino) para 1 litro, 8.0 g ClNa; 2.0 g ClK, 1.4 g PO₄HNa₂·2H₂O.

⁴² Solución de nitrato de plata: 0,2 g de AgNO₃ en 200 µl de la solución de ácido fórmico.

⁴³ Solución de ácido fórmico: 3 gotas de ácido fórmico en 200 ml de agua destilada.

MATERIALES Y METODOS

- Lavar las muestras con agua destilada.
- Montar con agua.
- Para la observación de muestras y realización de fotos se utilizó un microscopio convencional Olympus BX-51 con 40X o 100X aumentos.

5.3. Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La técnica de FISH utilizada en este trabajo utiliza la fluorescencia indirecta para la detección de la sonda, marcada con biotina, que es detectada posteriormente mediante una reacción inmunológica con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína (FITC)). La técnica de FISH empleada está basada en la descrita por Pinkel *et al.* (1986):

5.3.1. FISH repetitivo

PRETRATAMIENTO

Los cromosomas metafásicos extendidos sobre portaobjetos y envejecidos son pretratados según el protocolo que sigue a continuación.

- Tratar con RNasa A⁴⁴, 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar tres veces durante 5 min cada una en 2xSSC.
- Tratar con pepsina⁴⁵, durante 2 min a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar tres veces durante 5 min cada una en PBS.
- Fijar con 50 ml de solución de fijación FIX⁴⁶.
- Lavar dos veces durante 5 min cada una en PBS.
- Deshidratar en una serie creciente de alcoholes (70°, 90°, 100°), 5 min cada uno, y dejar secar.

HIBRIDACIÓN

- Desnaturalizar los cromosomas en 70% formamida/2xSSC/0,1M EDTA⁴⁷ a 70°C en el baño durante 2 min.
- Lavar en 2xSSC durante 5 min.
- Deshidratar los cromosomas en una serie creciente de alcoholes (70°, 90°, 100°), 5 min cada uno, y dejar secar.
- Poner 10µl de sonda marcada con biotina, previamente desnaturalizada durante 6 min a 73°C y enfriada en hielo. Colocar cubreobjetos evitando que se formen burbujas de aire.

⁴⁴ RNasa A: 100 µg/ml en 2xSSC.

⁴⁵ Pepsina: 0,005% en HCl 0,01N.

⁴⁶ Solución de Fijación FIX: 1% de Formaldehido, 50mM MgCl₂ en PBS.

⁴⁷ EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

MATERIALES Y METODOS

- Incubar durante 10-12 horas a 37°C en cámara húmeda.

LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN

- Lavar durante 5 min en 2xSSC.
- Lavar tres veces durante 5 min cada una en 50% formamida/2xSSC a 37°C.
- Lavar dos veces durante 5 min cada una en 2xSSC.

BLOQUEO DE LAS UNIONES INESPECÍFICAS

- Lavar en 4T⁴⁸ durante 5 min.
- Bloquear con 100 µl de 4M⁴⁹ e incubar en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar una vez durante 5 min en 4T.

REVELADO

• Fluorescencia directa

- Lavar las preparaciones a temperatura ambiente durante 5 min en 2X SSC.
- Incubar a 55-65°C durante 2 min en una solución de Nonidet P40 al 0.3% en 0.4X SSC. La temperatura de incubación depende del % de identidad de la sonda con la secuencia que se quiere detectar.
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 seg en una solución de Nonidet P40⁵⁰ al 0.1% en 2X SSC.
- Deshidratar mediante pasos seriados por etanol al 90% y etanol absoluto durante 5 min cada uno.
- Dejar secar y montar con Vectashield⁵¹-DAPI⁵² (Vector).

• Fluorescencia indirecta

- Incubar 30 min con 40 µl de avidina-FITC (dilución 1:1000 en 4T).
- Lavar tres veces durante 5 min cada una en 4T.
- Incubar 20 min con 40 µl de anti-avidina-Biotina (dilución 1:100 en 4M).
- Lavar tres veces durante 10 min cada una en 4T.

⁴⁸ 4T: 4xSSC; 0,05% Tween 20.

⁴⁹ 4M: 0.5 g de reactivo de bloqueo en 10 ml 4T.

⁵⁰ Nonidet P40: Detergente no iónico, no desnaturalizante.

⁵¹ Este medio de montaje amortigua la pérdida de fluorescencia que ocurre al someter la muestra a la acción de la lámpara UV para su observación.

⁵² DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

MATERIALES Y METODOS

- Incubar 20 min con 40 µl de avidina-FITC (dilución 1:1000 en 4T).
- Lavar tres veces durante 10 min cada una en 4T.

En caso de ser necesario, es posible amplificar la señal de hibridación. Para ello hay que repetir entre 2 y 3 veces el proceso de incubación con anti-avidina biotinilada seguido de incubación con avidina-FITC tal y como se ha descrito anteriormente.

- Lavar cuatro veces durante 5 min cada una en PBS.
- Deshidratar en una serie creciente de alcoholes, dejar secar y montar con Vectashield-DAPI (Vector).

Las imágenes fueron tomadas con los filtros FITC y DAPI en un microscopio de fluorescencia (Olimpus BX-51) equipado con una cámara refrigerada Olympus DP-70, y procesadas con el programa integrado en el software de la cámara.

5.3.2. FISH doble

En el caso de la FISH doble (ribosómico 5S y ADN repetitivo o dos ADN repetitivos diferentes BamHI-800 y BamHI210A) una de las sondas, marcada con dig-11-dUTP, se detecta mediante fluorescencia directa, mientras que la otra, marcada con biotina-16-dUTP, se detecta mediante fluorescencia indirecta, siguiendo los protocolos que se indican en el apartado anterior 5.3.1.

5.3.3. FISH ADN ribosómico y GISH (Genome In Situ Hybridization)

En el caso de la FISH para localizar ADNr se ha utilizado como sonda la secuencia del cistrón del ADNr de *Drosophila melanogaster* (1 µg de plásmido pDMra51) y se ha utilizado el método de marcaje por "Random Primer" (Apartado 2.7.1).

En el caso de la GISH también se ha utilizado el método de marcaje por "Random Primer" (Apartado 2.7.1) utilizando 1 µg de ADN genómico total de *B. bufo*, *E. calamita* o *B. viridis*.

6. Herramientas bioinformáticas

6.1. Bases de datos

En este trabajo se han utilizado las siguientes bases de datos: Scopus⁵³, WOS⁵⁴, Animal Genome Size Database Release 2.0⁵⁵, American Museum of Natural History⁵⁶, IUCN Red List⁵⁷, AmphibiaWeb⁵⁸, Xenbase⁵⁹, NCBI⁶⁰. Ocasionalmente se han utilizado otras bases de datos.

6.2. Análisis de secuencias y oligos

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas con el programa BioEdit versión 7.1.3.0 (Hall 1999). Para buscar posibles homologías, estas secuencias se compararon con las secuencias disponibles en bases de datos de secuencias (Genbank⁶¹, EMBL⁶², REPBASE⁶³, XenBase). La búsqueda se realizó utilizando el programa BLAST⁶⁴ (Altschul, Madden et al. 1997), con los parámetros suministrados por defecto por el programa.

Los alineamientos múltiples de las secuencias se realizaron con los programas Clustal W2⁶⁵, Clustal Omega⁶⁶ y MUSCLE⁶⁷.

El diseño de los “oligos” empleados en este estudio se realizó con el programa OLIGO⁶⁸ versión 7.0, y mediante Primer Blast⁶⁹.

⁵³ Scopus: <https://www.scopus.com/>

⁵⁴ WOS: <https://apps.webofknowledge.com/>

⁵⁵ Animal Genome Size Database: <http://www.genomesize.com/>

⁵⁶ American Museum of Natural History: <http://www.amnh.org/>

⁵⁷ IUCN Red List: <http://www.iucnredlist.org/>

⁵⁸ AmphibiaWeb: <http://www.amphibiaweb.org/>

⁵⁹ Xenbase: <http://www.xenbase.org/>

⁶⁰ NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁶¹ Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

⁶² EMBL: www.embl.org/

⁶³ REPBASE: www.girinst.org/replib/

⁶⁴ BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁶⁵ Clustal w2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>

⁶⁶ Clustal Omega: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

⁶⁷ MUSCLE: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

⁶⁸ OLIGO: <http://www.oligo.net/>

⁶⁹ Primer Blast: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

6.3.Filogenias

El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA6, versión 6.06 (Tamura *et al.* 2013). Para la construcción de árboles filogenéticos, en cada familia de repetitivo se eligió el modelo de sustitución nucleotídica con menor parámetro de AICc (Akaike information criterion corrected). El método estadístico utilizado ha sido el de Maxima Verosimilitud (ML) con 1.000 réplicas de *bootstrap*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis cromosómico

En la familia Bufonidae es posible encontrar variaciones intraespecíficas relativas a la posición de bandas C (Schmid 1978; Spasic-Boskovic *et al.* 2000), al tamaño y número de las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs) (Foote *et al.* 1991; Azevedo *et al.* 2003), o a la ploidía (Stöck *et al.* 2010).

Para determinar si existen variaciones respecto a las características citogenéticas anteriormente mencionadas, se ha realizado un análisis citogenético mediante bandeo C, tinción Ag-NOR e hibridación in situ genómica (GISH, de sus siglas del inglés "Genome In Situ Hybridization") en algunas de las especies estudiadas en este trabajo.

Concretamente, este análisis se ha realizado en las especies *Bufo bufo*, *Epidalea calamita* y *Bufo viridis*, ya que en éstas ha sido posible la obtención de cromosomas metafásicos utilizando la médula ósea de individuos adultos, o cultivos primarios/secundarios establecidos a partir de larvas en desarrollo.

1.1. Bando C

El bandeo C, que pone de manifiesto la presencia de regiones de heterocromatina constitutiva, se ha realizado siguiendo el protocolo de Sumner (1972), probando distintos tiempos y temperaturas de incubación. Los mejores resultados se han observado con tratamientos de 20 min en HCl 0.15 N a temperatura ambiente, 20 min en 5% Ba(OH)₂ a 50°C y 45 min en 2XSSC a 60°C. Con este protocolo, además de observar las bandas más intensas, también pueden apreciarse algunas bandas de heterocromatina que coinciden con bandas Q (tinción con quinacrina) descritas por Schmid (1978) en posiciones terminales e intersticiales. Con incubaciones más cortas, sin embargo, solo se ponen de manifiesto las bandas C más intensas, por lo que a veces no se aprecian las señales centroméricas y/o teloméricas de las especies de *E. calamita* y *B. viridis*. Por otro lado, con incubaciones más prolongadas apenas se observaban bandas y los cromosomas adoptan un aspecto "deshilachado" (datos no mostrados).

En la especie *B. bufo* se aprecia con claridad la presencia de bandas C positivas en todos los centrómeros, tanto de los cromosomas grandes como de los pequeños (Figura 6). Este patrón de bandas C centroméricas coincide con el descrito por otros autores en muestras de *B. bufo* procedentes de Alemania, Yugoslavia y oeste de Rusia (Olmo 1973; Baldari *et al.* 1976; Schmid 1978; Birstein *et al.* 1982; Spasic-Boskovic *et al.* 2000). Además de las bandas C centroméricas,

RESULTADOS Y DISCUSION

también se observan señales positivas en la región próxima al centrómero del brazo corto de la pareja 1 (1p), en el brazo largo de la pareja 5 (5q) y a ambos lados de la constricción secundaria correspondiente a la NOR. Estas señales positivas coinciden con bandas Q previamente descritas para esta especie (Schmid 1978; Spasic-Boskovic *et al.* 2000). Sin embargo, no hemos podido identificar con claridad la banda telomérica del brazo largo de la pareja 4 (4q) descrita por Schmid (1978), ni la banda C pericentromérica del brazo corto de la pareja 2 (2p), descrita por Spasic-Boskovic *et al.* (2000). Estas señales podrían ser ejemplos de variabilidad en los patrones

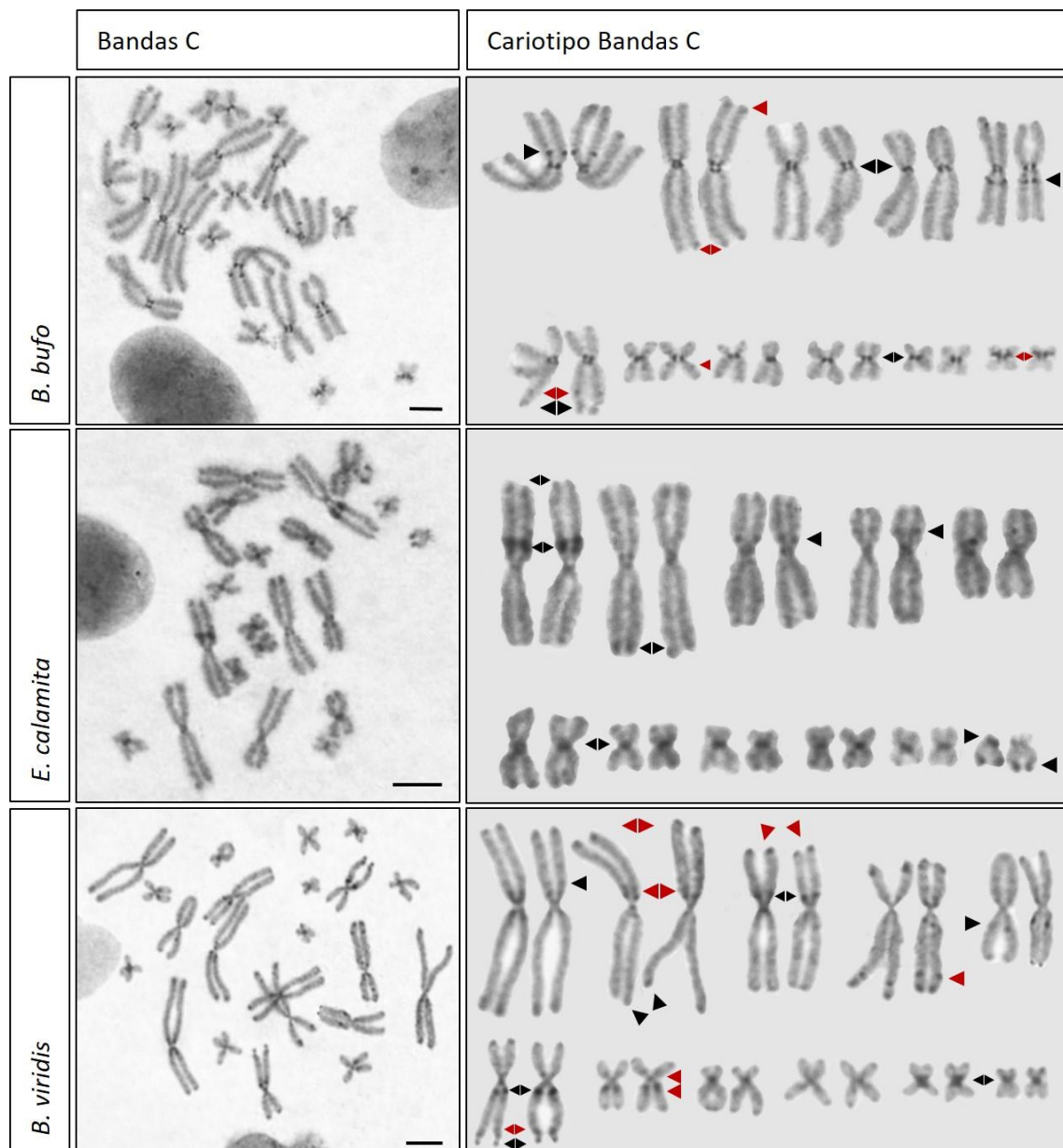


Figura 6. Bando C en cromosomas metafásicos de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*. Para cada especie se incluye, junto a la foto de una metafase teñida mediante bando C, el cariotipo correspondiente en el que se observa que todos los centrómeros son C positivos. Mediante flechas negras se señalan las bandas C positivas ya descritas por otros autores, mientras que mediante flechas rojas se señalan bandas C positivas no descritas (algunas coinciden con bandas Q débiles). Escala 2,5 μm .

de bandas C de *B. bufo*, ya que Spasic-Boskovic *et al.* (2000) describen la señal en 2p precisando en su trabajo que es específica de poblaciones de *B. bufo* de Yugoslavia, por no estar presente en poblaciones de *B. bufo* de Alemania (Schmid 1978) o del oeste de Rusia (Birstein 1982).

En la especie *E. calamita* también se observan bandas C positivas en la heterocromatina centromérica de todas las parejas cromosómicas. Además, en la mayoría de los cromosomas aparecen señales positivas próximas a la región centromérica, como ocurre en los brazos cortos de las parejas 1, 3 y 4 (1p, 3p y 4p). Por otro lado, en esta especie la NOR (localizada en posición terminal del brazo largo de la pareja cromosómica 11) también podría estar delimitada a ambos lados por bandas C positivas, aunque el pequeño tamaño de la pareja portadora no permite diferenciarlo con nitidez.

En la especie *B. viridis*, además de las bandas centroméricas C positivas características de numerosas especies de la familia Bufonidae, en la mayoría de las parejas cromosómicas se observan señales teloméricas. La mayor parte de estas señales teloméricas fueron descritas por Schmid (1978) como bandas con fluorescencia débil tras la tinción con quinacrina. Por otro lado, al igual que en *B. bufo* y *E. calamita*, las NORs de *B. viridis* (localizadas en posición subterminal del brazo largo de la pareja 6) se encuentran delimitadas por bandas C positivas. En esta especie también se han observado algunas bandas C positivas no descritas previamente. Concretamente, en posiciones terminal y próxima al centrómero del brazo corto de la pareja 2 (2p), en posición terminal del brazo corto de la pareja 3 (3p), en posición subterminal del brazo largo de la pareja 4 (4q) y a ambos lados del centrómero de la pareja 7 (7p y 7q). Estas señales parecen indicar la existencia de diferencias poblacionales, algo que no sería de extrañar en una especie con un rango de distribución tan amplio como el de *B. viridis*.

1.2. Tinción Ag-NOR

Cuando las NORs activas se ponen de manifiesto mediante tinción Ag-NOR, en las tres especies analizadas se observa una única señal en una de las parejas cromosómicas (Figura 7). En las especies *B. bufo* y *B. viridis* las NORs están localizadas en posición subterminal del brazo largo de la pareja 6, mientras que en *E. calamita* se localizan en posición terminal en el brazo largo de la pareja 11 (Figura 7). En ocasiones, en la especie *B. bufo* también se observan señales positivas en posiciones diferentes a las de la NOR, que pueden localizarse en los centrómeros de las parejas grandes y/o, en ocasiones, a uno o ambos lados del centrómero (Figura 9). Esta señal no se debe a la presencia de cistrones ribosómicos en otras posiciones, ya que mediante FISH la señal positiva en esta especie está presente en una única pareja de cromosomas (Figura 8).

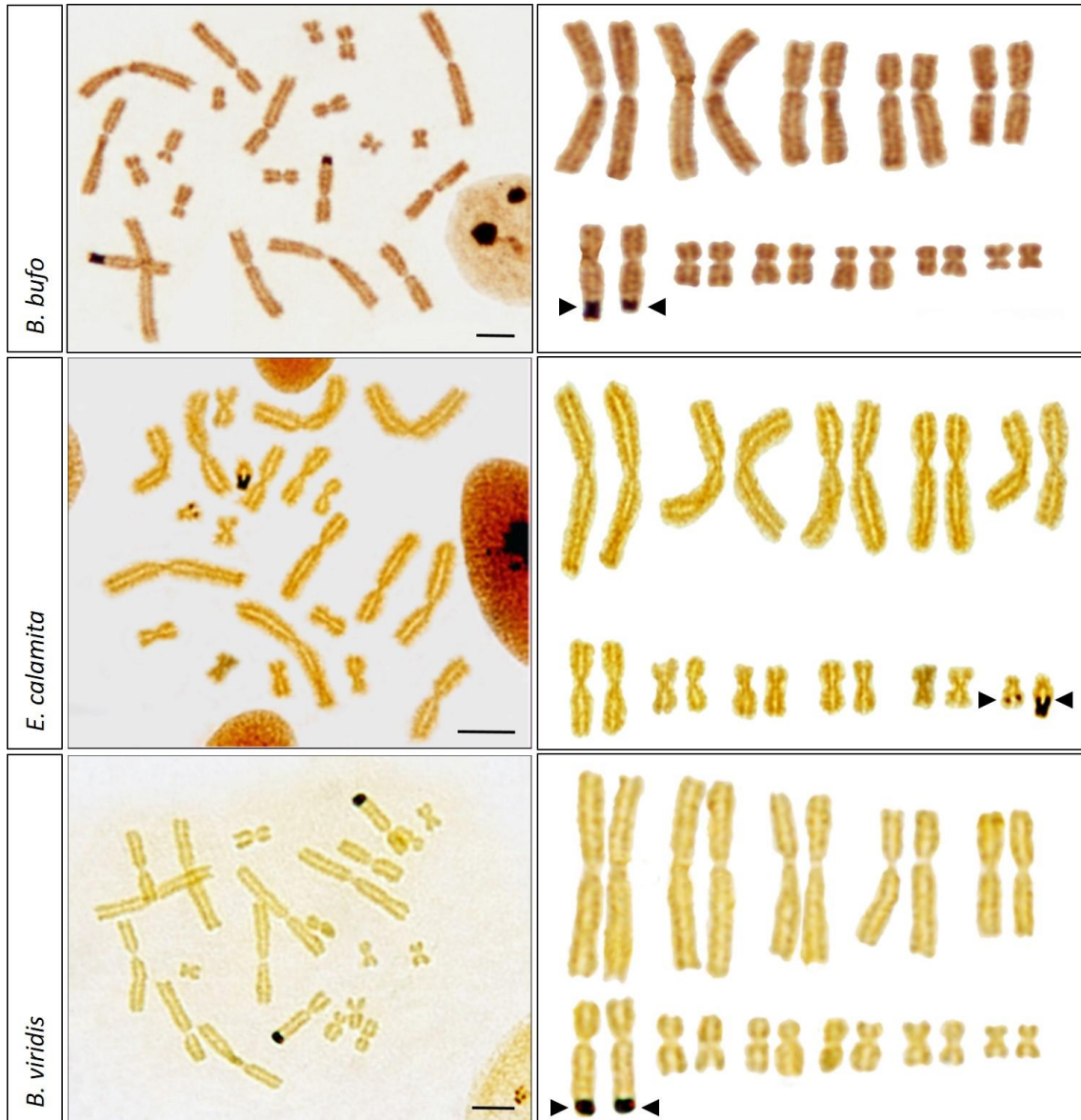


Figura 7. Tinción Ag-NOR en cromosomas metafásicos de las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*. Para cada especie se muestra, junto a la foto de una metafase teñida con plata, el cariotipo correspondiente. En cada una de las especies se señala, mediante flechas negras, la pareja cromosómica con señal positiva para la tinción con plata. Escala 2,5 μ m.

En las tres especies analizadas (*B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*) se ha observado un polimorfismo para el tamaño de la NOR, aunque en *B. viridis* no es tan evidente como en las otras dos especies. Para comprobar si este polimorfismo está causado por diferencias en el número de secuencias repetidas del clúster de ADNr, y no por una activación diferencial de la expresión de los genes ribosómicos, se ha analizado el tamaño de las NORs mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre cromosomas metafásicos de cada una de estas especies, utilizando como sonda la secuencia del cistrón del ADNr de *Drosophila melanogaster*. Los resultados obtenidos en las tres especies (Figura 8) muestran una única señal positiva que coincide con la señal observada en tinciones con plata y con las descritas por otros autores (Schmid 1978; Spasic-Boskovic *et al.*

RESULTADOS Y DISCUSION

2000; Stöck *et al.* 2001; Odierna *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2008). En cuanto al tamaño de la señal, en *E. calamita* se observan diferencias en la intensidad de la misma, mientras que en *B. bufo* y *B. viridis* éstas no son evidentes.

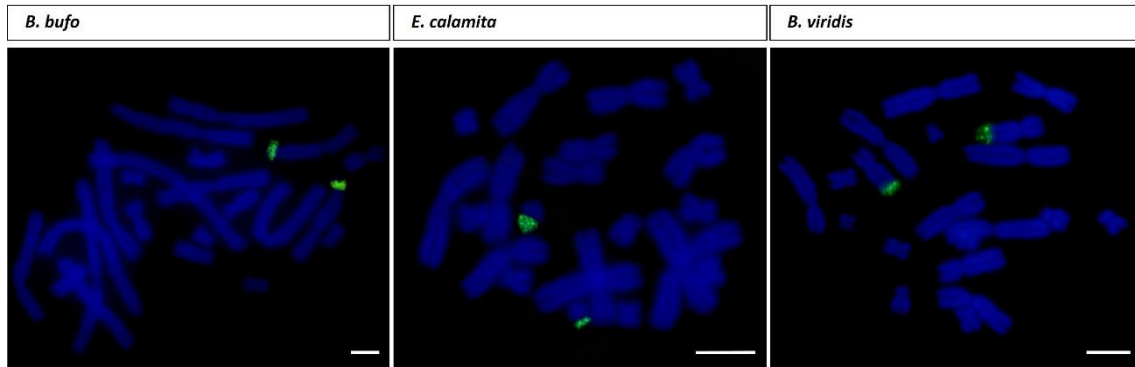


Figura 8. Hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*, utilizando como sonda la secuencia del cistrón del ADNr de *Drosophila melanogaster*. Las preparaciones utilizadas en experimentos de FISH son del mismo individuo que las preparaciones mostradas en la Figura 2. Escala 2,5 μ m.

Con estos resultados no puede descartarse que las NORs con mayor expresión den lugar a mayor descondensación y, por tanto, dejen más expuestas a estas regiones cuando se realiza hibridación con sondas específicas. Sin embargo, esto no es lo que se observa en la especie *B. bufo*, que presenta polimorfismo mediante tinción Ag-NOR, pero no mediante FISH con ADNr. Por tanto, las diferencias en la intensidad de la señal de FISH observadas en *E. calamita* podrían explicarse por la existencia de diferencias en el número de copias de ADNr en la pareja portadora de la NOR.

Las señales Ag-positivas identificadas en *B. bufo* en posiciones diferentes a las de la NOR no son debidas a la existencia de cistrones ribosómicos en otras regiones, ya que mediante FISH la señal positiva en esta especie está presente en una única pareja de cromosomas. Por otro lado, estas señales se localizan en los centrómeros de las parejas grandes, pudiendo adquirir la forma de dos señales simétricas localizadas a uno o ambos lados del centrómero en cromosomas poco condensados (Figura 9). La presencia de señales Ag-positivas diferentes a las de las NORs activas también se han observado en otras especies (Haaf *et al.* 1984; Jimenez *et al.* 1988; Sudman *et al.* 1989; Murray *et al.* 1992). Se ha propuesto que se originan por la unión del nitrato de plata a proteínas ácidas (no histonas) localizadas en regiones como el centrómero, similares a las que se pueden encontrar en la NOR durante su fase transcripcional activa. Esto explicaría las señales

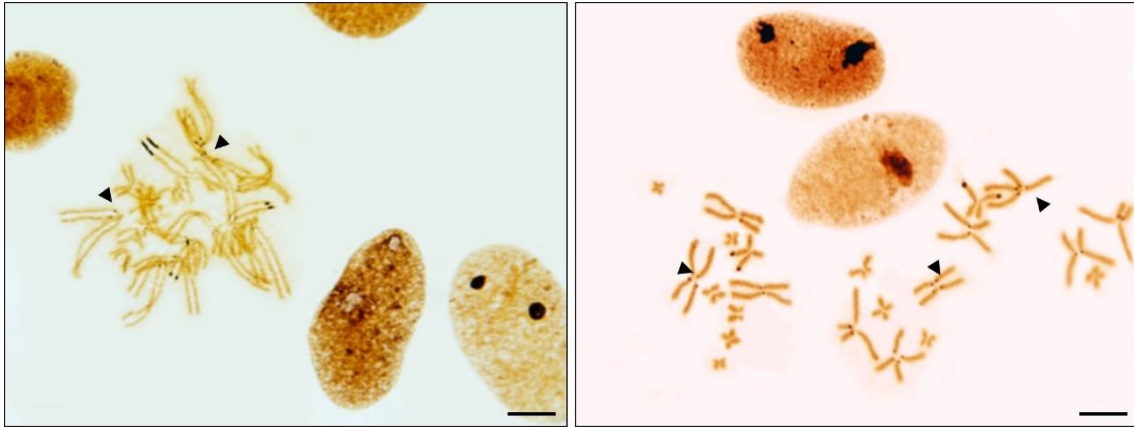


Figura 9. Tinción Ag-NOR en cromosomas de *B. bufo* mostrando señal positiva en la pareja 6, en posición subterminal. También se observan señales en algunos centrómeros de las parejas grandes (señalados mediante flechas negras). Escala 2,5 μ m.

centroméricas Ag-positivas de *B. bufo*, atribuidas a la presencia de amplias regiones de heterocromatina asociadas a las regiones centroméricas y pericentroméricas a las que se unirían estas proteínas.

Una explicación alternativa propone que se originan por la descondensación de la heterocromatina (Murray *et al.* 1992), exponiendo al ADN satélite centromérico, que se extiende sobre los centrómeros nativos y la heterocromatina pericentromérica circundante. Este satélite pueden variar no solo entre especies sino entre diferentes parejas de cromosomas, lo que explicaría la presencia de señal solo en las parejas de cromosomas grandes de la especie *B. bufo* (Plohl *et al.* 2008).

Por regla general, las especies de la familia Bufonidae presentan una única pareja portadora de NOR, aunque ésta no se localiza en la misma posición en todas las especies (Schmid 1978; Spasic-Boskovic *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2008). Independientemente de su localización (pareja 6 en *B. bufo* y *B. viridis* y pareja 11 en *E. calamita*), las NORs en estas tres especies se encuentran delimitadas a ambos lados por bandas C positivas de heterocromatina constitutiva. Teniendo en cuenta que en la familia Bufonidae las rupturas cromosómicas parecen producirse preferentemente en regiones con heterocromatina constitutiva (Bogart 1972), se ha propuesto que las NORs se transferirían entre cromosomas mediante translocaciones e inversiones, en forma de paquetes completos y no como unidades múltiples más pequeñas (Schmid 1978). Los resultados de bancas C y NORs obtenidos en estas tres especies apoyarían esta hipótesis.

1.3. Hibridación in situ genómica (GISH)

Cuando se comparan preparaciones cromosómicas de las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*, puede apreciarse una importante diferencia en el tamaño de los cromosomas. Así, los

RESULTADOS Y DISCUSION

cromosomas de *B. viridis* son de mayor tamaño que los cromosomas de *E. calamita* y menores que los de *B. bufo* ($B. bufo > B. viridis > E. calamita$) (Figura 10 y Figura 6).

Estas diferencias de tamaño podrían explicarse por diferencias en la compactación de la cromatina. Sin embargo, la existencia de diferencias en el contenido de ADN parece la explicación más plausible ya que, según la base de datos "Animal Genome Size Database" (Release 2.0), el contenido de ADN por núcleo en *B. bufo* varía entre 5.88 y 7.75 pg, mientras que en *B. viridis* y *E. calamita* este valor está comprendido entre 3.82-6.84 pg y 4.01-5.7 pg respectivamente.

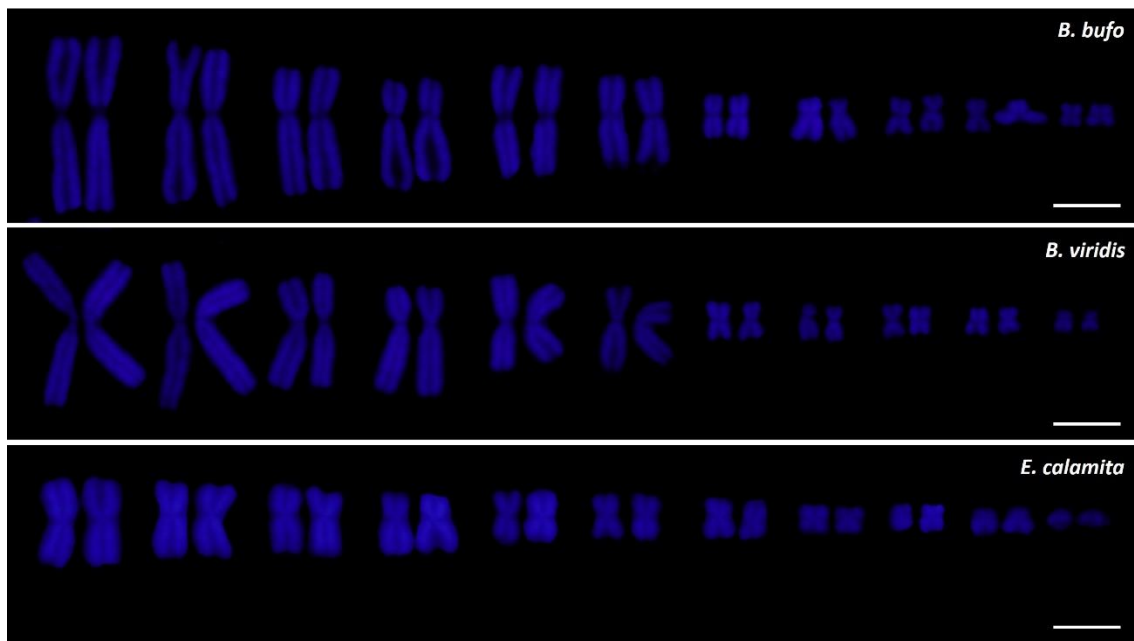


Figura 10. Cariotipos de las especies *B. bufo*, *B. viridis* y *E. calamita* obtenidos a partir de cromosomas metafásicos teñidos con DAPI. Escala 2,5 μ m.

Si tenemos en cuenta que los cariotipos de bandas C o Q no muestran grandes bloques de heterocromatina en estas especies (Figura 6 y (Schmid 1978)), no es probable que las diferencias en el tamaño de los cromosomas se deban a diferencias en la cantidad de heterocromatina constitutiva. Por otro lado, el análisis de la cinética de reasociación del ADN indica que las diferencias en el tamaño cromosómico y, por tanto, en el tamaño del genoma por núcleo de estas especies, se deben a diferencias en la cantidad de secuencias altamente repetidas y, en mayor medida, a diferencias en la cantidad de secuencias medianamente repetidas (Baldari *et al.* 1976).

Los anuros presentan gran cantidad de secuencias medianamente repetidas que pueden pasar desapercibidas mediante técnicas citogenéticas clásicas, como el bandeo C o G. Para obtener información sobre la cantidad y distribución de secuencias de ADN repetido en estas especies

RESULTADOS Y DISCUSION

se han realizado hibridaciones in situ sobre cromosomas metafásicos de cada una de estas especies utilizando ADN genómico como sonda (GISH). De este modo es posible obtener información sobre la cantidad y distribución de las secuencias repetidas en cada especie, así como sobre las similitudes entre ADNs repetitivos de especies relacionadas.

Cuando los cromosomas de las tres especies analizadas se hibridan con ADN genómico de la propia especie se obtienen los resultados que se muestran en la Figura 11. El patrón de hibridación en las tres especies indica que éstas presentan gran cantidad de secuencias repetidas distribuidas uniformemente a lo largo de todos los cromosomas. Por otro lado, en *B. bufo*, y *B. viridis* se observa gran acumulación de ADN repetitivo en los centrómeros de todos los cromosomas, mientras que en *E. calamita* esta acumulación no es tan evidente y se localiza preferentemente en los extremos de los cromosomas.

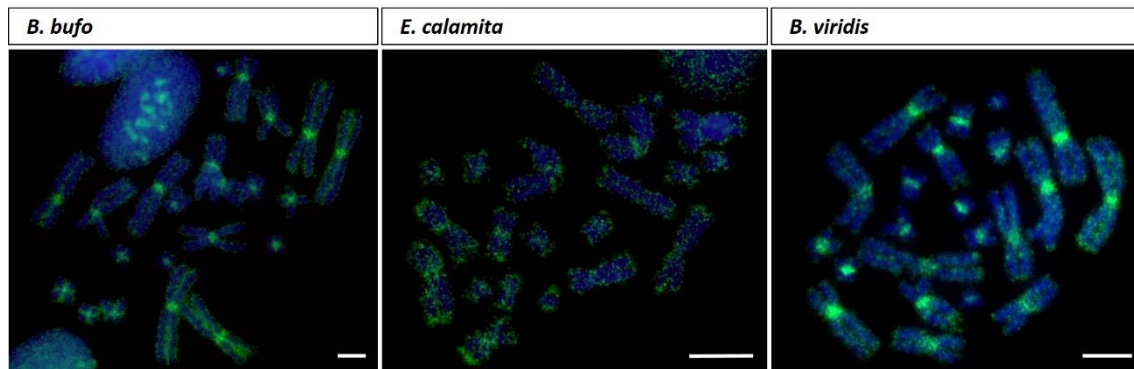


Figura 11. GISH sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis* utilizando como sonda en cada caso el ADN genómico de la propia especie. Escala 2,5 μ m.

La GISH cruzada entre las especies *B. bufo* y *E. calamita* revela que las secuencias de ADN repetitivo son comunes, aunque su cantidad relativa y distribución es diferente en cada una de ellas (Figura 12). Así, cuando se hibridan los cromosomas de *B. bufo* utilizando como sonda el ADN genómico de *E. calamita*, la señal dispersa se observa en todos los cromosomas, pero la acumulación se localiza ahora en los extremos de todos los cromosomas y no en los centrómeros.

Si el experimento se realiza a la inversa y los cromosomas de *E. calamita* se hibridan con ADN genómico de *B. bufo*, se aprecia una distribución uniforme de la señal a lo largo de todos los cromosomas, lo que indica que ambas especies tienen secuencias repetidas similares, aunque con número de copias distinto y

RESULTADOS Y DISCUSION

cromosomas, con mayor acumulación de la señal en sus extremos. Estos resultados indican que distribuidas de forma diferente en el genoma de cada una de estas especies.

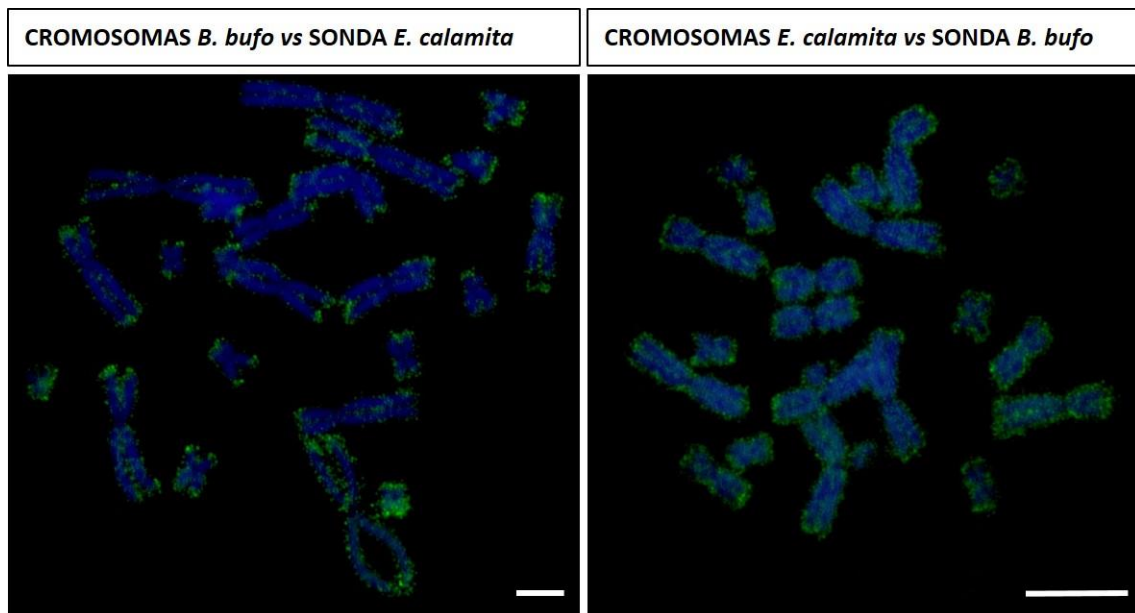


Figura 12. GISH cruzada. Los cromosomas metafásicos de *B. bufo* y *E. calamita* son hibridados utilizando como sonda el ADN genómico de *E. calamita* y *B. bufo* respectivamente. Escala 2,5 μ m.

2. Identificación de secuencias de ADN repetido en la especie *Bufo*

bufo

Uno de los métodos clásicos más utilizados para buscar secuencias de ADN repetitivo es la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción. Con algunas enzimas de restricción es posible identificar patrones de bandas intensas en geles de agarosa cuando los ADNs digeridos se separan por sus tamaños mediante electroforesis. Estas bandas más intensas indican la presencia de ADN repetido con dianas para el enzima de restricción utilizado localizadas dentro de la unidad de repetición. En función de la complejidad del ADN repetido, el patrón de bandas observado puede variar.

Utilizando este método se han identificado familias de ADN repetido en humanos (Miller *et al.* 1988) y en distintas especies animales, como ratón (Horz *et al.* 1981), peces (Garrido-Ramos *et al.* 1994), o anfibios (este es el caso de salamandras del género *Hydromantes* (Nardi *et al.* 1999), *Xenopus laevis* (Botchan *et al.* 1977; Hummel *et al.* 1984), *Rana graeca italica* (Cardone *et al.* 1997), *Discoglossus pictus* (Amor *et al.* 2009) o *Bufo viridis* (Odierna *et al.* 2004).

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuando el ADN genómico de *B. bufo* se digiere con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *AluI*, *Sall*, *KpnI* y *SmaI* (Figura 13), es posible observar bandas más intensas con algunas de las enzimas utilizadas (*PstI*, *BamHI* y *AluI*), que ponen de manifiesto la presencia de secuencias repetidas (Figura 13).

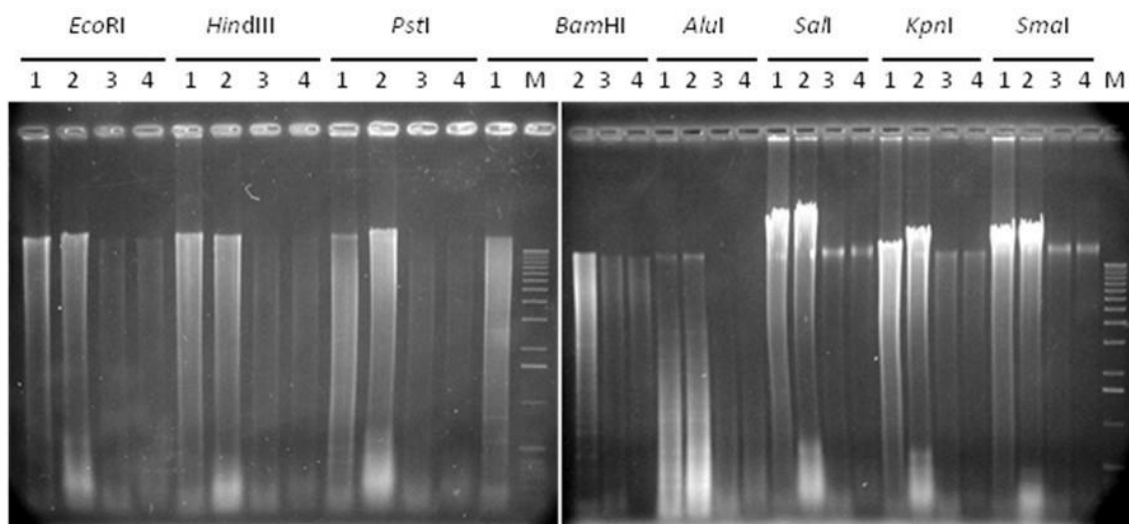


Figura 13. ADN genómico de *B. bufo* (1 y 2) y *X. tropicalis* (3 y 4) digerido con distintas enzimas de restricción y separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X. El ADN genómico de partida corresponde a (1) *B. bufo* macho, (2) *B. bufo* hembra, (3) *Xenopus tropicalis* macho y (4) *X. tropicalis* hembra. M: marcador de peso

El mayor número de bandas se obtiene con el enzima *BamHI*, con bandas más intensas de 190, 210, 600 y 800 pb (Figura 14A). Además, con este enzima se observan otras bandas de 400, 1.000 y > 1.000 pb, de menor intensidad y de reproducibilidad menor, ya que solo aparecen en algunas digestiones (Figura 14B y Figura 14C).

Para comprobar si las bandas observadas tras la digestión con *BamHI* forman parte de la misma familia de ADN repetitivo, a partir del gel de agarosa se purificaron los fragmentos de 190, 210, 600 y 800 pb. En cada caso las bandas fueron marcadas con digoxigenina mediante "random priming". Las sondas así obtenidas se hibridaron por separado con ADN genómico de *B. bufo* digerido con *BamHI* y transferido a una membrana de nailon mediante "Southern Blot" tras su electroforesis en geles de agarosa (Figura 15).

Cuando se utilizan como sondas los fragmentos de 190 y 600 pb se observa una única banda en cada caso (Figura 15A y Figura 15B), que se corresponde en tamaño con la banda del gel de agarosa de la que procede la sonda.

Por otro lado, cuando se utilizan como sondas los fragmentos de 210 y 800 pb, se obtiene un patrón de bandas múltiple y diferente en cada caso: con la sonda BamHI-210 se observan bandas

RESULTADOS Y DISCUSION

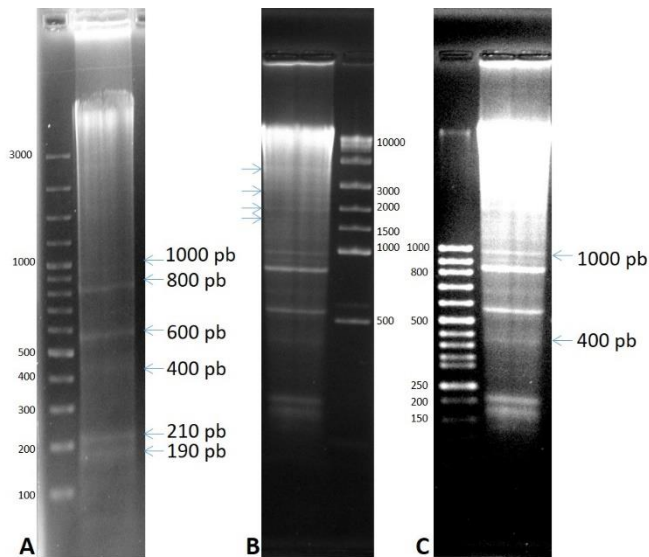


Figura 14. ADN genómico de *B. bufo* (macho 2 de Bolonia) digerido con *Bam*HI y separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X. En cada carril se muestra la digestión de 10 µg de ADN. A: Se señalan las bandas de 190, 210, 400, 600, 800 y 1000 pb. B: Detalle de las bandas mayores de 1000 pb (señaladas con flechas). C: Detalle de las bandas de 400 y 1000 pb.

de unos 210, 425, 560*, 640, 810 y 1030 pb (Figura 15C), mientras que con la sonda *Bam*HI-800 las bandas son de unos 810, 1630, 2060* y 2480 pb (Figura 15D).

Con ambas sondas (*Bam*HI-210 y *Bam*HI-800) se obtienen patrones en escalera con tamaño de monómero de 210 y 800 respectivamente. La excepción la constituyen las bandas de 560⁷⁰ y 2060⁷¹ pb. Estos patrones de bandas podrían explicarse si ambos ADNs repetidos están organizados en tándem, correspondiendo cada

una de las bandas a monómeros, dímeros, trímeros, ... de la unidad repetida. Por otro lado, dado que el patrón de bandas obtenido con las sondas *Bam*HI-210 y *Bam*HI-800 es diferente, puede concluirse que ambas familias de ADN repetitivo no están relacionadas.

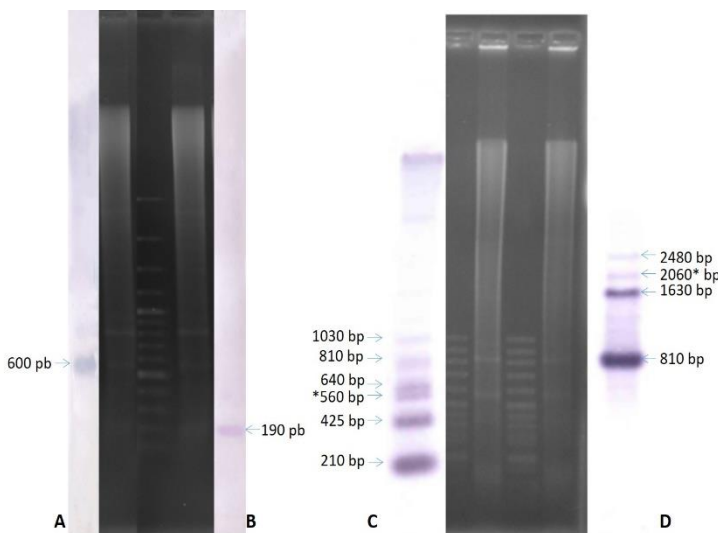


Figura 15. "Southern Blot" de ADN genómico de *B. bufo* (5 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con distintas sondas: (A) banda de 600 pb; (B) banda de 190 pb; (C) banda de 210 pb y (D) banda de 800 pb (D).

A continuación, se analizan los resultados obtenidos tras el estudio citogenético y molecular de estas familias de ADN repetitivo en especies de la familia Bufonidae.

⁷⁰ La banda de 560 pb está formada por otro ADN repetitivo que será analizado más adelante (210A-inserto).

⁷¹ La banda de 2.060 pb puede explicarse por la actividad estrella que presenta el enzima *Bam*HI cuando actúa en condiciones no óptimas, ya que esta banda no se observa en todos los casos.

3. Análisis de la familia de ADN repetido

BamHI-800 en la especie *Bufo bufo*

3.1. Patrones de hibridación

En ocasiones la presencia/ausencia de un ADN repetitivo, o la variación en su patrón de bandas, puede servir de marcador para diferenciar individuos de distintas poblaciones (Awise *et al.* 1979; Xiao *et al.* 1993; Hikosaka *et al.* 2000; Hikosaka *et al.* 2004) o incluso de la misma población (Cardone *et al.* 1997). Por otro lado, cuando los ADNs repetidos están asociados a los cromosomas sexuales, éstos pueden poner de manifiesto diferencias ligadas al sexo en los patrones de bandas si están localizados fuera de la región pseudoautosómica (Tone *et al.* 1982).

Para comprobar si la familia de ADN repetitivo BamHI-800 presenta diferencias entre individuos de distintas poblaciones, o entre individuos de distinto sexo, se analizó el patrón de bandas de muestras de ADNs de individuos procedentes de Bolonia (Italia) y Jaén (España) (Figura 16A), y de individuos de ambos sexos (Figura 16B).

Los resultados indican que el patrón de bandas del ADN repetitivo BamHI-800 no presenta polimorfismos en muestras de distintas poblaciones, o entre muestras de distintos sexos.

3.2. Clonación y análisis de las secuencias BamHI-800 en *B. bufo*

La banda de 800 pb que se obtiene tras la digestión de ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI, fue purificada a partir del gel de agarosa, ligada a un vector de clonación y utilizada para transformar bacterias competentes.

Los clones positivos para el ADN repetido BamHI-800 se identificaron transfiriendo el ADN plasmídico de clones recombinantes a membranas de nailon, e hibridando éstas con la sonda BamHI-800 marcada con digoxigenina. De este modo se identificaron 8 clones positivos que fueron posteriormente secuenciados (Tabla 9).

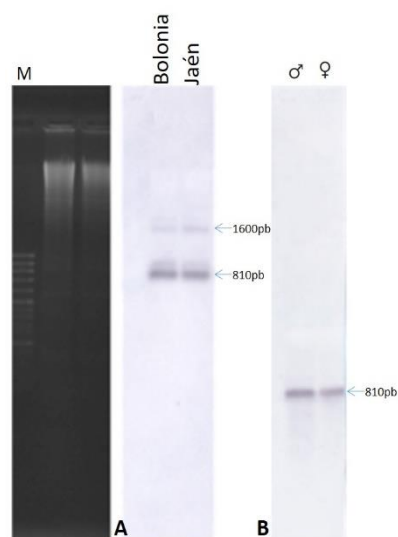


Figura 16. "Southern Blot" de ADN genómico de *B. bufo* (10 μ g) digerido con *Bam*HI e hibridado con la sonda BamHI-800. A: Comparación del patrón de bandas de muestras de *B. bufo* procedentes de Bolonia (Italia) y de Jaén (España). B: Comparación del patrón de bandas de muestras de *B. bufo* de ambos sexos procedentes de Bolonia.

RESULTADOS Y DISCUSION

Nombre de clon	Tamaño
Bbu_BamHI-800_BH2-86	816 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-88	795 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-89	816 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-95	817 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-105	817 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-113	817 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-118	498 pb
Bbu_BamHI-800_BH2-135	480 pb

Tabla 9. Clones BamHI-800 procedentes de la banda de 800 pb aislada a partir de ADN genómico de *B. bufo* digerido con *Bam*HI y separado mediante electroforesis en geles de agarosa.

El tamaño de los fragmentos clonados oscila entre 800 y 817 pb, que es el tamaño esperado para la unidad monomérica (800 pb), aunque en dos casos los insertos fueron menores de 500 pb. El análisis posterior de las secuencias reveló que se trataba de fragmentos incompletos, por lo que fueron excluidos del análisis.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalW y editadas con BioEdit (Figura 17). Los resultados indican que todos los clones alinean entre sí, mostrando variaciones únicamente en algunas posiciones nucleotídicas y, en un caso (Bbu_BamHI-800_BH2_88) una pequeña delección interna de 22 pb.



Figura 17. Alineamiento de los monómeros de BamHI-800 de *B. bufo* obtenidos a partir de la banda de 800 pb observada tras la de digestión del ADN genómico con *Bam*HI. El alineamiento se ha realizado con el programa ClustalW, mientras que las secuencias se han editado con BioEdit. Mediante flechas se han marcado las posiciones en las que hibridan los cebadores utilizados para amplificar el ADN repetido BamHI-800 mediante PCR.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las secuencias obtenidas a partir de la banda de 800 pb permiten diseñar cebadores específicos localizados en las regiones más conservadas. Para comprobar que este ADN repetido se encuentra organizado en tándem, se han diseñado dos parejas de cebadores: una mirando hacia dentro (Bbu.BamHI-800-F1 y Bbu.BamHI-800-R1) y otra hacia fuera (Bbu.BamHI-800-F2 y Bbu.BamHI-800-R2) en relación a las secuencias de la Figura 17 (Figura 18 y Tabla 3). De este modo, si el ADN repetitivo BamHI-800 estuviese organizado en tándem, ambas parejas de oligonucleótidos darían lugar a una banda de 810 pb, junto con bandas formadas por dímeros, trímeros, etc.

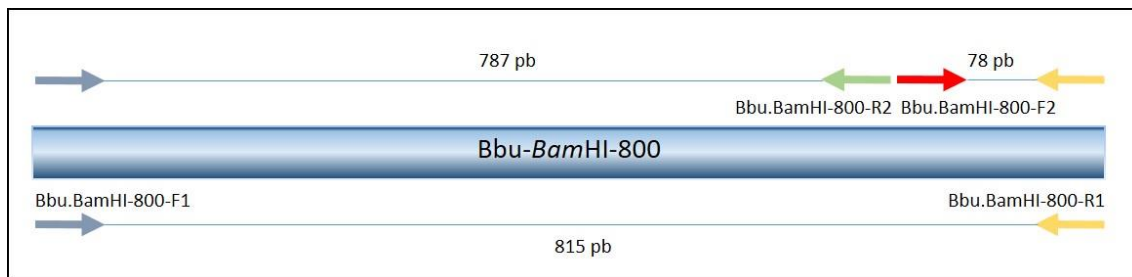


Figura 18. Sitios de unión de los cebadores a la unidad monomérica de BamHI-800 y tamaño de los amplicones que se obtendrían con éstos.

Cuando estos cebadores se utilizan en reacciones de PCR con ADN genómico de *B. bufo* se obtiene una banda intensa de 800 pb, y bandas de menor intensidad de 1.600 y 2.400 pb (Figura 19A). Estas bandas corresponden al ADN repetitivo BamHI-800, ya que dan lugar a señales positivas cuando son hibridadas con la sonda BamHI-800 después de ser transferidas a una membrana de nailon (Figura 19B).

Los patrones de bandas son similares con las dos parejas de cebadores (Bbu.BamHI-800-F1/R1 y Bbu.BamHI-800-F2/R2), por lo que este ADN repetido debe encontrarse organizado en tándem, dada la orientación y localización de los sitios de unión de estos cebadores (Figura 18).

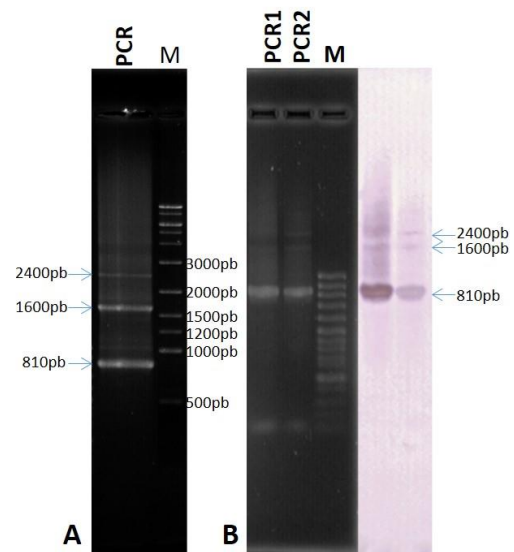


Figura 19. A: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR obtenido con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F1/Bbu.BamHI-800-R1 sobre ADN genómico de *B. bufo*. B: "Southern Blot" del producto de PCR1 (cebadores Bbu.BamHI-800-F1/Bbu.BamHI-800-R1) y PCR2 (cebadores Bbu.BamHI-800-F2/Bbu.BamHI-800-R2) hibridado con la sonda BamHI-800 de *B. bufo*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Procedencia	Nombre	Tamaño
Banda <i>B. bufo</i> (Bolonía) Italia	Bbu-BamHI-800-BH2-86	816
	Bbu-BamHI-800-BH2-88	795
	Bbu-BamHI-800-BH2-89	816
	Bbu-BamHI-800-BH2-95	817
	Bbu-BamHI-800-BH2-105	817
	Bbu_BamHI-800_BH2-113	817
PCR F1/R1 <i>B. bufo</i> (Jaén) España	BbuC-BamHI-800-PCR11-1	815
	BbuC-BamHI-800-PCR11-2	816
	BbuC-BamHI-800-PCR11-3	816
	BbuC-BamHI-800-PCR11-4	815
	BbuC-BamHI-800-PCR11-6	817
	BbuM-BamHI-800-PCR11-1	816
PCR F1/R1 <i>B. bufo</i> Marruecos	BbuM-BamHI-800-PCR11-2	815
	BbuM-BamHI-800-PCR11-4	815
	BbuM-BamHI-800-PCR11-5	816
	BbuM-BamHI-800-PCR11-6	814
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR6-14	816
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-3	810
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-6	779
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-9	810
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-11	810
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-14	789
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-15	810
	Bbu-BamHI-800-JH6-PCR2-16	811
	Bbu-BamHI-800-JH2-PCR2-18	811
	Bbu-BamHI-800-JH2-PCR2-19	810
	Bbu-BamHI-800-JH2-PCR2-20	810
	Bbu-BamHI-800-JH2-PCR2-24	811
	Bbu-BamHI-800-JH2-PCR2-25	810
	PCR F2/R2 <i>B. bufo</i> (Jaén) España	Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-26
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-27		810
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-28		811
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-29		781
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-30		810
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-31		811
Bbu-BamHI-800-JM2-PCR2-32		811
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-33		810
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-35		810
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-36		810
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-39	810	
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-40	811	
Bbu-BamHI-800-JM3-PCR2-42	810	

Tabla 10. Monómeros de ADN repetitivo BamHI-800 de *B. bufo* analizados en este trabajo. Para cada monómero se indica el nombre, el tamaño, la pareja de cebadores utilizada y el origen geográfico del ADN genómico empleado en las reacciones de PCR.

Los fragmentos de 800 pb⁷² se clonaron y se secuenciaron. En total se han obtenido 11 secuencias a partir de PCRs en las que se utilizaba la pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F1/R1, y 25 con la pareja Bbu.BamHI-800-F2/R2 (Tabla 10).

Estas secuencias se alinearon utilizando los programas ClustalW y Muscle, y se editaron con BioEdit o MEGA respectivamente ([Material suplementario S1](#)). Para facilitar el alineamiento de las secuencias procedentes de PCRs realizadas con las dos parejas de cebadores, éstas se alinearon frente a las secuencias obtenidas inicialmente a partir de la banda de 800 pb aislada tras la digestión de ADN genómico con *Bam*HI.

Todas las secuencias alinean entre sí, mostrando un alto número posiciones conservadas (718), frente a posiciones variables (99), de las que más de la mitad son polimorfismos de un único nucleótido.

⁷² Obtenidos con ambas parejas de cebadores y de PCRs con ADN de individuos de distinta procedencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª Posición Nucleotídica	2ª Posición Nucleotídica			
	C	G	T	A
C	21,45%	0,25%	0,49%	0,37%
G	0,12%	19,11%	0,37%	0,49%
T	0,49%	0,37%	28,11%	0,25%
A	0,37%	0,62%	0,37%	26,77%

Tabla 11. Frecuencias di-nucleotídicas de las secuencias de BamHI-800 de *B. bufo*.

La composición nucleotídica es ligeramente rica en A-T (57,56%), con una alta frecuencia en di-nucleótidos del tipo AA, TT, CC y GG, algo bastante frecuente en familias de ADN repetido de

distintas especies (Amor *et al.* 2009), mientras que los menos representados son GC, CG y TA (Tabla 11).

La banda de 1.600 pb, supuestamente formada por dímeros, también fue aislada y clonada. De este modo se obtuvieron 12 clones, de los que 5 fueron secuenciados (Tabla 12). De éstos, solo se obtuvieron las secuencias completas de 3 al poder solapar las secuenciaciones a partir de cada uno de los extremos secuenciados. El alineamiento de estas secuencias muestra que en todos los casos se trata de dímeros de unidades monoméricas separadas por dianas para el enzima *Bam*HI (Figura 20).

NOMBRE	TAMAÑO
Bbu-BamHI-1600-PCR1.2-4 (INCOMPLETA)	1592 pb (no secuenciada completamente)
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-9 (INCOMPLETA)	1488 pb (no secuenciada completamente)
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-15	1625 pb
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-18	1604 pb (delección de 23 pb)
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-26	1627 pb

Tabla 12. Clones de dímeros BamHI-800 de *B. bufo* secuenciados. En cada caso se indica la longitud de la secuencia disponible y en qué casos se ha obtenido la secuencia completa.

Para comprobar si existen diferencias entre unidades monoméricas en función de su posición en el dímero, se alinearon todas las unidades monoméricas y se calculó la distancia entre éstas utilizando el programa MEGA, que permite determinar el modelo de sustituciones nucleotídicas que se ajusta mejor a los datos. Las distancias genéticas, calculadas mediante el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma, oscilan entre 0,03 y 0,09 (Tabla 13), independientemente de si se comparan unidades monoméricas de distintas posiciones (localizadas en 1ª y 2ª posición o viceversa), o unidades monoméricas localizadas en que el ADN repetitivo BamHI-800 muestra una organización sencilla, consistente en repeticiones

RESULTADOS Y DISCUSION

la misma posición (ambas localizadas en la 1ª o en la 2ª posición). Estos resultados confirman en tándem de unidades monoméricas.

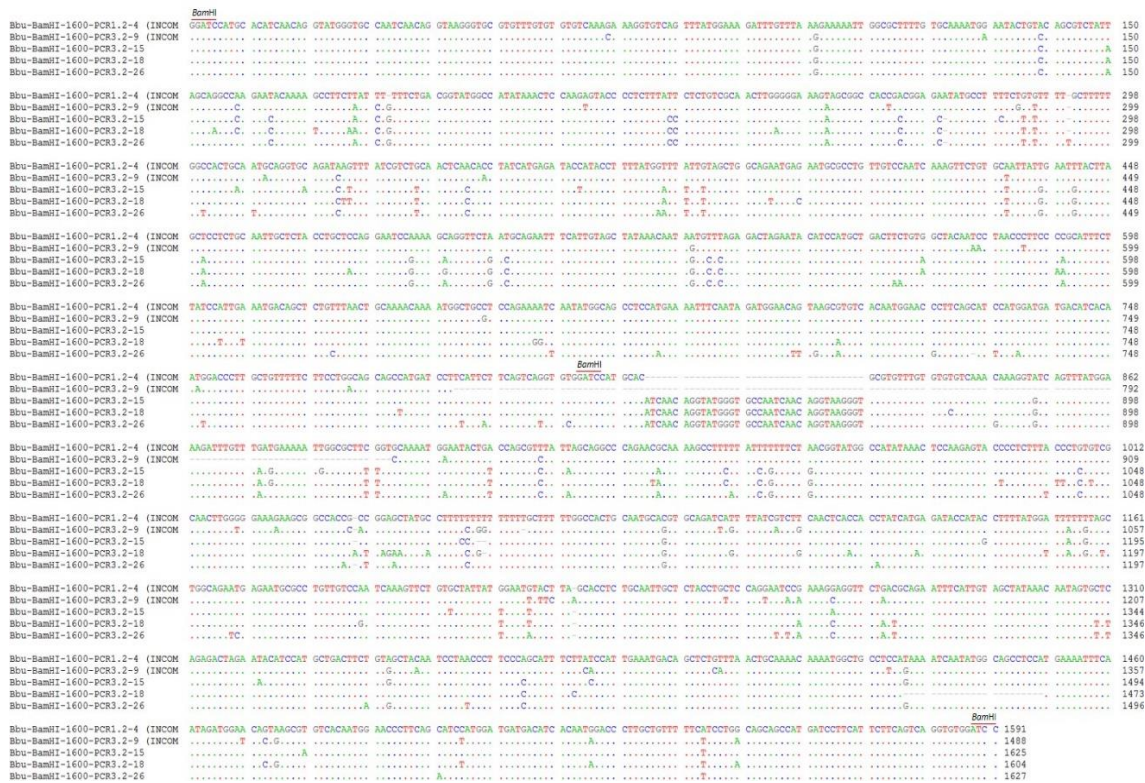


Figura 20. Alineamiento de las secuencias de dímeros BamHI-800 de *B. bufo*. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW y la edición se ha realizado con BioEdit.

	3.2-15a	3.2-18a	3.2-26a	1.2-4a	3.2-9a	3.2-18b	3.2-26b	3.2-9b	3.2-15b	1.2-4b
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-15a		0,006	0,008	0,010	0,010	0,010	0,009	0,010	0,006	0,006
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-18a	0,029		0,009	0,011	0,012	0,012	0,010	0,012	0,008	0,008
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-26a	0,038	0,052		0,011	0,011	0,012	0,010	0,012	0,009	0,009
Bbu-BamHI-1600-PCR1.2-4a	0,060	0,076	0,078		0,007	0,007	0,010	0,011	0,008	0,010
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-9a	0,064	0,079	0,085	0,032		0,007	0,010	0,011	0,009	0,011
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-18b	0,065	0,081	0,083	0,037	0,040		0,011	0,011	0,009	0,011
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-26b	0,050	0,062	0,067	0,064	0,065	0,072		0,012	0,009	0,009
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-9b	0,078	0,094	0,090	0,078	0,083	0,074	0,090		0,010	0,010
Bbu-BamHI-1600-PCR3.2-15b	0,027	0,043	0,050	0,052	0,057	0,060	0,050	0,074		0,008
Bbu-BamHI-1600-PCR1.2-4b	0,027	0,040	0,050	0,064	0,074	0,073	0,054	0,064	0,038	

Tabla 13. Distancias genéticas (esquina inferior izquierda) y error estándar (esquina superior derecha) entre unidades monoméricas localizadas en 1ª y/o 2ª posición (a y b respectivamente) de dímeros de ADN repetitivo BamHI-800 de *B. bufo*. Las distancias han sido calculadas con el programa MEGA, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma. La varianza se estimó por el método de "bootstrap" utilizando 1000 réplicas.

El empleo de productos de PCR en el análisis de esta familia de ADN repetido plantea la posibilidad de que se estén amplificando selectivamente monómeros específicos. Para

RESULTADOS Y DISCUSION

comprobar esta hipótesis se han comparado las secuencias obtenidas a partir de las digestiones de ADN con las secuencias de los productos de distintas PCRs (obtenidos con ambas parejas de cebadores y utilizando ADNs de individuos de distinta procedencia). Para ello, las secuencias se han dividido en grupos según su procedencia (digestión, PCR1 (pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F1/R1) o PCR2 (pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F2/R2)), y se han calculado varias distancias genéticas. En concreto, las distancias medias de cada grupo de secuencias, las distancias entre grupos y las distancias netas⁷³ entre grupos (Tabla 14).

Además, dado que los cebadores quedan incluidos en el producto final que posteriormente se clona y se secuencian, la parte de la secuencia que corresponde a los cebadores debe ser 100% homóloga en todas las secuencias obtenidas a partir de las mismas parejas de cebadores. Para comprobar si la presencia o ausencia de los cebadores en la secuencia final influye en la distancia entre las secuencias, se han realizado dos análisis de distancias en paralelo, utilizando las secuencias BamHI-800 con y sin cebadores.

Distancias genéticas medias en cada grupo							
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores	
Banda	0,059 ± 0,007	Banda	0,063 ± 0,008	Banda	0,060 ± 0,007	Banda	0,062 ± 0,008
PCR1	0,055 ± 0,006	PCR1	0,060 ± 0,007	PCR1	0,055 ± 0,006	PCR1	0,058 ± 0,007
PCR2	0,052 ± 0,005	PCR2	0,055 ± 0,006	PCR2	0,054 ± 0,006	PCR2	0,055 ± 0,006

Distancias genéticas entre grupos							
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores	
Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1
Banda		Banda		Banda		Banda	
PCR1	0,058± 0,006	PCR1	0,062± 0,007	PCR1	0,058± 0,006	PCR1	0,060± 0,006
PCR2	0,053± 0,005 0,055± 0,006	PCR2	0,057± 0,006 0,059± 0,006	PCR2	0,055± 0,005 0,056± 0,006	PCR2	0,056± 0,006 0,058± 0,006

Distancias genéticas netas entre grupos							
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores	
Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1
Banda		Banda		Banda		Banda	
PCR1	0,001± 0,001	PCR1	0,001± 0,001	PCR1	0,000± 0,001	PCR1	0,000± 0,001
PCR2	0,002± 0,001 0,002± 0,001	PCR2	0,002± 0,001 0,002± 0,001	PCR2	0,002± 0,001 0,001± 0,001	PCR2	0,002± 0,001 0,001± 0,001

Tabla 14. Distancias genéticas **medias** en cada grupo, **entre** grupos y **netas** entre grupos de secuencias de unidades monoméricas del ADN repetitivo BamHI-800 de *B. bufo* (± error estándar). Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma. La varianza se estimó por el método de “bootstrap” utilizando 1000 réplicas.

Las distancias genéticas muestran valores muy similares, independientemente de los grupos considerados o de si los cebadores se eliminan o no. De hecho, la distancia neta entre los grupos

⁷³ Distancia neta entre grupos los x e y (d_A): $d_A = d_{xy} - \frac{(d_x + d_y)}{2}$; donde d_{xy} es la distancia entre grupos x e y; d_x y d_y son las distancia media dentro de cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSION

es aproximadamente 0 en todos los casos. Estos resultados indican que las secuencias procedentes de PCRs con cebadores específicos no presentan menor distancia que las secuencias obtenidas tras digestión y clonación. Por lo que se puede concluir que las PCRs con cebadores específicos no seleccionan grupos concretos de secuencias monoméricas BamHI-800, sino que amplifican sus variantes monoméricas de forma no selectiva y equivalente a la digestión-clonación. Según esto, la PCR puede ser una herramienta útil para obtener secuencias de esta familia de ADN repetido.

El estudio de ADNs repetitivos mediante PCRs con cebadores específicos y posterior secuenciación del producto obtenido se ha utilizado con éxito en el satélite S1 de distintas especies del género *Rana* (Picariello *et al.* 2002; Feliciello *et al.* 2005, 2006; Picariello *et al.* 2016). En este caso, cuando se compara la variabilidad entre secuencias procedentes de bandas de digestiones y las procedentes de PCRs específicas, los resultados son similares a los observados por nosotros en el ADN repetitivo BamHI-800 de *B. bufo*: las secuencias obtenidas mediante el método tradicional de digestión-clonación forman parte de la variabilidad de secuencias obtenidas tras secuenciar productos de PCRs específicas del satélite S1. Por tanto, en este caso la PCR tampoco selecciona grupos de secuencias particulares, sino que amplifica un gran rango de variantes del ADN repetitivo S1.

3.3. Patrón de metilación del ADN satélite BamHI-800

Según algunos autores, anfibios y peces son los grupos de vertebrados que presentan mayor tasa de metilación en su ADN (Jabbari *et al.* 1997). Esta peculiaridad guarda estrecha relación con la cantidad de ADN repetitivo que presentan, ya que la metilación del ADN está implicada en la correcta formación, mantenimiento y regulación de la heterocromatina (Lippman *et al.* 2004; Feliciello *et al.* 2013), además de su implicación en la diferenciación celular (Reik *et al.* 2001; Shiura *et al.* 2014).

Para comprobar si el ADN repetido BamHI-800 está metilado, se han buscado dianas en su secuencia para parejas de isoesquizómeros que presenten distinta sensibilidad a la metilación del ADN. No se ha encontrado ninguna diana para parejas de isoesquizómeros que detecten diferencias en metilación en islas CpG, siendo *Mbol/Sau3A* la única pareja de isoesquizómeros que corta en BamHI-800.

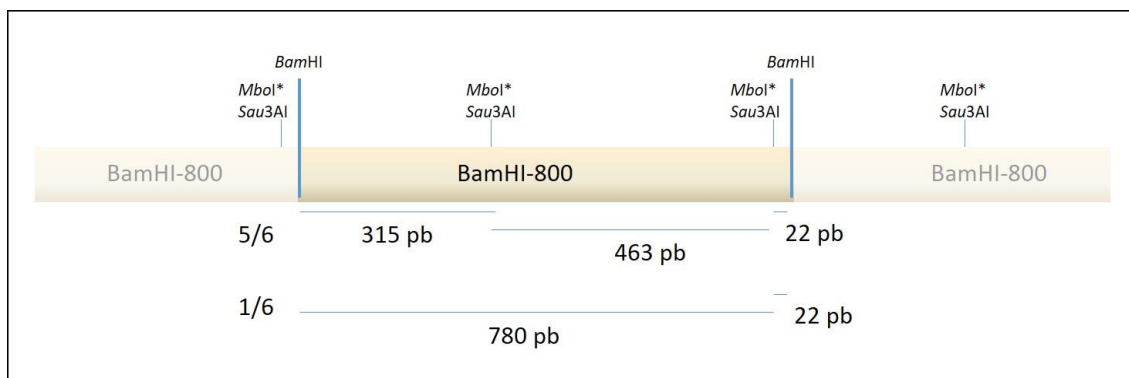


Figura 22. Mapa de restricción de una unidad monomérica del ADN repetitivo BamHI-800 para los enzimas *BamHI*, *Mbol* y *Sau3A*.

Los enzimas *Mbol* (sensible a la metilación) y *Sau3A* (insensible) reconocen la secuencia diana /GATC y cortan la unidad monomérica tres veces, dejando fragmentos de 315, 462 y 22 pb (Figura 22). En algunas secuencias la diana central puede estar mutada, dejando fragmentos de 780 y 22 pb.

Cuando se compara el patrón de bandas obtenido tras la digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *Mbol* y *Sau3A* no se aprecian diferencias en el tamaño de las bandas o en la intensidad de las mismas (Figura 21), por lo que puede concluirse que este ADN repetitivo no está metilado en la adenina de la secuencia GATC.

No es posible extraer más información sobre la metilación de este ADN repetitivo en pares CpG ya que no existen parejas de isoesquizómeros que corten las secuencias BamHI-800 y que además sean sensibles a la metilación en CpG.

3.4. Localización cromosómica de BamHI-800 en la especie *B. bufo*

La distribución cromosómica de esta familia de ADN repetitivo se ha establecido mediante experimentos de hibridación in situ fluorescente (FISH) utilizando la sonda Bbu.BamHI-800 sobre cromosomas metafásicos de la especie *B. bufo*.

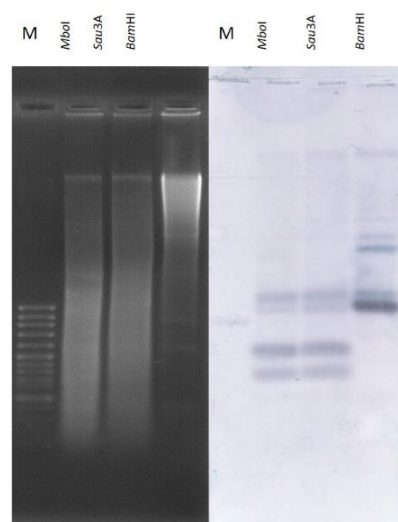


Figura 21. ADN genómico de *B. bufo* (BH2) digerido con los enzimas *Mbol* (sensible a metilación), *Sau3A* (insensible) y *BamHI*, junto al "Southern blot" de esta digestión hibridado con la sonda BamHI-800.

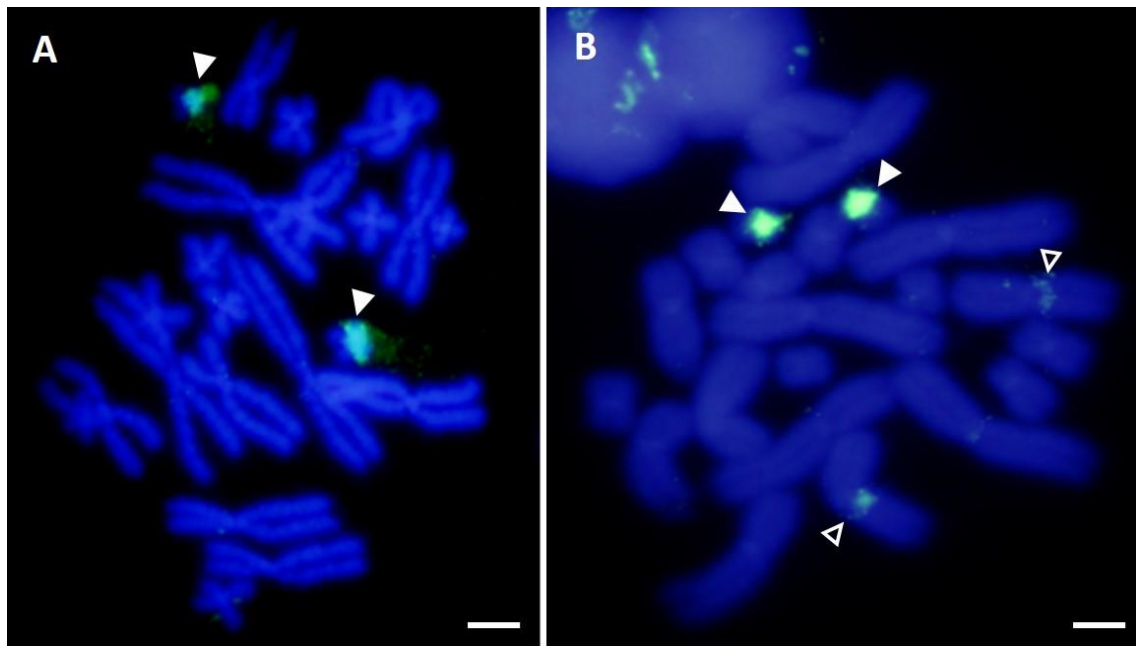


Figura 23. FISH sobre cromosomas metafásicos de individuos adultos de la especie *B. bufo*, utilizando como sonda la secuencia Bbu.BamHI-800. A: Hembra 3 (Jaén). B: Macho 2 (Jaén). Mediante puntas de flecha blancas se indican las parejas de menor tamaño con señal intensa tras la hibridación con Bbu.BamHI-800. Mediante puntas flechas huecas se indican las posiciones de señales de hibridación menos intensas observadas en algunas metafases. Escala: 2,5 μ m.

En cromosomas metafásicos procedentes de individuos adultos (Hembra 3 Jaén y Macho 2 Jaén) y tras una única ronda de amplificación, se observa una señal muy intensa en la pareja de cromosomas de menor tamaño (pareja 11) (Figura 23A). Además, en algunos casos es posible observar una señal menos intensa en el brazo corto de algunas parejas de cromosomas de mayor tamaño (Figura 23B).

Cuando la FISH se realiza sobre cromosomas procedentes de cultivos secundarios obtenidos a partir de larvas de *B. bufo*, y se hacen 3 rondas de amplificación en el revelado inmunológico, el patrón observado es ligeramente diferente. Además de las señales intensas de la pareja de cromosomas de menor tamaño, se observa una señal en el brazo corto de una de las parejas de cromosomas grandes, señales pericentroméricas en todos los cromosomas grandes, y una señal en el extremo del brazo largo de la pareja 6, próxima a la constricción secundaria en la que se localiza la NOR de esta especie (Figura 24). Dado que la NOR en *B. bufo* está delimitada a cada lado por heterocromatina constitutiva, es posible que la señal telomérica de la pareja 6

RESULTADOS Y DISCUSION

observada en la FISH con BamHI-800 se corresponda con una de las bandas C positivas que delimita la NOR.

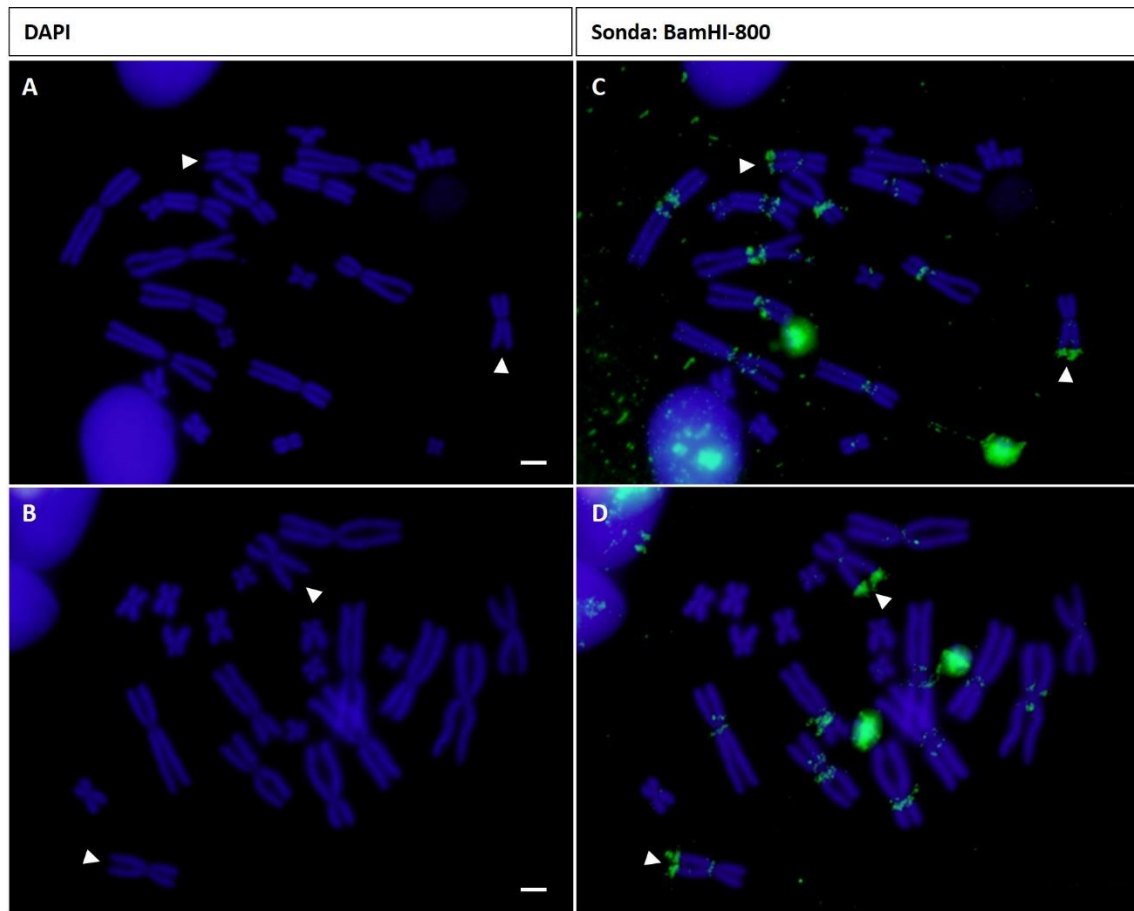


Figura 24. FISH sobre cromosomas obtenidos a partir de cultivos celulares de *B. bufo* (*B. bufo* 12 P6 (A y C) y *B. bufo* 12D P7 (B y D)), utilizando como sonda la secuencia Bbu.BamHI-800. A y B tinción con DAPI; C y D FISH con sonda Bbu.BamHI-800. Mediante flechas se indican las posiciones de las constricciones secundarias correspondientes a las NORs. Escala: 2,5 μ m.

4. Análisis de la familia de ADN repetido BamHI-800 en las especies

Epidalea calamita y *Bufotes viridis*

La presencia del ADN repetitivo BamHI-800 en la especie *B. bufo* plantea el interrogante de si esta familia de ADN repetitivo es específica de esta especie, si está presente en otras especies del género *Bufo*, o si se extiende a otros géneros de la familia *Bufo*nidae. Con este fin se han analizado las especies *E. calamita* y *B. viridis*, consideradas inicialmente dentro del género *Bufo*, aunque actualmente la primera se considera perteneciente al género *Epidalea* y la segunda al género *Bufotes*.

4.1. Patrones de hibridación

Cuando el ADN genómico de las especies *E. calamita* y *B. viridis* es digerido con *Bam*HI y separado según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, el patrón de bandas que se obtiene no es completamente idéntico al observado en *B. bufo*. En la especie *E. calamita* se aprecia con claridad una única banda de 800 pb (Figura 25A), mientras que en *B. viridis* no se distinguen bandas claramente (Figura 25B).

Tras transferir el ADN de los geles a una membrana de nailon e hibridar utilizando como sonda la secuencia *Bam*HI-800 de *B. bufo*, es

posible observar bandas positivas (Figura 25). El patrón de hibridación en ambas especies es similar al de *B. bufo*, con bandas que podrían indicar la existencia, en ambos casos, de unidades monoméricas, diméricas y triméricas del ADN repetitivo *Bam*HI-800.

4.2. Clonación y análisis de secuencias *Bam*HI-800 en *E. calamita* y *B. viridis*

La banda de 800 pb obtenida a partir de digestiones de ADN genómico con *Bam*HI solo pudo clonarse en la especie *E. calamita*, ya que en *B. viridis* no se observan bandas tras la digestión del ADN genómico con este enzima. Por otro lado, para observar la banda en *E. calamita* es necesario utilizar 20 µg de ADN genómico, el doble que el utilizado en la especie *B. bufo*, hecho que podría indicar que este ADN repetitivo está presente en menor cantidad en *E. calamita*.

Cuando la pareja de cebadores *Bbu*.*Bam*HI-800-F1/R1 se utiliza en reacciones de PCR con ADN genómico de estas especies, en ambos casos se obtienen amplicones de 800 y 1.600 pb (Figura

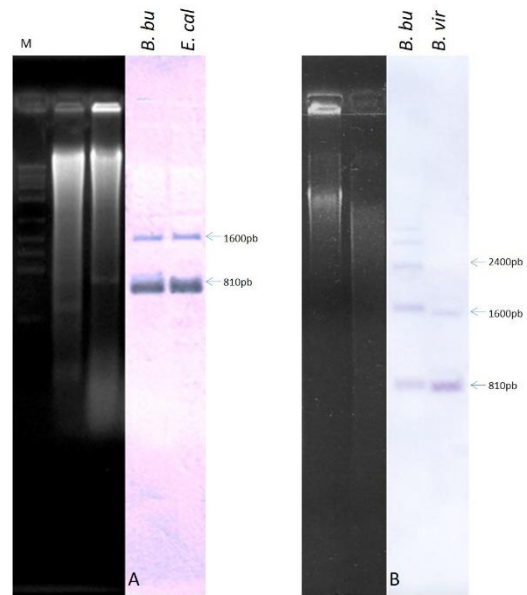


Figura 25. ADN genómico de *B. bufo* (*B.bu*), *E. calamita* (*E.cal*) y *B. viridis* (*B.vir*) (20 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con la sonda *Bam*HI-800 de *B. bufo*. A: *B. bufo* y *E. calamita*. B: *B. bufo* y *B. viridis*.

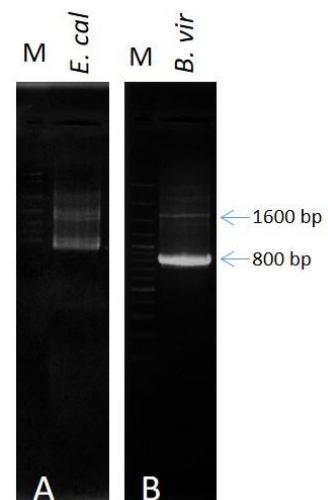


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores *Bbu*.*Bam*HI-800-F1/R1 en *E. calamita* (A) y *B. viridis* (B).

RESULTADOS Y DISCUSION

26). A partir de estos productos de PCR se han clonado las bandas de 800 y 1.600 pb de *E. calamita* y la banda de 800 pb de *B. viridis*.

Nombre	pb	Nombre	pb	Nombre	pb
Bca-BamHI-800-MJ4-1	818	Bca-BamHI-800-MJ4-35	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR7-24	817
Bca-BamHI-800-MJ4-4	818	Bca-BamHI-800-MJ4-36	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR7-41	818
Bca-BamHI-800-MJ4-5	817	Bca-BamHI-800-MAIc2-8	823	BcaA-BamHI-800-Ren4-PCR1-7	818
Bca-BamHI-800-MJ4-7	818	Bca-BamHI-800-MAIc2-37	809	BcaA-BamHI-800-Ren4-PCR1-8	818
Bca-BamHI-800-MJ4-10*	789	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-3	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-3	818
Bca-BamHI-800-MJ4-11	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-9	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-9	818
Bca-BamHI-800-MJ4-12	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-16	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR6-16	818
Bca-BamHI-800-MJ4-26*	771	Bca-BamHI-800-JM1-PCR7-1	818	Bca-BamHI-800-JM1-PCR7-1	818
Bca-BamHI-800-MJ4-31	818				

Tabla 15. Monómeros del ADN repetitivo BamHI-800 de *E. calamita* obtenidos en este trabajo. Para cada monómero se indica su nombre (con información sobre su origen: digestión o PCR), el nombre de la muestra de ADN y su tamaño (en pb). Con un * se han marcado las secuencias con deleciones en su extremo 3'.

De este modo, en *E. calamita* se han obtenido 13 secuencias procedentes de la banda de digestión y 12 secuencias procedentes de distintas PCRs en las que se utilizaron individuos de diferentes localizaciones (Tabla 15). Como puede observarse por su tamaño, dos de las secuencias obtenidas a partir de la banda de digestión presentan deleciones de 29 y 47 pb.

Estos monómeros muestran un tamaño medio de 818 pb y su composición nucleotídica es ligeramente rica en A-T (57,90%). El alineamiento de estas secuencias muestra 702 sitios conservados frente a 116 sitios variables, de los cuales 51 son informativos y 65 son SNPs.

Nombre	Tamaño (pb)
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-10	1.632
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-13	1.632
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-18	1.629
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-21	1.630
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-22	1.630
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-23	1.631
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-26	1.631
Bca-BamHI-1600-PCR4.3-33	1.631
Bca-BamHI-1600-PCR6.2-32	1.630

Tabla 16. Dímeros del ADN repetitivo BamHI-800 de *E. calamita* obtenidos a partir de productos de PCR. Para cada monómero se indica el nombre, la PCR que lo originó y su tamaño (en pb).

En *E. calamita* también se ha clonado la banda de 1.600 pb obtenida mediante PCR con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F1/R1. En este caso se ha logrado la secuencia de 9 clones correspondientes a dímeros de BamHI-800 (Tabla 16). Todos ellos alinean entre sí (Figura 27), y están formados por la repetición en tándem de dos unidades monoméricas separadas por dianas para *BamHI*.

RESULTADOS Y DISCUSION

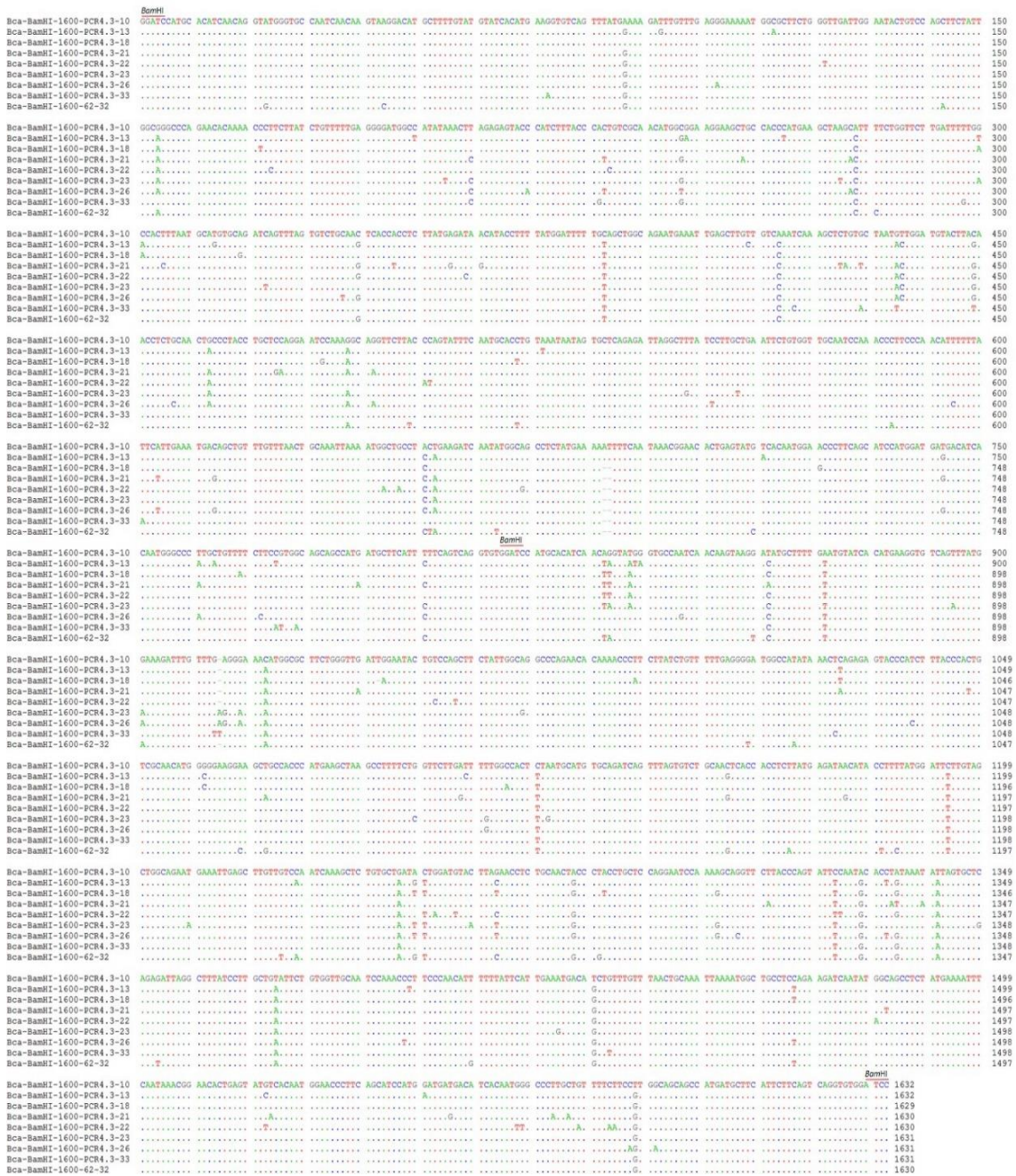


Figura 27. Alineamiento de los dímeros de BamHI-800 de *E. calamita* obtenidos mediante PCR. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW y la edición se ha realizado con BioEdit.

En esta especie, al igual que ocurría en *B. bufo*, no hay predisposición de determinadas secuencias BamHI-800 a estar en la 1ª o 2ª posición del dímero (resultados del análisis no mostrados). Por tanto, puede decirse que, tanto en *B. bufo* como en *E. calamita*, el ADN repetitivo BamHI-800 está organizado en forma de unidades monoméricas repetidas en tándem.

Para confirmar que la PCR específica de BamHI-800 no selecciona ningún subtipo de secuencias en *E. calamita*, se ha realizado un análisis comparativo de las secuencias procedentes de la banda de digestión y de las PCRs, eliminando las regiones correspondientes a los

RESULTADOS Y DISCUSION

oligonucleótidos. De este modo se han obtenido las distancias genéticas dentro de cada grupo considerado, las distancias entre distintos grupos y las distancias netas entre grupos (Tabla 17).

El análisis de las distancias confirma que la PCR con cebadores específicos no actúa amplificando unidades monoméricas de forma selectiva, ya que las distancias netas entre grupos se aproximan a cero. Estos resultados son similares a los obtenidos con las secuencias BamHI-800 de *B. bufo* y establecen que la PCR podría ser una herramienta útil para obtener secuencias de otras especies.

Distancias genéticas medias en cada grupo									
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores			
Banda	0,030 ± 0,004	Banda	0,031 ± 0,004	Banda	0,031 ± 0,004	Banda	0,031 ± 0,005		
PCR1	0,032 ± 0,005	PCR1	0,034 ± 0,005	PCR1	0,031 ± 0,005	PCR1	0,033 ± 0,006		
PCR2	0,026 ± 0,003	PCR2	0,024 ± 0,003	PCR2	0,027 ± 0,004	PCR2	0,025 ± 0,004		
Distancias genéticas entre grupos									
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores			
Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1		
Banda		Banda		Banda		Banda			
PCR1	0,030± 0,004	PCR1	0,032± 0,004	PCR1	0,031± 0,004	PCR1	0,032± 0,004		
PCR2	0,029± 0,004	PCR2	0,026± 0,003	PCR2	0,030± 0,004	PCR2	0,027± 0,004	PCR2	0,030± 0,004
Distancias genéticas netas entre grupos									
Con cebadores		Sin cebadores F1 R1		Sin cebadores F2 R2		Sin cebadores			
Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1	Banda	PCR1		
Banda		Banda		Banda		Banda			
PCR1	0,001± 0,001	PCR1	-0,001± 0,001	PCR1	0,000± 0,001	PCR1	0,000± 0,001		
PCR2	0,001± 0,001	PCR2	-0,001± 0,000	PCR2	0,001± 0,001	PCR2	-0,001± 0,000	PCR2	0,001± 0,001

Tabla 17. Distancias genéticas medias (\pm error estándar) en cada grupo, entre grupos y netas entre grupos, de secuencias de unidades monoméricas del ADN repetitivo BamHI-800 de *E. calamita*. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma. La varianza se estimó por el método de "bootstrap" utilizando 1000 réplicas.

En la especie *B. viridis* los monómeros del ADN repetitivo BamHI-800 se han obtenido a partir de PCRs específicas, debido a la ausencia de bandas visibles al digerir ADN genómico con *Bam*HI. Tras la clonación de los productos de PCR se ha obtenido la secuencia de 10 clones positivos correspondientes a monómeros BamHI-800 de esta especie (Tabla 18).

Todas las secuencias alinean entre sí, presentan un tamaño medio de 817 pb y un contenido en A-T del 56,8%. El alineamiento

Nombre	Tamaño pb
Bvir-BamHI-800-PCR1F1R1-2	817
Bvir-BamHI-800-PCR1F1R1-22	818
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-2	810
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-3	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-5	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-24	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-26	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-27	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-37	817
Bvir-BamHI-800-PCR2F1R1-38	817

Tabla 18. Monómeros del ADN repetitivo BamHI-800 de *B. viridis* obtenidos mediante PCR. Para cada monómero se indica su nombre, la PCR de procedencia y su tamaño.

RESULTADOS Y DISCUSION

revela la existencia de 684 posiciones conservadas y 134 variables, de las cuales 95 son SNPs.

A partir de las secuencias del ADN repetitivo BamHI-800 de las tres especies estudiadas (*B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*), se han calculado las distancias genéticas intra- e interespecíficas (Tabla 19).

Los resultados muestran que las distancias genéticas intraespecíficas (0,03-0,05) son menores que las distancias interespecíficas (0,18-0,2). Esto indica que las secuencias de ADN repetitivo BamHI-800 presentan alta homogeneidad dentro de cada especie, pero son más divergentes cuando se comparan secuencias de distintas especies.

Distancias intraespecíficas		Distancias interespecíficas			
			<i>B. bufo</i>	<i>E. calamita</i>	<i>B. viridis</i>
<i>B. bufo</i>	0,051± 0,004	<i>B. bufo</i>			
<i>E. calamita</i>	0,030± 0,003	<i>E. calamita</i>	0,181± 0,014		
<i>B. viridis</i>	0,047± 0,004	<i>B. viridis</i>	0,192± 0,015	0,203± 0,016	

Tabla 19. Distancias genéticas intraespecíficas (izquierda) e interespecíficas (derecha) ± error estándar entre las secuencias de ADN repetitivo BamHI-800 obtenidas en las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con una distribución gamma. La varianza se estimó por el método de “bootstrap” utilizando 1.000 réplicas.

4.3. Localización cromosómica de BamHI-800 en las especies *E. calamita* y *B. viridis*

La localización cromosómica del ADN repetitivo BamHI-800 en las especies *E. calamita* y *B. viridis* se analizó mediante FISH utilizando como sondas secuencias BamHI-800 de *E. calamita* y *B. viridis* respectivamente.

En *E. calamita* el ADN repetitivo BamHI-800 se localiza en el brazo corto de dos de las parejas de cromosomas grandes (parejas 1 y 3). En ambas parejas la señal se observa en posición próxima al centrómero, siendo la señal de la pareja 1 más intensa que la de la pareja 3 (Figura 28A).

En la especie *B. viridis* este ADN repetitivo se localiza en una de las parejas de cromosomas grandes, en posición pericentromérica a ambos lados del centrómero, siendo la señal más intensa en los brazos cortos y la de menor intensidad en los brazos largos (Figura 28B). Además, existe señal positiva en la pareja de cromosomas portadores de la NOR (pareja 6), localizada en este caso en el brazo largo y próxima al centrómero.

Cuando se compara la localización del ADN repetido BamHI-800 en las tres especies analizadas (*B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*) se observa que su posición no está conservada, siendo distinta en cada una de estas especies (Figura 29). En relación con este punto, es de destacar la

RESULTADOS Y DISCUSION

asociación entre la NOR y acumulaciones de BamHI-800 en *B. bufo*, asociación que no se observa en las otras dos especies, a pesar de que en una de ellas (*B. viridis*) existen acumulaciones de este ADN repetitivo en los cromosomas portadores de la NOR.

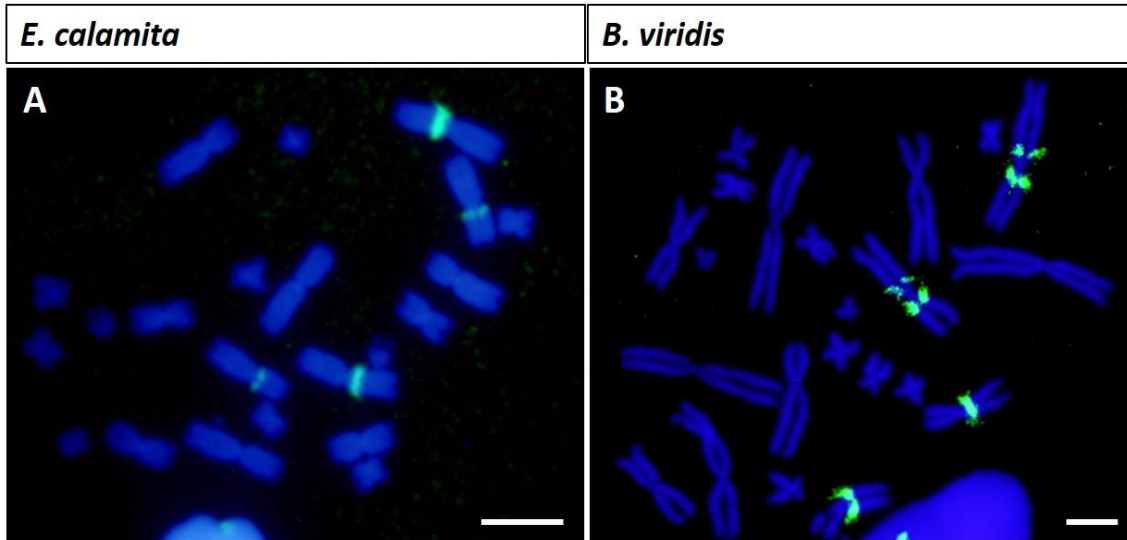


Figura 28. FISH sobre cromosomas metafásicos de *E. calamita* y *B. viridis*, utilizando como sonda la secuencia BamHI-800 de la propia especie. Escala: 5 μ m.

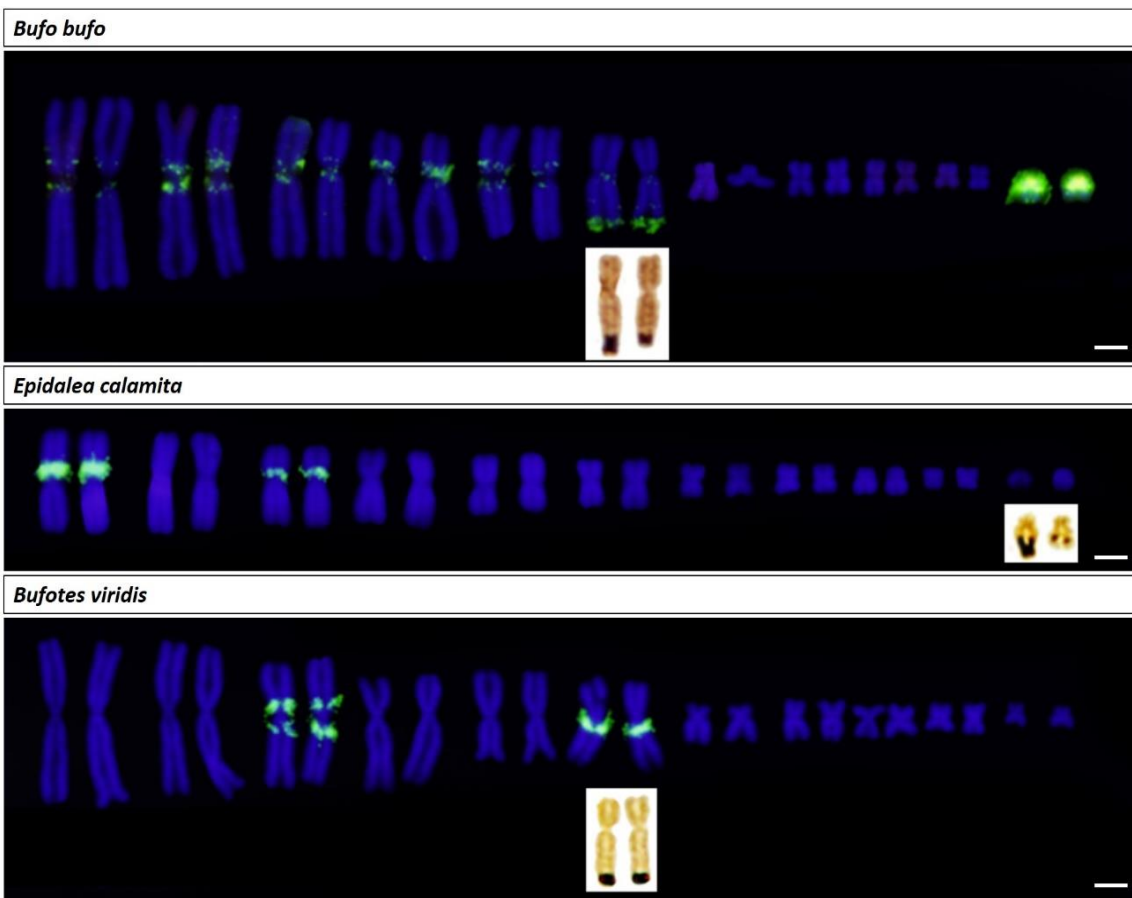


Figura 29. Cariotipos de las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis* realizados con cromosomas hibridados mediante FISH utilizando como sondas secuencias BamHI-800 de la propia especie. En cada cariotipo, bajo la pareja portadora de la NOR, se ha añadido la imagen de la tinción con plata de dicha pareja de cromosomas. Escala: 2,5 μ m.

Por otro lado, resulta de interés la asociación de este ADN repetido con regiones centroméricas/pericentroméricas de cromosomas grandes de la especie *B. bufo* y, en menor medida en *B. viridis*. El patrón de señales observado en experimentos de GISH en estas especies mostraba fuertes señales centroméricas en todos los cromosomas, por lo que puede concluirse que las secuencias BamHI-800 en estas especies no son un componente mayoritario de las secuencias de ADN repetido localizadas en los centrómeros de todos los cromosomas.

5. Secuencias BamHI-800 en otras especies de la familia Bufonidae

5.1. Patrones de hibridación y amplificación por PCR

El ADN repetitivo BamHI-800 está presente en las tres especies de la familia *Bufonidae* analizadas (*B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*). En principio, y teniendo en cuenta que estas especies pertenecen a géneros distintos, podría considerarse que este ADN repetido no es específico de género. Sin embargo, debido a la controversia sobre la taxonomía de las especies de esta familia, y teniendo en cuenta que las tres especies analizadas estuvieron incluidas en el género *Bufo*, resulta de interés comprobar si este ADN repetido está presente en otras especies de la familia.

Nombre de la especie	Origen geográfico	Tipo de secuencias	Nº de clones
<i>Bufo bufo</i>	(Bolonía) Italia	Banda	6 + 2 inc.
		PCR F2/R2	25
	(Jaén) España	PCR F1/R1	6
<i>Epidalea calamita</i>	Marruecos	PCR F1/R1	5
	(Jaén) España	Banda	13
		PCR F1/R1	6 +2 del.
<i>Bufo viridis</i>	(Ardales) España	PCR F1/R1	2
<i>Bufo boulengeri</i>	Grecia	PCR F1/R1	10
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	Marruecos	PCR F1/R1	13
<i>Bufo latastii</i>	Marruecos	PCR F1/R1	14
<i>Bufo luristanicus</i>	Pakistán	PCR F1/R1	7+1 del.
<i>Bufo surdus</i>	Irán	PCR F1/R1	14+1 inc.
<i>Bufo siculus</i>	Irán	PCR F1/R1	13
<i>Bufo balearicus</i>	(Sicilia) Italia	PCR F1/R1	4
<i>Amietophrynus arabicus</i> (*)	(Sicilia) Italia	PCR F1/R1	4
<i>Rhinella marina</i>	Yemen	PCR F1/R1	13 + 2 del.
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Australia (**)	PCR F1/R1	7+1 del.
	Nepal	PCR F1/R1	20+1 del.

Tabla 20. Especies de la familia Bufonidae analizadas. En la tabla se indica, junto al nombre de la especie, el origen geográfico de las muestras analizadas, la forma en la que se obtuvieron las regiones clonadas (banda de digestión o PCR) y número de clones obtenidos. (del.) Secuencias con delección. (inc.) Secuencias incompletas. (*) Especie anteriormente clasificada como *Bufo arabicus* o *Duttaphrynus arabicus*. (**) Introducidos desde Hawái en 1935.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para llevar a cabo este análisis se han considerado especies pertenecientes a distintos géneros de la familia Bufonidae que habitan varias regiones geográficas (Tabla 20).

La disponibilidad de suficiente ADN genómico de *Bufotes boulengeri*, *Bufotes luristanicus*, *Bufotes surdus*, *Barbarophryne brongersmai* y *Rhinella marina* permitió analizar la presencia del ADN repetitivo BamHI-800 en estas especies mediante digestión con *Bam*HI, “Southern-blot” e hibridación con la sonda BamHI-800.

El resultado obtenido muestra que todas estas especies (*B. boulengeri*, *B. brongersmai*, *B. luristanicus*, *B. surdus* y *R. marina*) presentan un patrón de bandas similar al de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*, con bandas de unos 800, 1.600 y 2.400 pb (Figura 30).

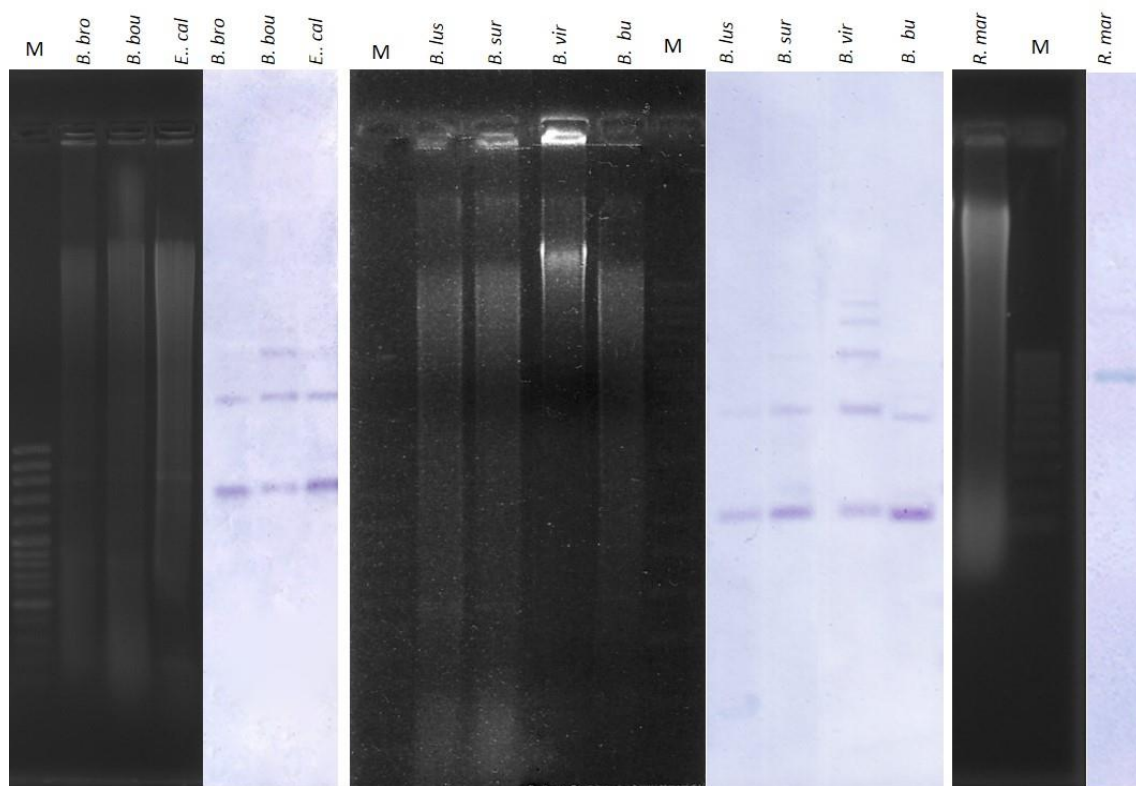


Figura 30. ADNs genómicos de distintas especies de la familia Bufonidae (*B. brongersmai*, *B. boulengeri*, *B. luristanicus*, *B. surdus* y *R. marina*) digeridos con *Bam*HI y separados mediante electroforesis en geles de agarosa. El ADN de los geles fue transferido a una membrana mediante “Southern-Blot” y posteriormente hibridado utilizando como sonda la secuencia BamHI-800 de *B. bufo*. Como controles se han utilizado muestras de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*.

Además del análisis anterior, en todas las especies se han realizado PCRs utilizando los cebadores específicos Bbu.BamHI-800-F1/R1. En todos los casos la PCR produce una banda de 800 pb y, en algunos casos, también la banda de 1.600 pb (Figura 31). Cuando estos amplicones se transfieren a una membrana y se hibridan con la sonda BamHI-800 de *B. bufo*, las bandas de PCR dan señal positiva, confirmando que se trata de secuencias de la familia de ADN repetido BamHI-800 (datos no mostrados).

5.2. Clonación y análisis de las secuencias BamHI-800 en otras especies de la familia Bufonidae

A partir de los productos de PCR se han clonado las bandas de 800 pb en las 10 especies restantes de familia Bufonidae que fueron analizadas (*B. boulengeri*, *B. brongersmai*, *B. latastii*, *B. luristanicus*, *B. surdus*, *B. siculus*, *B. balearicus*, *A. arabicus*, *R. marina* y *D. melanostictus*). El número de clones positivos obtenidos en cada caso se indica en la Tabla 20, siendo excluidos del análisis los clones con deleciones superiores a 100 pb (5 clones en total de especies diferentes).

El alineamiento de todas las secuencias BamHI-800 agrupa a las secuencias en función de su similitud ([Material suplementario S2](#)). En algunos casos este agrupamiento coincide con la especie de la que proceden, aunque en otros casos los agrupamientos incluyen secuencias de varias especies (variantes). Por otro lado, en las secuencias de *A. arabicus* y *D. melanostictus* se observa que las distancias genéticas abarcan rangos mayores que en las otras especies (0,000-0,354 y 0,000-0,406 respectivamente).

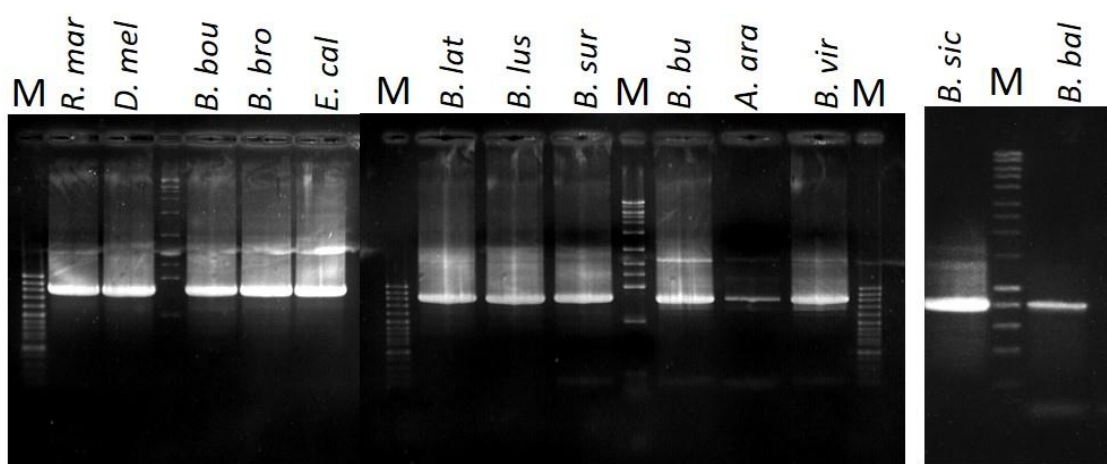


Figura 31. Electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X de los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-800-F1/R1 en distintas especies de la familia Bufonidae: *R. marina*, *D. melanostictus*, *B. boulengeri*, *B. brongersmai*, *E. calamita*, *B. latastii*, *B. luristanicus*, *B. surdus*, *B. bufo*, *A. arabicus*, *B. viridis*, *B. siculus* y *B. balearicus*.

El análisis de las distancias genéticas⁷⁴ entre todas las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus* revela que hay un subgrupo de 5 secuencias (Gr_2 de *A. arabicus*) que presenta distancias mayores que el resto de secuencias (Gr_1 de *A. arabicus*) (Tabla 21).

⁷⁴ Calculadas según el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura, con distribución gamma.

RESULTADOS Y DISCUSION

Si estas secuencias se analizan como dos variantes independientes, las distancias entre las secuencias de cada variante y el error estándar correspondiente se reducen notablemente, aunque la distancia genética neta entre estas dos variantes sigue siendo elevada (Tabla 22).

	4-1	4-3	4-4	4-7	3-2	3-1	3-3	3-5	3-7	3-8	2-8	3-6	3-9	3-15	3-20
Aara-BamHI-800-PCR4-1		0,018	0,018	0,017	0,016	0,011	0,017	0,018	0,002	0,016	0,022	0,021	0,023	0,021	0,021
Aara-BamHI-800-PCR4-3	0,200		0,002	0,019	0,017	0,017	0,018	0,002	0,018	0,017	0,023	0,023	0,026	0,023	0,023
Aara-BamHI-800-PCR4-4	0,201	0,004		0,020	0,017	0,017	0,018	0,001	0,018	0,017	0,023	0,023	0,026	0,023	0,023
Aara-BamHI-800-PCR4-7	0,175	0,219	0,217		0,012	0,017	0,015	0,019	0,017	0,012	0,024	0,021	0,024	0,021	0,021
Aara-BamHI-800-PCR2.3-2	0,159	0,174	0,173	0,098		0,016	0,015	0,017	0,016	0,004	0,022	0,021	0,023	0,021	0,021
Aara-BamHI-800-PCR3-1	0,092	0,178	0,177	0,172	0,150		0,016	0,017	0,011	0,015	0,021	0,021	0,023	0,021	0,021
Aara-BamHI-800-PCR3-3	0,176	0,190	0,188	0,157	0,138	0,165		0,018	0,017	0,015	0,022	0,022	0,023	0,022	0,022
Aara-BamHI-800-PCR3-5	0,199	0,003	0,001	0,215	0,171	0,175	0,186		0,018	0,017	0,023	0,023	0,026	0,023	0,023
Aara-BamHI-800-PCR3-7	0,003	0,200	0,198	0,172	0,156	0,089	0,172	0,196		0,015	0,022	0,020	0,023	0,020	0,020
Aara-BamHI-800-PCR3-8	0,156	0,174	0,173	0,098	0,009	0,147	0,138	0,171	0,152		0,022	0,021	0,023	0,021	0,021
Aara-BamHI-800-PCR2-8	0,275	0,293	0,291	0,282	0,263	0,260	0,251	0,289	0,271	0,259		0,018	0,020	0,018	0,018
Aara-BamHI-800-PCR3-6	0,251	0,297	0,295	0,262	0,250	0,256	0,261	0,293	0,247	0,245	0,175		0,012	0,001	0,000
Aara-BamHI-800-PCR3-9	0,286	0,344	0,341	0,310	0,295	0,299	0,287	0,339	0,281	0,295	0,211	0,095		0,012	0,012
Aara-BamHI-800-PCR3-15	0,253	0,300	0,298	0,264	0,252	0,258	0,263	0,295	0,249	0,248	0,176	0,001	0,097		0,001
Aara-BamHI-800-PCR3-20	0,251	0,297	0,295	0,262	0,250	0,256	0,261	0,293	0,247	0,245	0,175	0,000	0,095	0,001	

Tabla 21. Distancias genéticas entre las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus* (diagonal inferior) y error estándar correspondiente (diagonal superior). Para el cálculo de las distancias se utilizó el programa MEGA utilizando el modelo de sustitución de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma. La estima de la varianza se realizó mediante “Bootstrap” con 1000 réplicas. En la tabla se muestran los dos grupos de secuencias de *A. arabicus* en dos colores: verde (Gr_1) y naranja (Gr_2).

Estas diferencias numéricas pueden apreciarse visualmente en el árbol filogenético de las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus*. Utilizando un total de 15 secuencias con 685 posiciones informativas⁷⁵, se realizó una filogenia mediante el método de máxima verosimilitud⁷⁶, estimando la varianza mediante “bootstrap” con 1000 réplicas (Figura 32). La topología obtenida separa claramente las secuencias de las dos variantes (grupos 1 y 2) con una probabilidad del 100% para esta agrupación.

Variantes <i>A. arabicus</i>	Distancia en cada variante	Distancia entre variantes	Distancia neta entre variantes
<i>A. arabicus</i> Gr_1	0,151 ± 0,009	Gr_1	Gr_1
<i>A. arabicus</i> Gr_2	0,103 ± 0,008	Gr_2	0,276 ± 0,016 Gr_2

Tabla 22. Distancias genéticas entre las dos variantes para las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus*: distancias entre secuencias de una dentro de cada grupo; distancia entre los dos grupos y distancia neta entre éstos.

⁷⁵ Eliminando los “gaps”.

⁷⁶ Modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma.

RESULTADOS Y DISCUSION

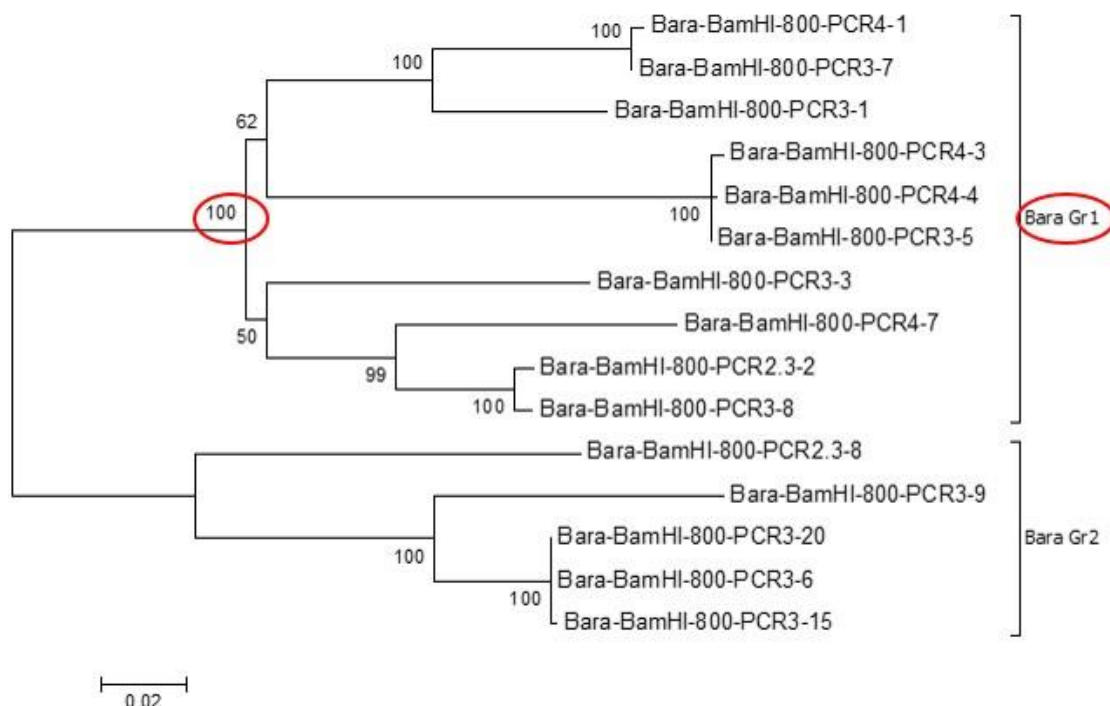


Figura 32. La filogenia de las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus* divide a éstas en dos grupos que coinciden con los grupos observados en función de las diferencias en las distancias genéticas que presentan.

En la especie de *D. melanostictus* se realizó un análisis similar con las secuencias BamHI-800, observándose, también en este caso, la existencia de dos grupos de secuencias en función de las distancias genéticas entre ellas (Tabla 24). Si estas secuencias se analizan como dos variantes independientes (Tabla 23), las distancias dentro de cada variante y la estima del error estándar se reducen notablemente.

Variantes <i>D. melanostictus</i>	Distancia en cada variante	Distancia entre variantes		Distancia neta entre variantes	
<i>D. melanostictus</i> Gr_1	0,131 ± 0,010		Gr_1		Gr_1
<i>D. melanostictus</i> Gr_2	0,048 ± 0,004	Gr_2	0,381 ± 0,027	Gr_2	0,291 ± 0,025

Tabla 23. Distancias genéticas entre las dos variantes para las secuencias BamHI-800 de *D. melanostictus*: distancias dentro de cada variante; distancia entre las dos variantes y distancia neta entre éstas.

Utilizando 21 secuencias, con 739 posiciones informativas⁷⁷, se calculó el árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud⁷⁸, estimándose la varianza mediante “Bootstrap” con 1000 réplicas. La topología obtenida para estas secuencias separa claramente

⁷⁷ Eliminando “gaps”.

⁷⁸ Distancias calculadas según el modelo de 3 parámetros de Tamura con 5 categorías de distribución gamma.

RESULTADOS Y DISCUSION

las dos variantes de *D. melanostictus* (Gr1 y Gr2) con una probabilidad del 100% (Figura 33). La rama del grupo 1 a su vez se divide en otras dos subramas. Éstas podrían ser consideradas, a su vez, como dos variantes, pero debido al bajo número de secuencias de una de ellas (4 secuencias) se han considerado una única variante para el análisis posterior.

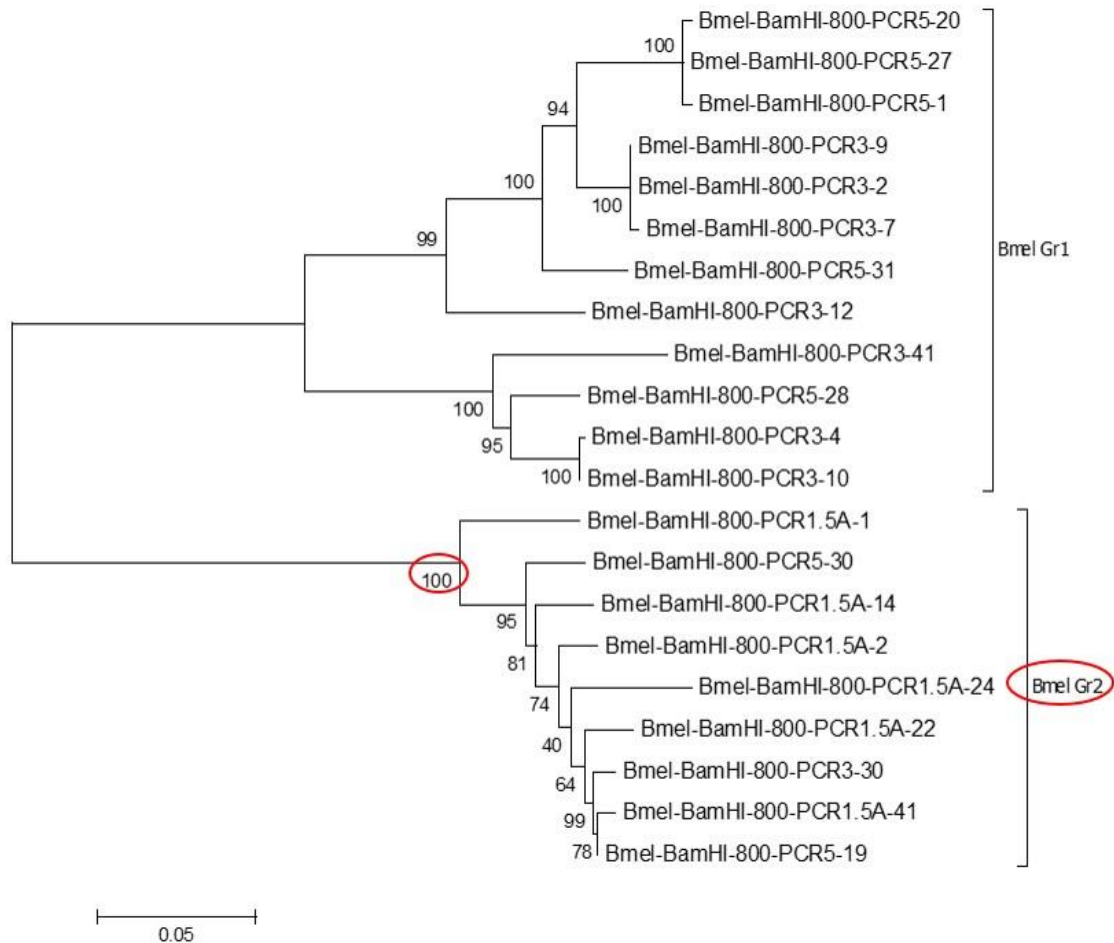


Figura 33. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para las secuencias BamHI-800 de *D. melanostictus*, que diferencia dos variantes en función de sus distancias genéticas.

El análisis del conjunto de secuencias BamHI-800 se realizó teniendo en cuenta las dos variantes de las secuencias BamHI-800 de *A. arabicus* y *D. melanostictus*. Para determinar el modelo de sustitución nucleotídica más apropiado se utilizaron dos criterios: BIC (“Bayesian Information Criterion”) y AICc (“Akaike Information Criterion corrected”). Ambos son medidas de calidad relativa de un modelo estadístico mediando entre la bondad de ajuste del modelo y su complejidad. Así, valores menores de BIC o AICc implican un menor número de variables explicativas, un mejor ajuste, o ambos. Si tenemos en cuenta estos dos parámetros, los modelos de sustitución nucleotídica propuestos por MEGA para las secuencias BamHI-800 son el Modelo

RESULTADOS Y DISCUSION

de 3 parámetros de Tamura con corrección para la distribución gamma (T92+G) y el modelo “General Time Reverse” con corrección para la distribución gamma (GTR+G) (Tabla 25).

Modelo	Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R
T92+G	322	27965,86867	24928,11676	-12140,93684	n/a	3,4791	0,888
GTR+G	328	27992,95613	24898,64274	-12120,15763	n/a	3,2754	0,879

Tabla 25. Modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a las secuencias BamHI-800. Criterios para cálculo de modelo: **Param**: número de parámetros utilizados; **BIC**: “Bayesian Information Criterion”; **AICc**: “Akaike Information Criterion corrected”; **lnL**: logaritmo de la verosimilitud; **Invariant**: fracción de posiciones evolutivamente invariables; **Gamma**: distribución gamma discreta; **R**: tasa de transiciones/transversiones.

Cuando se comparan ambos modelos no se observan grandes diferencias en las distancias entre las secuencias, ni en la organización de éstas en árboles filogenéticos en los que el único parámetro que cambia es el modelo de sustitución nucleotídica. Los únicos cambios observados afectan a posiciones puntuales de secuencias dentro de su propio grupo o subgrupo, pero no muestran variaciones en las ramas principales del árbol (datos no mostrados). Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizó el modelo T92+G por ser el que presenta menor número de parámetros.

Considerando los clones de cada especie como grupos independientes, se han analizado los siguientes parámetros: tamaño medio, posiciones conservadas/variables y contenido en A-T. Además, utilizando el modelo T92+G, se ha calculado la tasa de transiciones/transversiones (R) y el rango de similitud entre las secuencias basado en las distancias genéticas calculadas con el modelo de sustitución propuesto (Tabla 26).

De este análisis se deduce que todas las secuencias tienen un tamaño medio similar (816-818 pb), exceptuando algunas inserciones y deleciones de pocos pares de bases ([Material suplementario S3](#)). Todos los grupos de secuencias considerados tienen un contenido en A-T que oscila entre 56,2% y 58,4%. Estos valores confirman que las secuencias BamHI-800 tienen una composición ligeramente rica en A–T en todas las especies. En relación al número de posiciones conservadas y variables, también es similar en todos los grupos, exceptuando *B. siculus* y *B. balearicus*, probablemente porque el número de secuencias analizadas es menor en estas especies.

La tasa de transiciones/transversiones oscila entre 0,42 y 1,46. Esto es, hay especies (o variantes) en las que el número de transiciones es el doble que el de transversiones (*D. melanostictus* Gr_2)

RESULTADOS Y DISCUSION

y especies en las que ocurre todo lo contrario, el número de transiciones es la mitad que el de transversiones (*Bufo siculus*).

Nombre	N	T	NC	NV		% A-T	R	% similitud
				I	SNP			
<i>Bufo bufo</i>	17	818 pb	643	56	119	57,1%	0,98	98,1-91,8%
<i>Epidalea calamita</i>	21	818 pb	702	51	65	58,0%	0,83	100,0-94,4%
<i>Bufo viridis</i>	10	817 pb	684	38	95	56,8%	0,63	98,9-91,9%
<i>Bufo boulengeri</i>	13	818 pb	655	59	104	56,6%	0,67	98,5-90,8%
<i>Barbarophryne bronguersami</i>	14	818 pb	627	52	139	56,6%	0,64	97,8-90,0%
<i>Bufo latastii</i>	7	818 pb	652	69	97	56,7%	1,00	96,6-89,2%
<i>Bufo luristanicus</i>	14	818 pb	646	71	101	56,2%	0,76	100,0-88,9%
<i>Bufo surdus</i>	13	818 pb	644	66	121	56,5%	1,11	99,9-89,7%
<i>Bufo siculus</i>	4	817 pb	789	10	18	56,9%	0,42	99,9-97,4%
<i>Bufo balearicus</i>	4	817 pb	747	9	61	57,1%	0,90	96,9-94,9%
<i>Rhinella marina</i>	8	817 pb	705	29	83	57,4%	1,01	100,0-93,2%
<i>Amietophrynus arabicus Gr_1</i> ¹	10	818 pb	554	173	104	57,1%	1,10	99,9-80,0%
<i>Amietophrynus arabicus Gr_2</i> ¹	5	818 pb	702	51	65	58%	1,13	100,0-80,0%
<i>Duttaphrynus melanostictus Gr_1</i>	12	816 pb	582	150	87	56,6%	1,08	100,0-77,5%
<i>Duttaphrynus melanostictus Gr_2</i>	9	817 pb	688	29	100	60,6%	1,46	98,5-90,8%

Tabla 26. Análisis de secuencias BamHI-800 en distintas especies de la familia *Bufo*. **N**: número de secuencias analizadas en cada especie. **T**: tamaño medio de las secuencias. **NC**: Número de posiciones conservadas. **NV**: número de posiciones variables: (**I**) Informativas, (**SNP**) Polimorfismo de un solo nucleótido. (1) Anteriormente considerada como *Bufo arabicus* o *Duttaphrynus arabicus*.

Si las mutaciones ocurriesen de forma aleatoria, esperaríamos que la tasa de transiciones sea la mitad que la de transversiones. Sin embargo, prácticamente todas las secuencias de ADN de cualquier genoma examinado, presentan frecuencias más altas de transiciones que transversiones (Brown *et al.* 1982; Gojobori *et al.* 1982; Curtis *et al.* 1984; Wakeley 1994, 1996). Esta desviación es diferente cuando se comparan regiones codificantes ($R=1,9$) y no-codificantes ($R=1,5$) (Zurawski *et al.* 1984), algo que puede ser explicado, en parte, por restricciones selectivas asociadas con las funciones de estas regiones no codificantes. Sin embargo, debido a la escasez de datos sobre las funciones de los ADNs repetidos, aún no han sido analizadas tasas de transiciones/transversiones en este tipo de secuencias.

Las distancias genéticas obtenidas permiten calcular el porcentaje de similitud de estas secuencias dentro de cada grupo, con valores que oscilan entre 100% y 90%, salvo algunas excepciones.

Si con estos parámetros calculamos las distancias genéticas intraespecíficas (o intraespecíficas por variantes en el caso de *B. arabicus* y *B. melanostictus*), observamos que todos los grupos presentan una distancia media muy pequeña, que no supera 0,1 (Tabla 27). La única excepción

RESULTADOS Y DISCUSION

Nombre	Distancia
<i>Bufo bufo</i>	0,057±0.005
<i>Epidalea calamita</i>	0,027±0.004
<i>Bufo viridis</i>	0,049±0.005
<i>Bufo boulengeri</i>	0,057±0.005
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	0,055±0.005
<i>Bufo latastii</i>	0,090±0.008
<i>Bufo luristanicus</i>	0,060±0.006
<i>Bufo surdus</i>	0,050±0.004
<i>Bufo siculus</i>	0,019±0.004
<i>Bufo balearicus</i>	0,044±0.006
<i>Rhinella marina</i>	0,052±0.006
<i>Amietophrynus arabicus</i> grupo 1	0,155±0.011
<i>Amietophrynus arabicus</i> grupo 2	0,108±0.010
<i>Duttaphrynus melanostictus</i> grupo 1	0,137±0.011
<i>Duttaphrynus melanostictus</i> grupo 2	0,045±0.005

Tabla 27. Distancia genética **intraespecífica** del BamHI-800 dentro de cada especie o subgrupo.

la constituyen las dos variantes de *A. arabicus*, con distancias de 0,155 y 0,108 respectivamente, y una de las variantes de *D. melanostictus* (grupo 1), con una distancia de 0,137. Las distancias interespecíficas son lo suficientemente pequeñas como para afirmar que se trata de secuencias muy similares entre sí en cada uno de los grupos. Se trata, por tanto, de secuencias que comparten numerosas características, y que posiblemente tengan origen en un ancestro común.

Si analizamos las distancias interespecíficas (entre diferentes especies y variantes) (Tabla 28), se aprecia que algunos grupos (como *B. bufo*, *E. calamita*, *R. marina*), presentan una distancia genética con otras especies de 0,2, pudiendo llegar a 0,3 y 0,4 en *A. arabicus* Gr_1 y *D. melanostictus* Gr_2 respectivamente. Esto ocurre tanto con la distancia interespecífica propiamente dicha, como con la distancia interespecífica neta, que disminuye ligeramente aunque manteniendo las diferencias significativas (Tabla 28).

Por otro lado, existen especies cuyas secuencias no presentan distancia genética interespecífica, como ocurre entre *B. boulengeri* y *B. brongersmai* (distancia = 0,000), o especies con distancias interespecíficas muy bajas, como ocurre entre las dos especies anteriores y *B. siculus* y *B. balearicus* (0,003-0,007). Esto indica que las secuencias BamHI-800 de estas especies presentan un alto grado de similitud a pesar de provenir de especies diferentes. Algo similar ocurre con el grupo *B. latastii*, *B. luristanicus*, *B. surdus* y *B. viridis*, hecho que no resulta extraño si consideramos que todas esas especies pertenecen al género *Bufo*, a excepción de *B. brongersmai* que se ha separado recientemente en otro género.

La distancia de las secuencias de *A. arabicus* y *D. melanostictus* con el resto de especies consideradas depende de la variante analizada. Esto podría indicar que las secuencias BamHI-

RESULTADOS Y DISCUSION

800 de las variantes *A. arabicus* Gr_2 y *D. melanosticus* Gr_1 son más heterogéneas y presentan elevada similitud con las secuencias de otras especies.

Distancias Interespecíficas

	Bbu	Bca	Bvir	Bbo	Bbr	Blat	Blus	Bsur	Bsic	Bbal	Bmar	Bara G1	Bara G2	Bmel Gr1	Bmel Gr2
<i>Bufo bufo</i>		0,017	0,018	0,018	0,018	0,016	0,016	0,016	0,020	0,019	0,019	0,023	0,013	0,013	0,032
<i>Epidalea calamita</i>	0,177		0,019	0,019	0,019	0,018	0,017	0,018	0,020	0,019	0,019	0,022	0,016	0,016	0,032
<i>Bufo viridis</i>	0,209	0,201		0,007	0,008	0,011	0,010	0,012	0,009	0,007	0,019	0,025	0,010	0,009	0,032
<i>Bufo boulengeri</i>	0,213	0,209	0,070		0,005	0,010	0,009	0,011	0,005	0,005	0,020	0,025	0,010	0,008	0,033
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	0,217	0,210	0,076	0,056		0,010	0,010	0,011	0,004	0,005	0,020	0,025	0,010	0,008	0,033
<i>Bufo latastii</i>	0,200	0,194	0,113	0,111	0,114		0,007	0,006	0,012	0,011	0,018	0,022	0,007	0,010	0,031
<i>Bufo luristanicus</i>	0,195	0,188	0,098	0,096	0,099	0,075		0,006	0,011	0,010	0,018	0,022	0,007	0,009	0,031
<i>Bufo surdus</i>	0,188	0,187	0,111	0,108	0,110	0,072	0,070		0,013	0,012	0,018	0,022	0,006	0,011	0,032
<i>Bufo siculus</i>	0,215	0,210	0,070	0,045	0,042	0,113	0,097	0,110		0,005	0,021	0,026	0,011	0,009	0,034
<i>Bufo balearicus</i>	0,215	0,207	0,069	0,053	0,052	0,113	0,097	0,110	0,041		0,021	0,025	0,010	0,008	0,033
<i>Rhinella marina</i>	0,210	0,190	0,211	0,215	0,216	0,204	0,197	0,196	0,210	0,218		0,023	0,017	0,017	0,029
<i>Amietophrynus arabicus Gr1</i>	0,305	0,280	0,330	0,332	0,334	0,306	0,299	0,297	0,337	0,327	0,305		0,021	0,022	0,035
<i>Amietophrynus arabicus Gr2</i>	0,159	0,181	0,117	0,113	0,115	0,100	0,092	0,081	0,112	0,112	0,198	0,299		0,010	0,030
<i>Duttaphrynus melanosticus Gr1</i>	0,162	0,193	0,118	0,115	0,117	0,141	0,130	0,135	0,109	0,112	0,211	0,322	0,129		0,030
<i>Duttaphrynus melanosticus Gr2</i>	0,390	0,379	0,401	0,410	0,413	0,405	0,400	0,400	0,406	0,403	0,374	0,472	0,386	0,404	

Distancias Netas Interespecíficas

	Bbu	Bca	Bvir	Bbo	Bbr	Blat	Blus	Bsur	Bsic	Bbal	Bmar	Bara G1	Bara G2	Bmel Gr1	Bmel Gr2
<i>Bufo bufo</i>		0,016	0,017	0,017	0,018	0,015	0,015	0,016	0,019	0,018	0,019	0,021	0,009	0,007	0,032
<i>Epidalea calamita</i>	0,135		0,018	0,018	0,018	0,016	0,016	0,017	0,020	0,019	0,018	0,020	0,014	0,013	0,032
<i>Bufo viridis</i>	0,156	0,163		0,003	0,004	0,008	0,007	0,010	0,007	0,005	0,019	0,024	0,006	0,004	0,032
<i>Bufo boulengeri</i>	0,156	0,167	0,017		0,000	0,007	0,006	0,009	0,002	0,001	0,019	0,023	0,005	0,002	0,032
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	0,161	0,169	0,024	0,000		0,007	0,007	0,009	0,002	0,001	0,019	0,023	0,006	0,003	0,032
<i>Bufo latastii</i>	0,127	0,136	0,044	0,038	0,042		0,001	0,001	0,010	0,008	0,016	0,020	0,001	0,003	0,031
<i>Bufo luristanicus</i>	0,136	0,144	0,043	0,038	0,041	0,001		0,003	0,009	0,008	0,017	0,020	0,002	0,004	0,031
<i>Bufo surdus</i>	0,134	0,148	0,061	0,055	0,058	0,003	0,014		0,012	0,011	0,018	0,021	0,001	0,006	0,032
<i>Bufo siculus</i>	0,177	0,187	0,036	0,007	0,005	0,059	0,057	0,075		0,003	0,020	0,025	0,008	0,004	0,033
<i>Bufo balearicus</i>	0,165	0,171	0,023	0,003	0,003	0,046	0,044	0,063	0,009		0,020	0,024	0,007	0,003	0,032
<i>Rhinella marina</i>	0,156	0,150	0,161	0,161	0,163	0,133	0,140	0,145	0,174	0,170		0,022	0,015	0,014	0,029
<i>Amietophrynus arabicus Gr1</i>	0,199	0,189	0,228	0,226	0,229	0,184	0,192	0,194	0,250	0,228	0,202		0,019	0,019	0,035
<i>Amietophrynus arabicus Gr2</i>	0,076	0,114	0,038	0,031	0,033	0,001	0,008	0,002	0,049	0,036	0,118	0,167		0,002	0,029
<i>Duttaphrynus melanosticus Gr1</i>	0,065	0,111	0,025	0,018	0,021	0,028	0,031	0,041	0,031	0,021	0,116	0,176	0,007		0,029
<i>Duttaphrynus melanosticus Gr2</i>	0,339	0,343	0,355	0,359	0,363	0,338	0,348	0,353	0,374	0,359	0,325	0,372	0,309	0,313	

Tabla 28. Distancias genéticas interespecíficas y netas interespecíficas entre las secuencias BamHI-800 analizadas.

5.3. Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-800 mediante “Dot-Blot” sobre ADN genómico

Para estimar el número aproximado de copias del ADN repetitivo BamHI-800 en las especies en las que la calidad y cantidad del ADN genómico lo permitía se realizó un “Dot-Blot”. Para ello, concentraciones decrecientes de ADN genómico previamente desnaturalizado y transferido a una membrana de nailon se hibridaron con la sonda BamHI-800. En concreto, se utilizó ADN

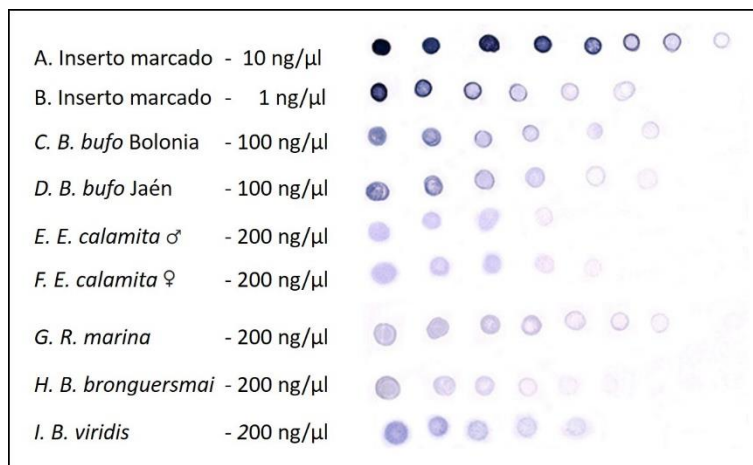


Figura 34. “Dot-Blot” sobre ADN genómico de distintas especies de la familia Bufonidae. Diluciones ½ de: (A) 10 ng/μl de plásmido con inserto BamHI-800 de *B. bufo*; (B) 1 ng/μl del mismo plásmido; (C) 100 ng/μl de ADN genómico de *B. bufo* de Bolonia; (D) 100 ng/μl de ADN genómico de *B. bufo* de Jaén; (E) 200 ng/μl de ADN genómico de *E. calamita* de Jaén (macho); (F) 200 ng/μl de ADN genómico de *E. calamita* de Jaén (hembra); (G) 200 ng/μl de ADN genómico de *R. marina* (hembra); (H) 200 ng/μl de ADN genómico de *B. bronguersmai*; (I) 200 ng/μl de ADN genómico de *B. viridis*.

genómico de distintas poblaciones de *B. bufo* (Bolonia y Jaén), de *E. calamita* de distintos sexos, y de las especies *R. marina*, *B. brongersmai* y *B. viridis*, junto con varias diluciones de un plásmido control de concentración conocida que contiene un monómero de BamHI-800 de *B. bufo*. La sonda utilizada corresponde a uno de los monómeros de BamHI-800 de *B. bufo* (Figura 34).

Los valores para la cantidad de ADN nuclear de estas especies, necesarios para estimar el número de copias del ADN repetitivo BamHI-800, se obtuvieron a partir de la base de datos “Animal Genome Size Database” (Gregory *et al.* 2007). Éstos se escogieron procurando que los

Especie	Procedencia	Señal	Valor C (pg ADN /núcleo)	Nº copias/núcleo
<i>B. bufo</i>	Italia (Bolonia)	500 pg	6,03 pg/núcleo ¹	3,66 x 10 ⁷ copias
	España (Jaén)	500 pg	6,03 pg/núcleo ¹	3,66 x 10 ⁷ copias
<i>E. calamita</i>	♂ (Jaén)	125 pg	4,16 pg/núcleo ¹	6,31 x 10 ⁶ copias
	♀ (Jaén)	125 pg	4,16 pg/núcleo ¹	6,31 x 10 ⁶ copias
<i>R. marina</i>	Australia	250 pg	4,22 pg/núcleo ¹	6,40 x 10 ⁶ copias
<i>B. bronguersmai</i>	Marruecos	125 pg	5,70 pg/núcleo ²	4,40 x 10 ⁶ copias
<i>B. viridis</i>	Grecia	250 pg	4,69 pg/núcleo ¹	7,12 x 10 ⁶ copias

Tabla 29. Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-800 mediante “Dot-Blot”. ¹Vinogradov (1998). ²Bachinann *et al.* (1978).

métodos utilizados para su cálculo fuesen los mismos en todas las especies analizadas (Tabla 29).

El análisis mediante “Dot-Blot” revela que el número de copias del ADN repetitivo BamHI-800 en *B. bufo* es un orden de magnitud superior al número de copias en otras especies, en las que parece mantenerse aproximadamente en un millón de copias por núcleo diploide. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos mediante FISH en las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*, en la cual *B. bufo* tenía más señal positiva para BamHI-800 que las otras dos especies (Figura 29).

5.4. Análisis filogenético de las secuencias BamHI-800

5.4.1. Estado actual de la taxonomía de la familia Bufonidae

Todas las especies de la familia *Bufonidae* analizadas en este trabajo estuvieron inicialmente incluidas en el género *Bufo*. En algunas ocasiones se hacían distinciones por grupos: como el grupo de *Bufo bufo* y el de *Bufo viridis*. En otros casos la nomenclatura utilizada hacía referencia a su procedencia geográfica tipo: “*Bufo* africano”, “*Bufo* de Nepal”, “*Bufo* asiático” o “*Bufo* americano”, en lugar de emplearse su nombre específico. De este modo, el sapo Bufo de Nepal o *D. melanostictus*, podía encontrarse con nombres diferentes en distintas referencias (*Bufo melanostictus*, *Bufo chlorogaster*, *Rana dubia*, *Bufo scaber*, *Bufo bengalensis*, *Bufo flaviventris*, *Bufo carinatus*, *Bufo isos*, *Bufo gymnauchen*, *Docidophryne spinipes*, *Bufo longecristatus*, *Bufo tienhoensis*, *Bufo camortensi*, *Ansonia kamblei*, *Bufo melanostictus hazarensis*).

A comienzo del siglo XXI surge la necesidad de revisar la taxonomía de la familia Bufonidae (Stöck *et al.* 2001; Frost *et al.* 2006; Stöck *et al.* 2012; Betto-Colliard *et al.* 2015). Las primeras propuestas de clasificación se basan en el empleo de distintos marcadores moleculares (ADN nuclear, ADN mitocondrial, microsatélites etc.) que permiten establecer las relaciones filogenéticas entre especies o poblaciones. De este modo se creó un género nuevo, *Pseudepidalea* (Frost *et al.* 2006), en el que se incluyen numerosos sapos que antiguamente pertenecían al grupo *viridis*, pero excluyendo a la especie *Epidalea calamita*, considerada actualmente como representante de su propio género. En revisiones posteriores se produce una redistribución de algunas especies del género *Pseudepidalea* en otros géneros. Así, el “*Bufo* de Nepal” (*B. melanostictus*) pasó al género *Duttaphrynus*, cuya proximidad a los géneros *Bufo* o *Bufotes* sigue siendo discutida hoy día. El “sapo de Marruecos” (*Bufo brongersmai*) paso a formar su propio género: *Barbarophryne* (Frost 2016), proponiéndose el género *Bufotes* para las especies del grupo *viridis*. La clasificación de los “sapos africanos” también se han revisado, de forma que algunos han quedado en el género *Bufotes* (*B. boulengeri*), mientras otros, como *Bufo*

arabicus, han ido pasando por distintos géneros y grupos (grupo *Bufo*, *Bufo viridis* ssp *arabica* o *Duttaphrynus arabicus*), hasta que finalmente han sido separados en el género *Amietophrynus* junto con algunas especies próximas (Portik *et al.* 2015). Finalmente, la propuesta actual consiste en cambiar el nombre del género *Amietophrynus* por el de *Sclerophrys* (Ohler *et al.* 2016).

La revisión de la filogenia molecular de los “Bufos de américa” llevó a considerar dos géneros parafileticos: *Chaunus* y *Rhinella* (Pramuk 2006; Pramuk *et al.* 2008). Entre las especies de estos géneros cabe destacar a *R. marina*. Se trata de una especie ampliamente distribuida por Sudamérica y América central, que ha sido introducida en numerosas islas del Pacífico, Australia, Japón etc. Debido a la dificultad para distinguir poblaciones y subespecies, hoy día se considera a *R. marina* un grupo (grupo *Rhinella marina*) y no una única especie.

El género *Bufo*, a pesar de ser el más antiguo y parecer el más claro taxonómicamente, hoy día tampoco está exento de polémica. Así, en los últimos años se ha propuesto separar a las poblaciones de *B. bufo* de la Península Ibérica, del sur de Francia y del norte de África en una especie diferente, *B. spinosus*, en lugar de considerarlas como subespecies de *B. bufo* (*B. b. spinosus*) (Arntzen *et al.* 2013a). En esta última propuesta, sin embargo, no queda claramente definida la zona geográfica de contacto entre ambas especies (*B. bufo* y *B. spinosus*), por lo que su separación sigue sujeta a debate.

5.4.2. Marcadores mitocondriales y filogenia de la familia Bufonidae

Las particularidades del ADN mitocondrial (transmisión por vía materna y tasa de mutación 10 veces superior al ADN nuclear) permiten utilizar los polimorfismos almacenados en estas moléculas de ADN para reconstruir relaciones evolutivas intra- e interespecíficas (Nijman *et al.* 2003). Los marcadores mitocondriales más utilizados para este fin son el citocromo b, la citocromo oxidasa II, la NADH deshidrogenasa, el D-loop y el ARNr 12S rRNA–tRNA–16S rRNA.

Para la reconstrucción de la filogenia de las especies de la familia Bufonidae analizadas en este trabajo se ha utilizado parte de la región del ARNr 16S, formada por los marcadores 12S rRNA–tRNA–16S rRNA ([Material suplementario S4](#)), ya que es la única región secuenciada en todas las especies analizadas en este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSION

La filogenia de este grupo se obtuvo a partir de 13 secuencias, con 444 posiciones informativas⁷⁹, utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud⁸⁰, estimando la varianza mediante “bootstrap” con 1.000 réplicas (Figura 35).

En el árbol se puede apreciar que hay algunas especies que tienden agruparse, como ocurre con 5 especies del genero *Bufo* (*B. viridis*, *B. luristanicus*, *B. balearicus*, *B. boulengeri* y *B. siculus*), si bien dos de las especies que actualmente forman parte de este género (*B. surdus* y *B. latastii*), se sitúan en una rama separada. Otras especies, como *R. marina* y *B. brongersmai*, se sitúan juntas y próximas a *B. bufo*, mientras que *D. melanostictus* se encuentra en la misma rama que

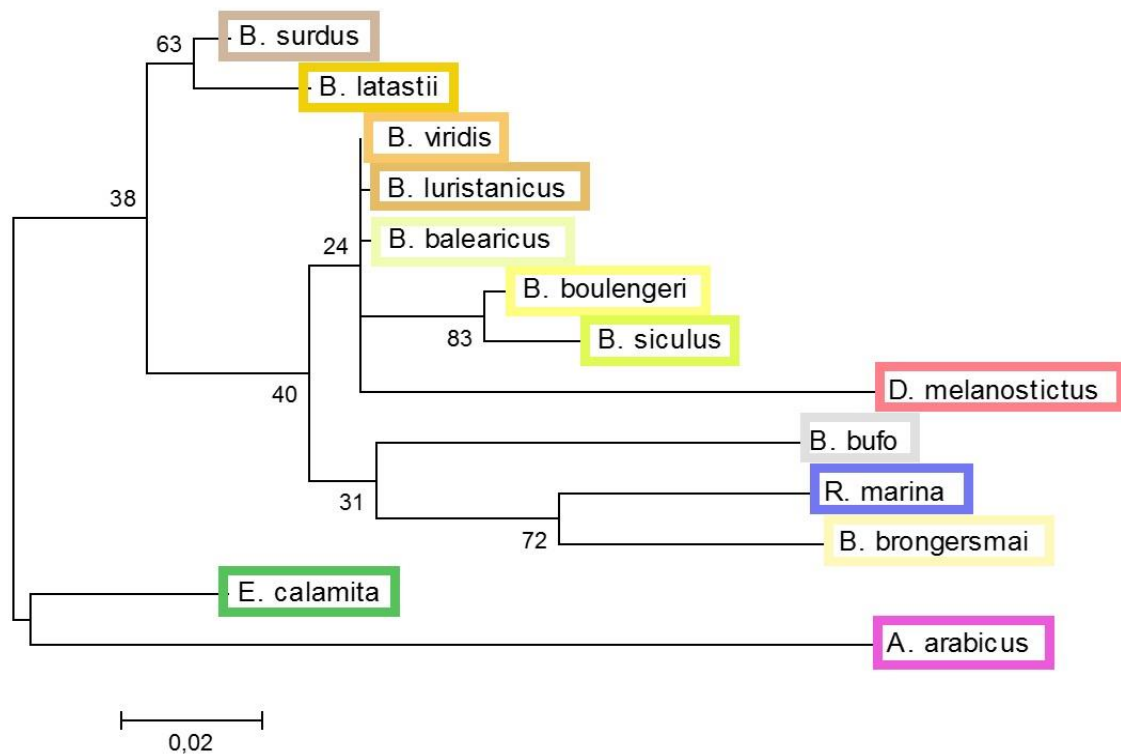


Figura 35. Filogenia de la familia Bufonidae basada en las secuencias mitocondriales del ADNr 16S. Árbol calculado mediante el método de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución nucleotídica de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma (T92+G). La varianza se estimó mediante “bootstrap” con 1000 réplicas.

⁷⁹ Eliminando los “gaps”.

⁸⁰ El modelo de sustitución nucleotídica empleado fue el de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma (T92+G).

RESULTADOS Y DISCUSION

la mayoría de las especies del genero *Bufo*tes. Finalmente, las especies *A. arabicus* y *E. calamita* tienden a salir en ramas separadas.

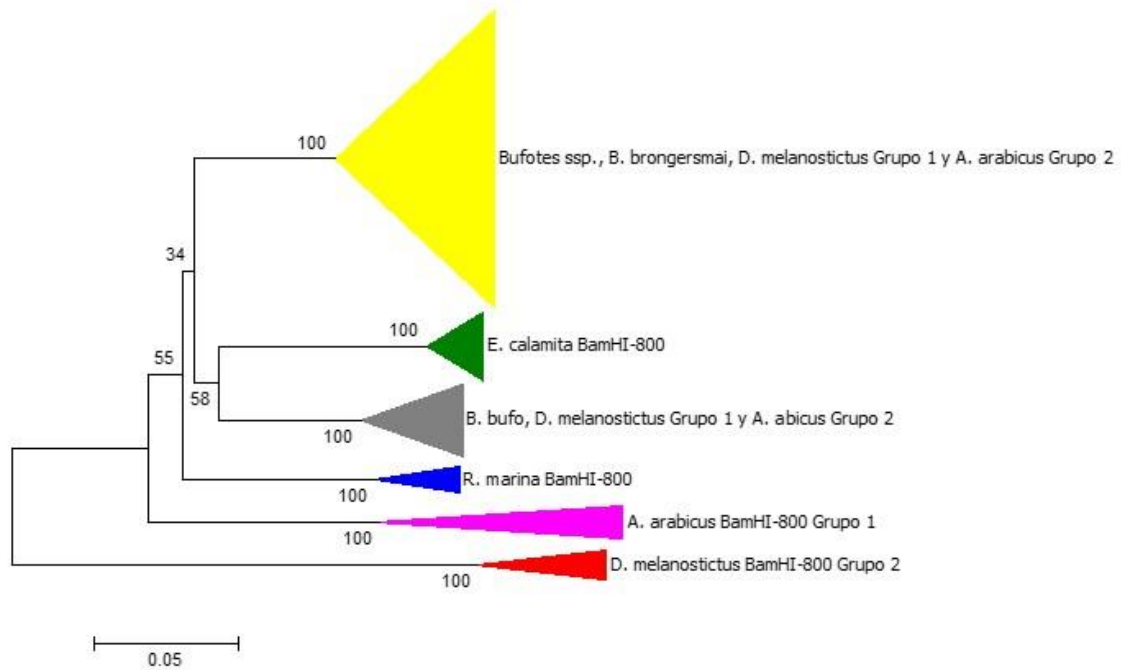


Figura 36. Árbol filogenético comprimido de todas las secuencias BamHI-800 analizadas. El árbol se calculó a partir de 161 secuencias con 801 posiciones informativas (con eliminación de "gaps") usando el método estadístico de máxima verosimilitud (InL = -16.541,1883). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el de 3 parámetros de Tamura con distribución gamma. La varianza se estimó mediante "Bootstrap" con 1.000 réplicas.

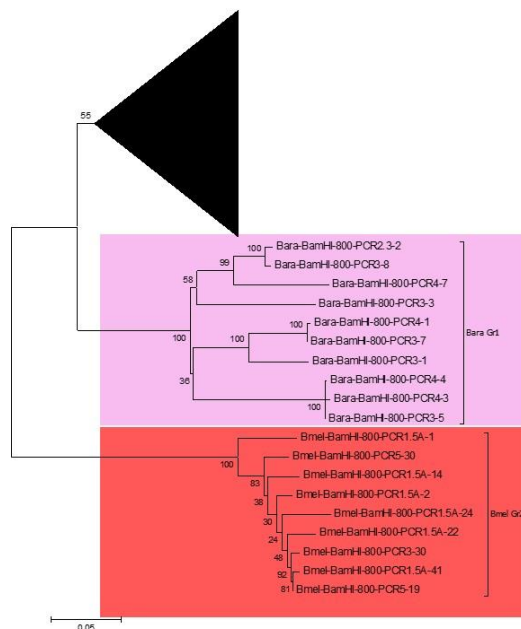


Figura 37. Detalle de las ramas del árbol filogenético BamHI-800 en las que se agrupan las secuencias del Grupo 2 de *A. arabicus* y del Grupo 1 de *D. melanostictus* en dos ramas independientes soportadas por valores de "bootstrap" del 100%.

5.4.3. Árbol filogenético de las secuencias BamHI-800

Teniendo en cuenta el análisis de las distancias, y considerando las variantes de algunas especies, calculamos el árbol filogenético de las secuencias BamHI-800 (ver [Material suplementario S5](#) para el árbol filogenético completo). En el árbol filogenético comprimido puede verse que las secuencias de las especies *B. viridis*, *B. boulengeri*, *B. siculus*, *B. balearicus*, *B. latastii*, *B. luristanicus* y *B. surdus* aparecen agrupadas dentro del género *Bufo*tes, si bien en esta rama también aparecen secuencias de *B. brongersmai* (Figura 36).

RESULTADOS Y DISCUSION

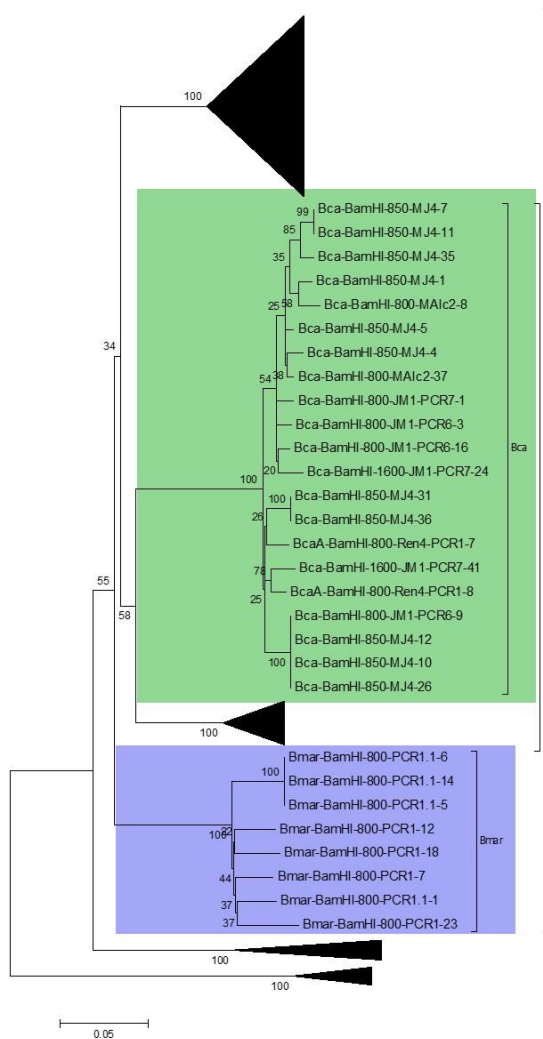


Figura 38. Detalle de las ramas del árbol filogenético BamHI-800 en las que se agrupan las secuencias de *E. calamita* y *R. marina*.

39).

La filogenia obtenida muestra a las secuencias BamHI-800 de las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *R. marina* agrupadas según la especie de la que proceden, pero separadas del resto y entre sí de forma bastante definida. Estos resultados indican que estas secuencias evolucionan independientemente dentro de cada especie, de manera que la distancia genética intraespecífica se mantiene pequeña, mientras que las distancias con las secuencias de otros grupos (interespecíficas) son cada vez mayores a medida que aumenta el tiempo de divergencia entre las especies.

La rama más grande del árbol, que incluye el resto de secuencias no mencionadas hasta ahora, está formada a su vez por dos grandes subramas (Figura 40 y Figura 41). En una de ellas (Figura 40) se agrupan todas las secuencias de *B. surdus* (en el 83% de las réplicas de bootstrap), aunque

Los clados pequeños correspondientes a distintos géneros se ven apoyados por valores de “bootstrap” del 100%. Entre estas ramas destacan las secuencias pertenecientes a las variantes *D. melanostictus* Gr_2 y *A. arabicus* Gr_1, que claramente se localizan en ramas independientes del árbol principal, soportadas por valores de “bootstrap” del 100% (Figura 37). Existen otros dos grupos: *R. marina* y *E. calamita*, que también se agrupan en dos ramas separadas (Figura 38). Estos 4 grupos de secuencias (*R. marina* y *E. calamita*, *D. melanostictus* Gr_2 y *A. arabicus* Gr_1) no presentan secuencias de ninguna otra especie que no sea la suya propia (o su propio subgrupo de secuencias).

Las secuencias de *B. bufo* también se agrupan con 100% de probabilidad en una rama separada. Sin embargo, en esta rama aparecen algunas secuencias de *D. melanostictus* Gr_1 y *A. arabicus* Gr_2 (Figura

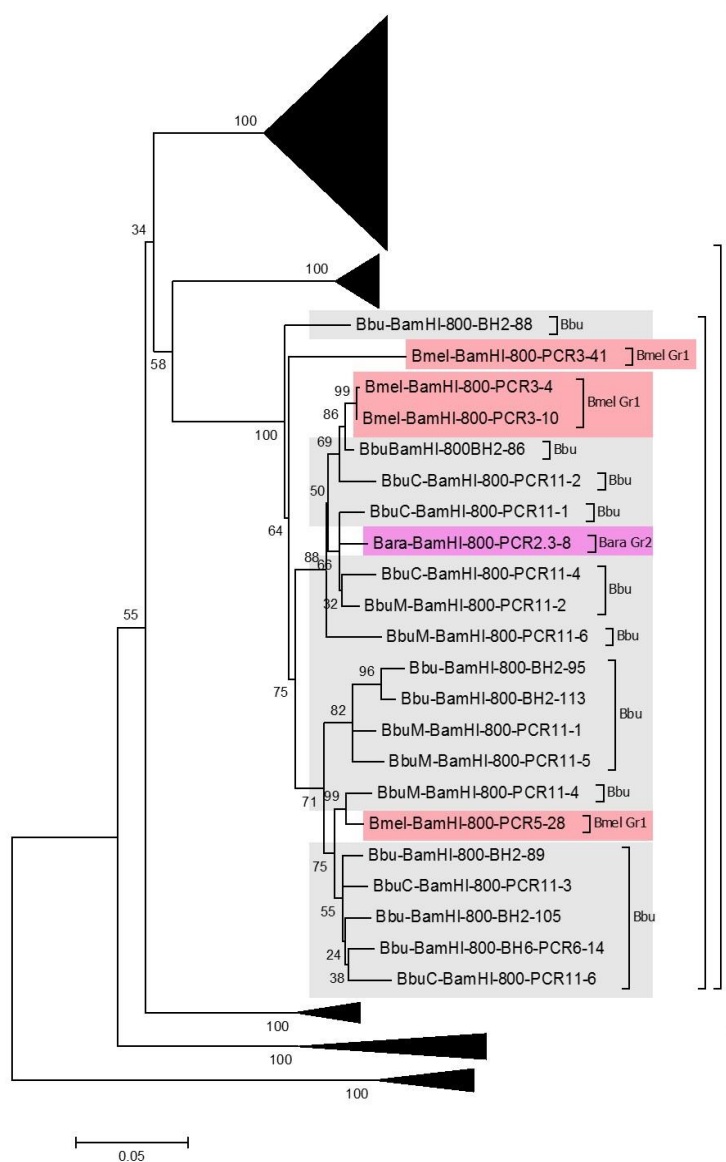


Figura 39. Detalle del árbol filogenético BamHI-800 en el que se muestra la rama con las secuencias de *B. bufo*. En otro color se indican las secuencias de *D. melanostictus* Gr_1 (rojo) y *A. arabicus* Gr_2 (rosa) que aparecen también en esta rama.

entre ellas aparecen entremezcladas secuencias de *B. luristanicus*, *B. latastii* y *A. arabicus* Gr_2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el árbol filogenético basado en ADN mitocondrial 16S, en el que las especies de *B. surdus* y *B. latastii* aparecen en una rama distinta del resto de las especies del género *Bufo*tes (Figura 35).

En la otra subrama pueden destacarse algunas agrupaciones de secuencias apoyadas por valores de “bootstrap” elevados (Figura 41). Es el caso de la agrupación de secuencias de *B. luristanicus* (soportada por valores de “bootstrap” del 99%), entre las que se encuentran el resto de las

secuencias de *B. latastii*. Otra agrupación interesante la forman las secuencias de *B. viridis*, soportada con valores de “bootstrap” del 98%. Además en esta subrama de árbol aparecen de forma entremezclada todas las secuencias de *B. brongersmai*, *B. boulengeri*, *B. siculus* y *B. balearicus*.

Esta agrupación es curiosa, ya que, aunque las especies *B. boulengeri*, *B. siculus* y *B. balearicus* pertenecen al mismo género (*Bufo*tes), la especie *B. brongersmai* ha sido situada recientemente en un nuevo género, *Barbarophryne*, que se localiza separado del grupo de “*Bufo viridis*” (Stöck *et al.* 2006), más próximo al grupo de “sapos euroasiáticos”, con una posible separación de 20 –

RESULTADOS Y DISCUSION

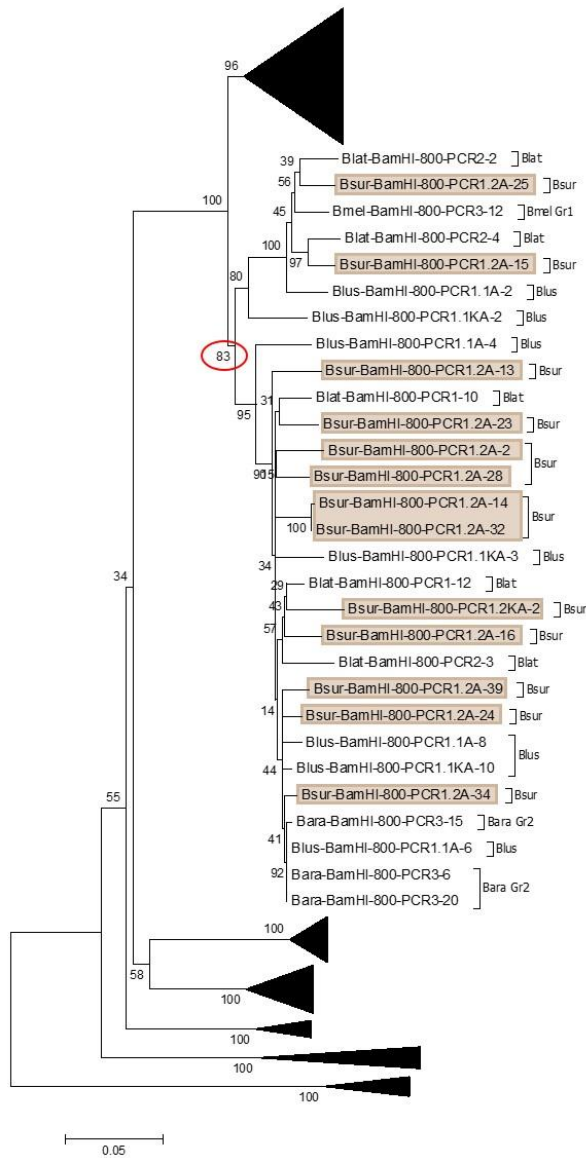


Figura 40. Detalle del árbol filogenético de las secuencias BamHI-800 en el que se muestra la rama en la que se agrupan las secuencias de *B. surdus*.

60 millones de años (Doglio *et al.* 2010; Garcia-Porta *et al.* 2012). Si consideramos el repetitivo BamHI-800 como un marcador, las distancias genéticas de las secuencias de esta especie son muy próximas a las de algunas especies del genero *Bufotes*. De hecho, las secuencias BamHI-800 de *B. brongersmai* y *B. boulengeri*, dos especies que

comparten el habitat geográfico, salen entremezcladas en el árbol filogenético de BamHI-800 (Figura 41), mostrando una distancia neta de 0 (Tabla 27). Los resultados obtenidos para BamHI-800 indicarían que en la especie de *B. brongersmai* se ha definido la misma variante de BamHI-

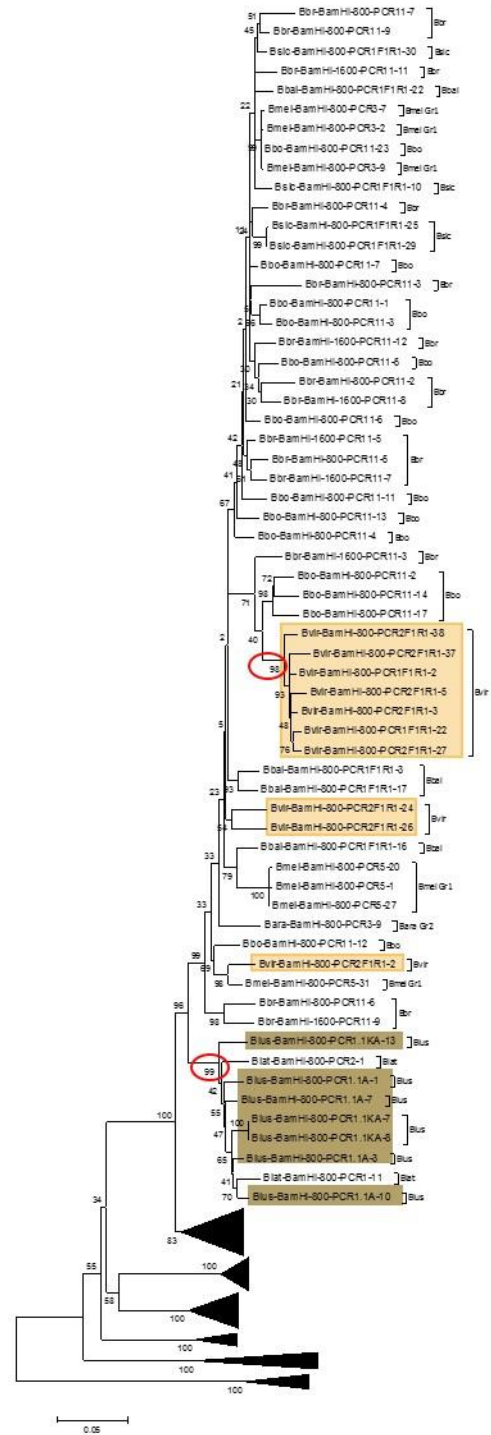


Figura 41. Detalle del árbol filogenético de las secuencias BamHI-800 en el que se muestra la rama en la que se agrupan las secuencias del género *Bufotes*. En color naranja se señalan las secuencias de *B. viridis* y en color marrón las de *B. luristanicus*.

RESULTADOS Y DISCUSION

800 que en el género *Bufo*. Lo que a su vez hace pensar que la estimación del tiempo de separación de la especie de *B. brongersmai* del “grupo viridis” es menor del estimado. Alternativamente, si esta especie no se encuentra aislada reproductivamente, podría ocurrir la homogenización de las variantes monoméricas BamHI-800 de otra especie del género *Bufo* con la que hibridase. Este podría ser el caso de *B. boulengeri*, especie con la que comparte hábitat. La producción de híbridos fértiles no es un fenómeno extraño en anfibios. Algunas especies triploides viables y fértiles han aparecido por el cruzamiento de especies distintas con distintos niveles de ploidia (*Bufo pewzowi* (4n) y *Bufo turanensis* (2n)) (Stöck *et al.* 2002; Stöck *et al.* 2010; Borkin *et al.* 2013). También se han encontrado híbridos entre las especies *Bufo bufo* y *Bufo balearicus*, posiblemente debidos a cambios de hábitat desencadenados por el cambio climático y la destrucción de sus hábitat naturales (Canestrelli *et al.* 2017).

En cuanto a las secuencias de las variantes de *A. arabicus* y *D. melanostictus* que se agrupan con otras secuencias, las del grupo 2 de *A. arabicus* aparecen con mayor frecuencia junto con las secuencias de *B. surdus* (variante 2b de BamHI-800 del género *Bufo*), aunque también pueden localizarse en otras ramas (variante 1a de BamHI-800 del género *Bufo*). Las del grupo 1 de *D. melanostictus*, por el contrario, se sitúan de forma dispersa en el árbol, preferiblemente entre las secuencias de *B. brongersmai* y *B. boulengeri*, aunque también pueden encontrarse en otras ramas, incluida la rama correspondiente a las secuencias de *B. bufo* (Figura 39). El análisis filogenético de todas las secuencias BamHI-800 de *D. melanostictus* (Figura 33) mostraba la existencia de dos ramas, una en la que se agrupaban las secuencias del grupo 2 de *D. melanostictus*, y otra con las secuencias del grupo 1. Esta última rama se divide a su vez en dos subramas, las 4 secuencias presentes en una de ellas se corresponden con las secuencias que en el árbol general salen entremezcladas con las secuencias de *B. bufo* (variante 4 de BamHI-800 del género *Bufo*), mientras que en la otra se localizan las secuencias que se entremezclan con las secuencias de *B. boulengeri* y *B. brongersmai* (variantes 1a y 2a de BamHI-800 del género *Bufo*).

El modelo evolutivo que explica la presencia de distintos perfiles de ADN repetitivo en especies relacionadas se basa en la hipótesis de Fry *et al.* (1977), que propone la existencia de una colección de secuencias ADN repetitivo (“library”) compartida por especies relacionadas. La confirmación experimental de esta hipótesis en distintas especies revela que en los genomas de especies relacionadas coexisten diferentes variantes de un ADN repetitivo, y éstas son amplificadas diferencialmente en distintas especies o en cromosomas diferentes de la misma especie (King *et al.* 1995; Vershinin *et al.* 1996; Mestrovic *et al.* 1998; Nijman *et al.* 2001;

RESULTADOS Y DISCUSION

Ugarkovic *et al.* 2002; Palomeque *et al.* 2008; Plohl *et al.* 2012) (ver Figura 42 para una explicación).

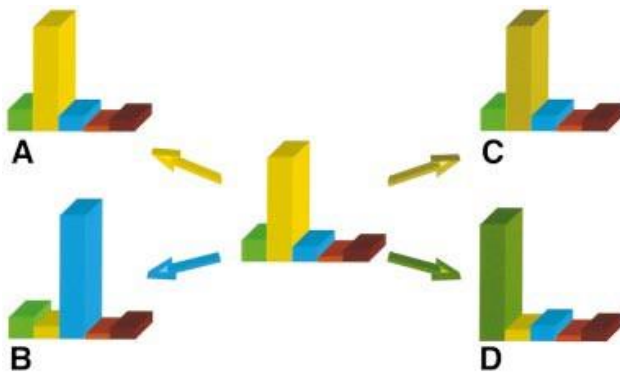


Figura 42. Representación esquemática de una biblioteca de ADN satélite compuesta de cinco satélites diferentes que se muestran en diferentes colores. La altura de cada columna indica el número de copias, mientras que un cambio en el color marca la divergencia de las secuencias. (A) Dentro de una especie el perfil de ADN satélite permanece conservado, tanto en secuencia como en número de copias. (B) Si tiene lugar un cambio en el número de copias de uno o más satélites de la biblioteca original, pero sin cambio en las secuencias, se obtiene una variación del perfil del satélite. En este ejemplo, se produce disminución en el número de copias de uno de los satélites y aumento de otro. (C) El perfil del satélite puede cambiar debido a divergencias en las secuencias nucleotídicas de uno o más satélites, permaneciendo inalterado el número relativo de copias. En este ejemplo, sólo cambian las secuencias del ADN satélite mayoritario, mientras que los satélites menores permanecen conservados en su secuencia. (D) La variación en el perfil de satélite puede deberse simultáneamente a cambios en la secuencia y en el número de copias de uno o más satélites de la biblioteca. Extraído de Ugarkovic *et al.* (2002).

Según este modelo evolutivo, la presencia de distintos perfiles de ADN repetitivo en especies relacionadas se explica por la fluctuación en el número de copias de las secuencias de la colección inicial, siendo el grado de fluctuación diferente en distintos organismos. A grandes rasgos, según esta hipótesis, todas las variantes de un ADN repetitivo estarían presentes en un grupo de especies relacionadas o en todos los cromosomas de un organismo. Sin embargo, solo un número reducido de variantes adquirirá la capacidad de expandirse. De esta forma, con el paso de tiempo acabará predominando una o unas pocas variantes de un determinado ADN repetitivo, mientras que las

otras variantes estarán cada vez en menor proporción. Una vez diferenciado el perfil de ADN repetitivo de una especie, éste sufrirá su propio proceso evolutivo, haciendo que cada vez se parezca menos a la forma ancestral.

Esta teoría permite explicar la presencia de distintas variantes de las secuencias BamHI-800 en las especies *A. arabicus* y *D. melanostictus*, mediante amplificación de secuencias distintas del ADN repetitivo BamHI-800 en cada una de ellas. De este modo, en cada una de las especies predominaría una de las variantes (grupo 1 en *A. arabicus* y grupo 2 en *D. melanostictus*), si bien también se han identificados otras variantes en ambos casos.

Basándonos en la divergencia que presentan las secuencias, en la familia de ADN repetitivo BamHI-800 se han identificado 7 variantes de secuencias diferentes (Tabla 30), apoyadas por distancias genéticas (Tabla 27 y Tabla 28) y por el árbol filogenético ([Material suplementario S5](#)). Algunas de estas variantes presentan, a su vez, subvariantes (1a y 1b, 2a y 2b). Otras variantes solo se han encontrado en una especie/género (variantes 3, 5, 6 y 7), pero no se descarta su

RESULTADOS Y DISCUSION

presencia en número menor en otras especies/géneros, tal y como se plantea en la hipótesis de la biblioteca. Otras variantes, sin embargo, se han encontrado en distintas especies e incluso en distintos géneros (1, 2 y 4).

Variante	Bbu	Ecal	Bvir	Bbro	Bbou	Blat	Blus	Bsur	Bsic	Bbal	Rmar	Aara	Dmel
1a			10	14	13				4	4		1	7
1b						2	7						
2a						2	2	2					1
2b						3	5	11				3	
3		21											
4	17											1	4
5											8		
6												10	
7													9

TOTAL 161

Tabla 30. Variantes de secuencias BamHI-800 encontradas en las especies de la familia Bufonidae analizadas.

Habitualmente, cualquier secuencia de ADN acumula mutaciones con el tiempo, y las copias de una secuencia repetida y dispersa a lo largo del genoma divergen con una tasa que está inversamente relacionada con las limitaciones impuestas a esta secuencia. La homogeneidad de las secuencias de ADN repetitivo es el resultado de la evolución no independiente de las unidades repetidas, esto significa que las mutaciones no se acumulan de forma independiente en secuencias monoméricas, sino que se propagan entre unidades repetidas o se eliminan. Este modo particular de evolución, conocido como evolución concertada o “molecular drive”, surge como consecuencia de dos procesos consecutivos: la homogeneización de las secuencias y su fijación posterior (Dover *et al.* 1982; Dover *et al.* 1986).

La homogeneización de las mutaciones entre los miembros de una familia de ADN repetitivo puede realizarse mediante mecanismos de transferencia no recíproca de secuencias, como pueden ser el entrecruzamiento desigual, la conversión génica, la transposición o la replicación por círculo rodante. Por tanto, la baja variabilidad entre las unidades monoméricas del ADN repetitivo se debe a un efecto neto de dos procesos opuestos, la acumulación de mutaciones, por un lado, y la velocidad de propagación o eliminación por el otro.

En el siguiente nivel, dentro de la población/especie/genero etc., las secuencias se fijan en los individuos como resultado de la reproducción sexual. Por este motivo, en organismos aislados reproductivamente la acumulación de mutaciones homogeneizadas dentro del ADN repetitivo producirá una rápida homogeneización de las repeticiones en el genoma de individuos no aislados, pero no entre grupos de organismos separados. Esto provoca la divergencia evolutiva

RESULTADOS Y DISCUSION

de las secuencias de ADN repetitivo entre grupos de organismos, mientras que la homogeneidad de secuencias entre monómeros permanece inalterada dentro de cada uno de estos grupos. Por este motivo, según el modelo de evolución concertada, las mutaciones se acumulan y se propagan gradualmente dentro de los ADN repetitivos y permiten detectar las tasas de divergencia en la especie (Bachmann *et al.* 1993; Garrido-Ramos *et al.* 1999), población o ecotipo (Hall 1999).

En resumen:

- Las secuencias se expanden mediante recombinación desigual entre monómeros de unidades repetidas, y se homogeneizan por conversión génica o mecanismos equivalentes.
- La tasa a la que ocurre la homogeneización intraespecífica es mayor que la tasa por la que aparecen mutaciones y, a la vez, menor que la tasa de fijación o divergencia interespecífica. Esto resulta en una elevada tasa de homogeneización intraespecífica y alta divergencia interespecífica.

Las secuencias BamHI-800 de la familia Bufonidae (exceptuando las secuencias del Grupo 2 de *A. arabicus* y las del Grupo 1 de *D. melanostictus*), parecen cumplir claramente con las premisas de la hipótesis de la evolución concertada. Así, los valores de las distancias interespecíficas son superiores a los de las distancias intraespecíficas. Además, el número de posiciones conservadas en todas las especies es superior al de posiciones variables (Tabla 26), indicando que la tasa de homogeneización es más alta que la tasa de mutación de dichas secuencias.

Un punto más a favor de la evolución concertada de las secuencias BamHI-800 es que la distribución de estas secuencias en los cromosomas de las tres especies que se han analizado (*B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis*) es distinta en cada una de ellas, aunque siempre organizadas en tándem. Esta organización en tándem facilitaría la transferencia no recíproca entre unidades monoméricas de este ADN repetitivo.

Con estas dos teorías parece posible explicar la evolución del ADN satélite BamHI-800 en la familia Bufonidae, que presenta una colección de unidades monoméricas BamHI-800 (“library”) que con el paso de tiempo y mediante evolución concertada, tienden a definir variantes distintas en cada una de las especies. De este modo, podemos observar variantes definidas en algunas especies (*B. bufo*, *E. calamita* y *R. marina*), aunque otras especies presentan tipos múltiples de variantes de BamHI-800, con cierta tendencia a definirse en algún tipo de variante específico según la especie.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estos datos son los primeros que indican la implicación de librerías de ADN repetitivo/s y de evolución concertada como procesos evolutivos simultáneos en un ADN repetitivo en anfibios. Incluir mayor número de secuencias y añadir nuevas especies de la familia Bufonidae permitirán seguir analizando la evolución de las variantes BamHI-800 para poder confirmar esta hipótesis.

6. Familias de ADN repetido BamHI-210

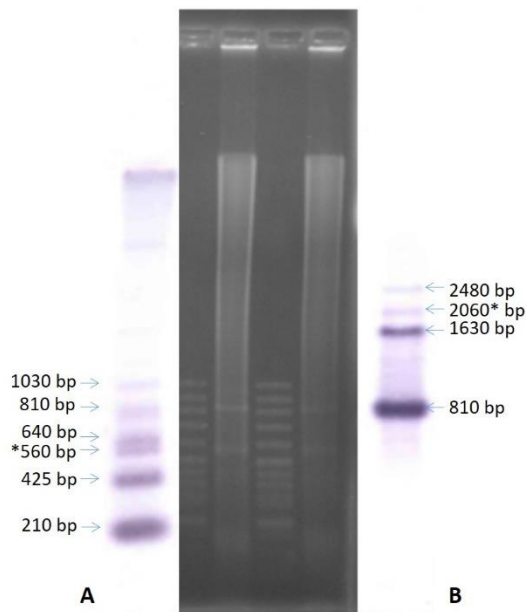


Figura 43. Fragmento de la Figura 15. "Southern Blot" de ADN genómico de *B. bufo* (5 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con distintas sondas: (A) Como sonda se utiliza la banda de 210 pb; (B) Como sonda se utiliza la banda de 800 pb.

La banda de 210 pb procedente de la digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI pone de manifiesto otra familia de ADN repetido. Como se mencionó en el apartado 2, cuando esta banda se utiliza como sonda en experimentos de hibridación con ADN genómico previamente digerido y transferido a una membrana de nailon, se observa un patrón de bandas en escalera, aunque con algunas excepciones (Figura 43A y Figura 15C). Así, las bandas de 210, 425, 640, 810 y 1.030 pb aproximadamente podrían ser múltiplos de unidades monoméricas de unos 210 pb. La banda de 560 pb, sin embargo, no puede explicarse de este modo.

La banda de 210 pb obtenida tras la digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI se purificó a partir del gel de agarosa, se ligó al vector pUC19 digerido con *Bam*HI (Fermentas) y se clonó transformando bacterias competentes de la cepa JM109 (*E. coli*). Los clones recombinantes se seleccionaron en medio LB agar con ampicilina, IPTG y X-gal, y entre éstos se identificaron los clones portadores de este ADN repetitivo. Para ello se extrajo el ADN plasmídico, que fue desnaturalizado, transferido a una membrana de nailon y finalmente hibridado utilizando como sonda la banda BamHI-210 pb marcada con digoxigenina. En total se obtuvieron 44 secuencias con notables diferencias entre ellas, como puede observarse al analizar su alineamiento ([Material suplementario S6](#)). De hecho, a partir de los alineamientos se pueden distinguir 5 grupos diferentes de secuencias, junto a 5 secuencias que no alinean entre sí, ni con ninguna otra secuencia clonada en *B. bufo*. Las frecuencias con las que se obtienen secuencias pertenecientes a cada uno de los grupos identificados probablemente son indicativas de diferencias en el número de copias de dichas secuencias en el genoma de *B. bufo* (Tabla 31).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las secuencias de los grupos 210A y 210B son las que se obtienen con mayor frecuencia, por lo que podrían ser las secuencias más representadas en el genoma de *B. bufo*. A continuación, se describe con detalle el análisis de las secuencias de los grupos 210A y 210B en varias especies de la familia Bufonidae.

Grupo	Nº de	Procedencia	Notas
210A	21 secuencias	10 ♀ (Bolonia y	
210B	11 secuencias	10 ♀ (Bolonia)	
210C	2 secuencias	2 ♀ (Bolonia)	Similitud con secuencias BamHI-
210D	3 secuencias	2 ♀ (Bolonia)	
210E	2 secuencias	2 ♀ (Bolonia)	Alinea con BamHI-190
Secuencias	5 secuencias	4 ♀ (Bolonia y Jaén)	Secuencias que no alinean entre

Tabla 31. Grupos de secuencias obtenidas a partir de la banda de 210 pb procedente de la digestión de ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI. Para cada grupo de secuencias se indica el número de clones obtenidos y la procedencia del ADN de origen.

7. ADN repetido BamHI-210A

7.1. Patrones de hibridación de BamHI-210A en *B. bufo*

Se han realizado digestiones de ADN genómico de *B. bufo* de ambos sexos y de distintas procedencias poblacionales (Bolonia (Italia) y Jaén (España)). Las digestiones se transfirieron a una membrana de nailon y posteriormente se hibridaron con secuencias del grupo 210A marcadas con digoxigenina. El patrón de bandas obtenido es idéntico entre muestras de distintas poblaciones o distintos sexos, indicando que BamHI-210A no muestra diferencias debidas al sexo o procedencia poblacional de los individuos analizados (Figura 44).

Por otro lado, las diferencias observadas en los patrones de hibridación de distintos experimentos de digestión y transferencia de ADN genómico a membranas de nailon son debidas a diferencias en la eficiencia de la transferencia o de la digestión (ver Figura 44B).

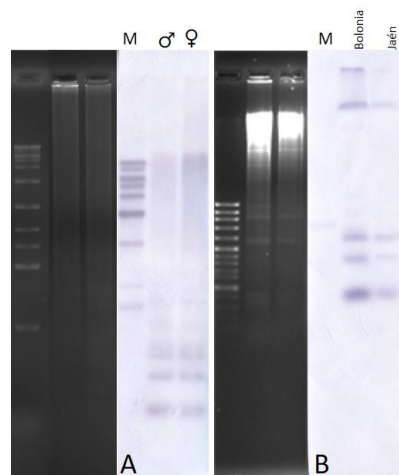


Figura 44. Digestión de 10 µg de ADN genómico de *B. bufo* digerido con *Bam*HI e hibridación con el "Southern Blot" correspondiente utilizando la sonda BamHI-210A. A: *B. bufo* de Bolonia: macho 2 y hembra 2. B: *B. bufo* Bolonia (Italia) y Jaén (España).

7.2. Clonación y análisis de las secuencias BamHI-210A de *B. bufo*

Las secuencias pertenecientes al grupo BamHI-210A, obtenidas tras la clonación de la banda de 210 pb, fueron alineadas y sobre las zonas más conservadas se diseñaron cebadores específicos (Figura 45).

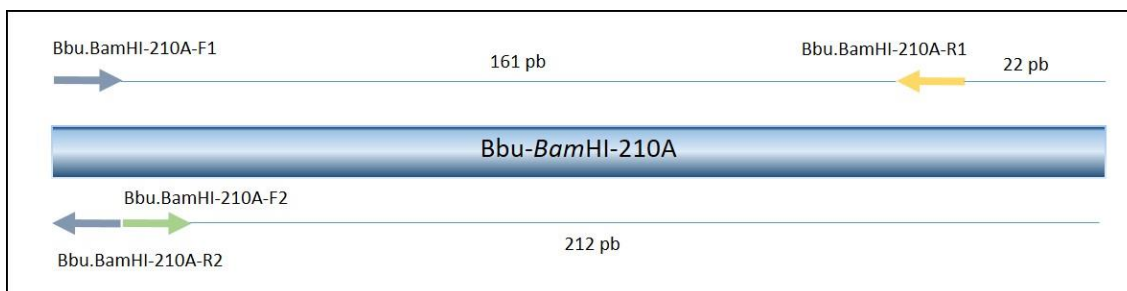


Figura 45. Representación gráfica de la unidad monomérica BamHI-210A sobre la que se indica la localización de los cebadores utilizados para amplificar por PCR este ADN repetitivo.

Con estos cebadores se realizaron PCRs sobre ADNs genómicos de distintos individuos. Independientemente del sexo o la procedencia de las muestras de ADN utilizadas en las reacciones de PCR, siempre se observa el mismo patrón de bandas (210, 420, 560 y 650 pb) (Figura 46), de tamaños equivalentes a los que aparecen en las hibridaciones sobre ADN genómico digerido con *Bam*HI y hibridado con la banda de 210 pb (Figura 43B).

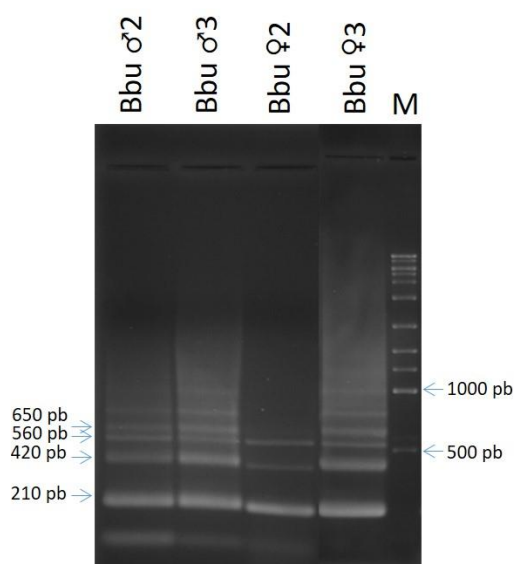


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X de los productos de PCRs específicas para las secuencias BamHI-210A en distintos individuos de la especie *B. bufo*. Las diferencias observadas en la muestra de la hembra 3 de *B. bufo* se deben a diferencias en la concentración del ADN de partida.

Los amplicones de 210 pb observados en las PCRs específicas para BamHI-210A fueron clonados y secuenciados. En total se han obtenido 32 secuencias de *B. bufo* procedentes de distintas poblaciones (Bolonia y Jaén), de distintos sexos (machos y hembras) y de distinto origen (digestión de ADN genómico y PCR) ([Material suplementario S7](#)).

El alineamiento de estas secuencias muestra que tienen un tamaño medio de 212 pb, de las cuales 114 son posiciones conservadas y 99 son posiciones variables (con 62 son sitios informativos y 37 SNPs) (Figura 47). En promedio, las secuencias BamHI-210A muestran una composición ligeramente rica en

RESULTADOS Y DISCUSION

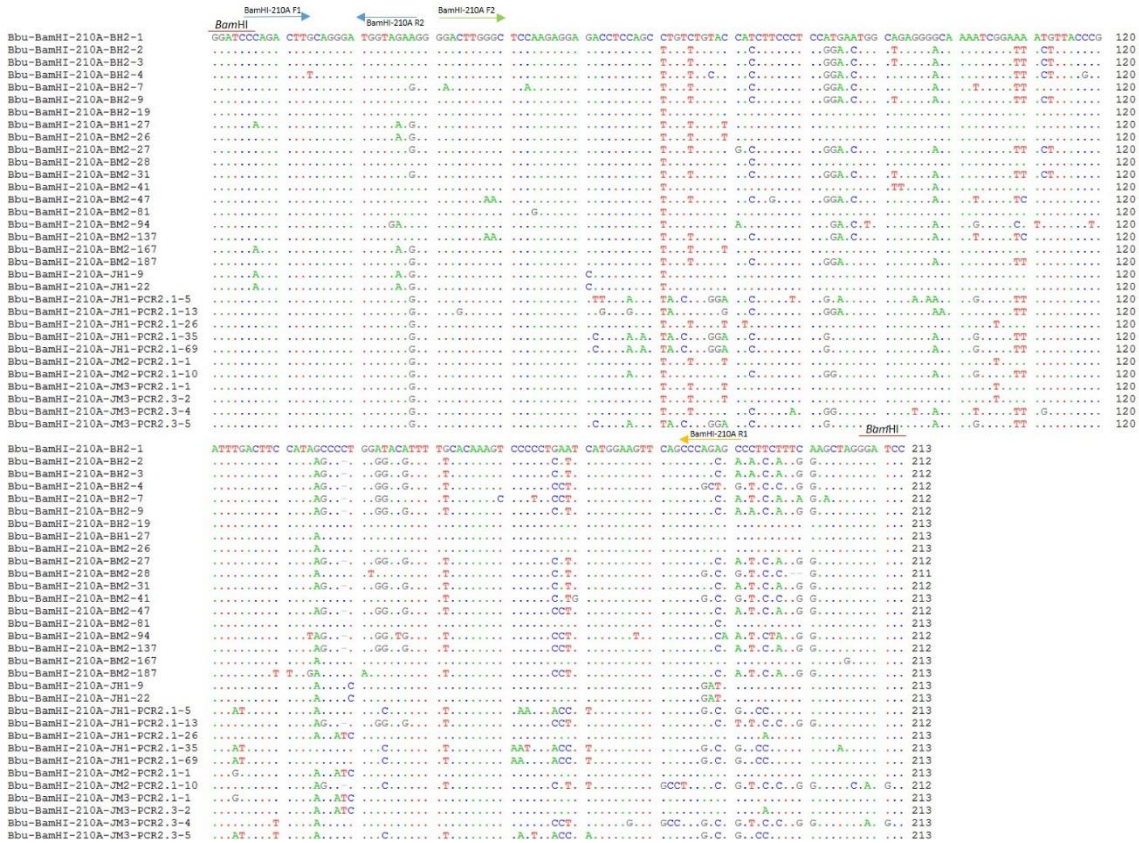


Figura 47. Alineamiento de los clones positivos para BamHI-210A de *B. bufo* obtenidos a partir de PCRs y de la banda de digestión del ADN genómico. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW, el procesamiento de las secuencias se ha realizado con BioEdit. Sobre las secuencias están marcadas las posiciones sobre las que hibridan los cebadores utilizados para amplificar BamHI-210A mediante PCR.

G+C (52.1%), algo que no es habitual en ADNs repetitivos, ya que la mayoría suelen ser ricos en A+T. Existen, sin embargo, casos con alto contenido en G+C entre los que cabe destacar los descritos en anfibios (Odierna *et al.* 2004); algo que no es de extrañar ya que, por lo general, este grupo de animales presenta alto contenido en G+C en su genoma (Jabbari *et al.* 1997; Varriale *et al.* 2006).

		2ª Posición Nucleotídica			
		C	G	T	A
1ª Posición Nucleotídica	C	10,7%	1,8%	6,6%	7,2%
	G	4,3%	9,9%	2,9%	8,4%
	T	6,8%	5,5%	8,2%	3,2%
	A	5,0%	7,8%	5,9%	5,8%

Tabla 32: Frecuencias di-nucleotídicas en secuencias de BamHI-210A de *B. bufo*.

Para comprobar si la PCR amplifica secuencias de forma selectiva se realizó el mismo tipo de análisis que con las secuencias BamHI-800. En este caso las secuencias se dividieron en 2 grupos:

A pesar de presentar un contenido ligeramente rico en GC, si se analizan las frecuencias de di-nucleótidos, si se analizan las frecuencias de di-nucleótidos, los más frecuentes son CC y GG, mientras los menos representados son CG, junto con GT y TA (Tabla 32).

RESULTADOS Y DISCUSION

procedentes de la banda de digestión y procedentes de PCRs en las que se empleó la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210A-F2/R2. Las distancias se calcularon con el programa MEGA, utilizando en este caso el modelo de 2 parámetros de Kimura con distribución gamma (Tabla 33).

Distancias genéticas medias en cada grupo			
Con cebadores		Sin cebadores F2/R2	
Banda 210A	0,107± 0,015	Banda 210A	0,127± 0,019
PCR 210A	0,147± 0,019	PCR 210A	0,202± 0,026
Distancias genéticas entre grupos			
Con cebadores		Sin cebadores F2/R2	
	Banda 210A		Banda 210A
PCR 210A	0,151± 0,018	PCR 210A	0,030± 0,004
Distancias genéticas netas entre grupos			
Con cebadores		Sin cebadores F2/R2	
	Banda 210A		Banda 210A
PCR 210A	0,024± 0,004	PCR 210A	0,029± 0,006

Tabla 33. Análisis de distancias genéticas entre las secuencias BamHI-210A de *B. bufo*, incluyendo o no las regiones correspondientes a los cebadores. Para el análisis de las distancias se han considerado dos grupos de secuencias: procedentes de la banda de digestión y procedentes de PCRs.

El análisis de las distancias genéticas muestra que existe una pequeña distancia neta entre los dos grupos considerados, tanto si se incluyen los cebadores (0,024), como si se eliminan (0,029). Sin embargo, en las distancias dentro de cada grupo

se observa que las secuencias procedentes de PCRs son precisamente las que muestran mayor distancia media dentro de su propio grupo. De hecho, las distancias netas entre grupos son prácticamente iguales. Teniendo esto en cuenta, podemos suponer que, al igual que ocurría con el ADN repetitivo BamHI-800, la PCR no selecciona ningún subtipo de secuencias.

Para analizar de forma sencilla si estas secuencias están agrupadas según el sexo o la localización geográfica de los individuos de las que proceden, se construyó un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura, con 10 categorías discretas de distribución gamma y teniendo en cuenta que puede haber posiciones evolutivamente invariables. La varianza se estimó mediante "Bootstrap" con 1000 réplicas. En el árbol obtenido no se observa la agrupación de las secuencias de ADN repetitivo BamHI-210A en función del sexo o el origen geográfico de las muestras de *B. bufo* (Figura 48). Estos resultados coinciden con los patrones de hibridación en "Southern-blots", que tampoco muestran diferencias significativas entre sexos o procedencia geográfica de las muestras (Figura 44).

RESULTADOS Y DISCUSION

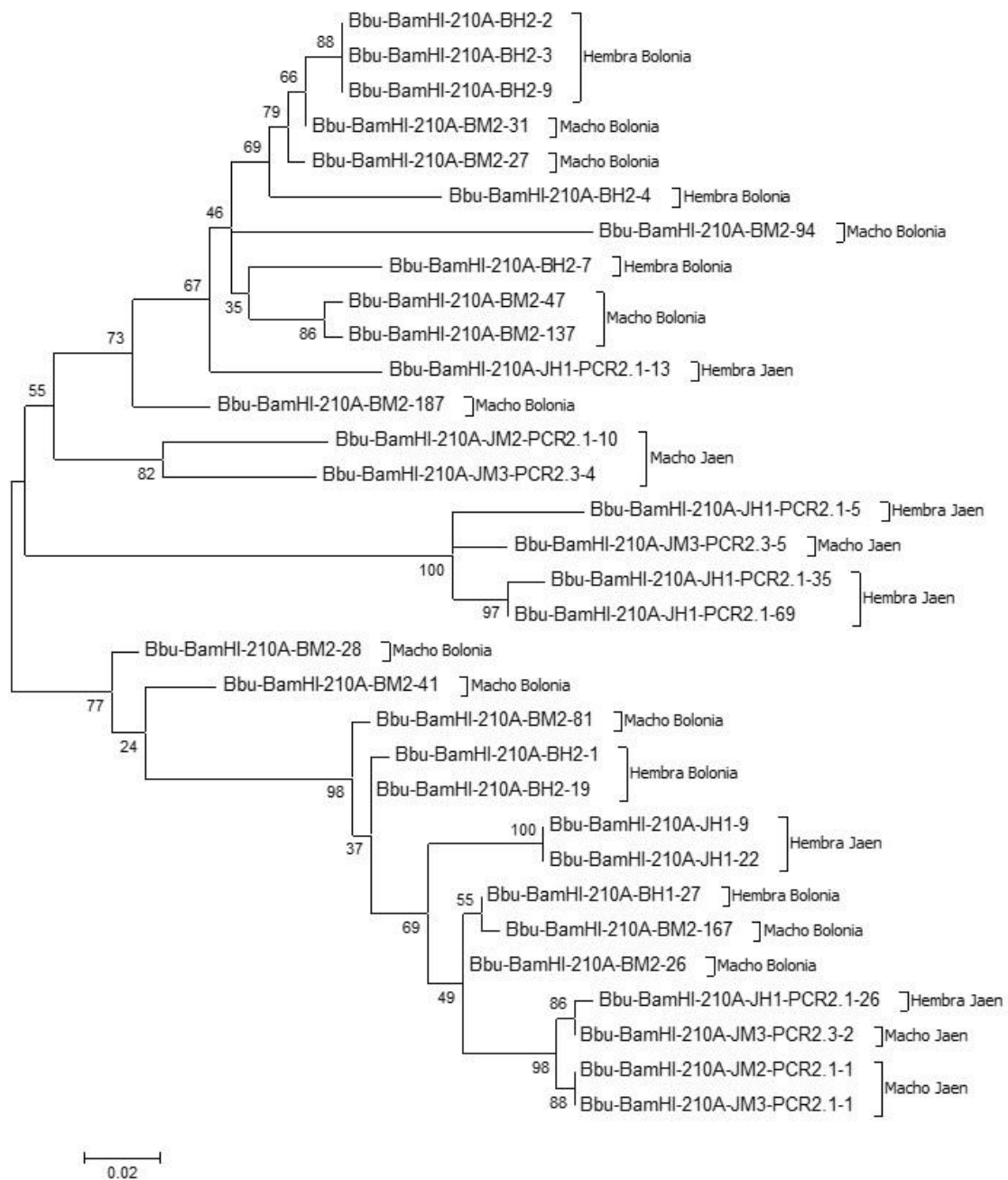


Figura 48. Filogenia de las secuencias BamHI-210 de *B. bufo* obtenidas en este trabajo. Las secuencias se encuentran marcadas en función del sexo y localización geográfica de procedencia.

Para comprobar si esta familia de ADN repetido está distribuida en tándem o si presenta algún tipo de organización más compleja, se clonaron las bandas de 420, 560 y 650 pb que se obtienen a partir de PCRs específicas con los cebadores Bbu.BamHI-210A-F2/R2. De cada banda de PCR se han obtenido 5 clones positivos (dan una fuerte señal de hibridación cuando el plásmido inmovilizado sobre una membrana de nailon se hibrida con una sonda de BamHI-210A).

RESULTADOS Y DISCUSION

De la secuenciación de estos clones positivos se obtuvo un dímero y un trímero del repetitivo BamHI-210A, que indican que estas secuencias pueden estar organizadas en tándem.

Además del dímero y el trímero, se obtuvieron tres clones que alinean al principio y al final de su secuencia con la unidad monomérica de BamHI-210A. La región central, sin embargo, no alinea con ninguna de las secuencias obtenidas hasta el momento y se le ha dado el nombre de BamHI-210A-inserto. El análisis citogenético y molecular de las secuencias BamHI-210A-inserto y la posible relación entre las secuencias BamHI-210A y BamHI-210A-inserto se incluye en el punto 0.

7.3. Análisis de la metilación de las secuencias BamHI-210A de *B. bufo*

Puesto que el ADN repetitivo BamHI-210A de *B. bufo* presenta un contenido ligeramente rico en G+C, resulta de interés saber si estas secuencias están metiladas. Para ello se buscaron dianas para parejas de isoesquizómeros sensibles e insensibles a la metilación que cortasen en las secuencias BamHI-210A. De las 32 secuencias analizadas, 20 contienen la secuencia 5'-C/CGG-3', que es reconocida por los enzimas *MspI* (insensible a la metilación) y *HpaII* (sensible a la metilación). La posición de esta diana no es la misma en todas las secuencias, por lo que pueden identificarse 6 tipos de secuencias BamHI-210A en función de los tamaños de los fragmentos obtenidos tras el corte (Figura 49).

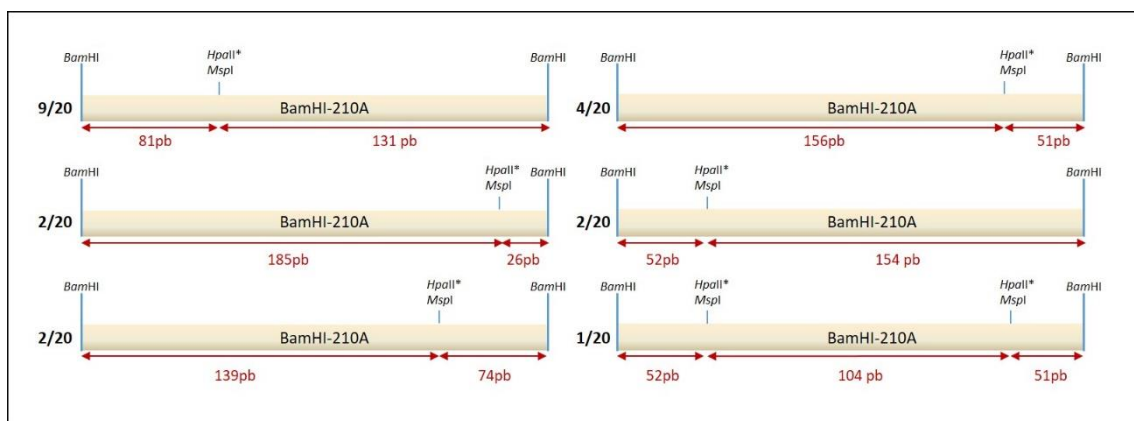


Figura 49. Mapa de restricción del fragmento BamHI-210A para los enzimas *BamHI*, *MspI* y *HpaII*. (*) sensible a la metilación.

El análisis de la metilación de las secuencias BamHI-210A se hizo, por tanto, digiriendo el ADN genómico de *B. bufo* con *MspI* y *HpaII*, y utilizando como control una digestión con *BamHI*. Las digestiones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa, se transfirieron a membranas de nailon, y se hibridaron con la sonda BamHI-210A (Figura 50). El resultado obtenido muestra que la digestión con *MspI* da un patrón de bandas similar al de *BamHI*, aunque con mayor número de bandas debido a la cantidad de fragmentos que se forman tras la digestión

RESULTADOS Y DISCUSION

con *MspI*. En la digestión con *HpaII*, sin embargo, apenas se aprecia la banda de 210 pb, y las bandas de 420 y 650 pb tienen menor intensidad. Las bandas de más de 1.000 pb, por el contrario, son más intensas si las comparamos con la digestión con *MspI*. Estos resultados indican que el ADN repetido BamHI-210A se encuentra parcialmente metilado en la diana 5´C/CGG 3´.

7.4. Localización cromosómica de las secuencias BamHI-210A en *B. bufo*

Para averiguar la distribución cromosómica de esta familia de ADN repetitivo se realizaron hibridaciones in situ fluorescentes sobre cromosomas metafásicos procedentes de individuos adultos de la especie *B. bufo* (Macho 2 de Jaén y Hembra 3 de Jaén). Como sonda se utilizó una de las secuencias BamHI-210A marcada con biotina, y no se realizó ninguna amplificación inmunológica de la señal. Los resultados obtenidos muestran un patrón similar en machos y hembras, e indican que el ADN repetitivo BamHI-210A se localiza en posiciones cromosómicas determinadas (Figura 51).

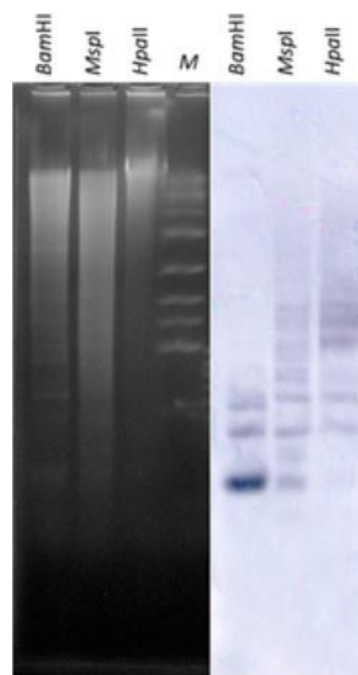


Figura 50. ADN genómico de *B. bufo* (BH2) digerido con los enzimas *HpaII** (sensible a metilación) *MspI* (insensible) y *BamHI*, junto al "Southern blot" de esta digestión hibridado con BamHI-210A.

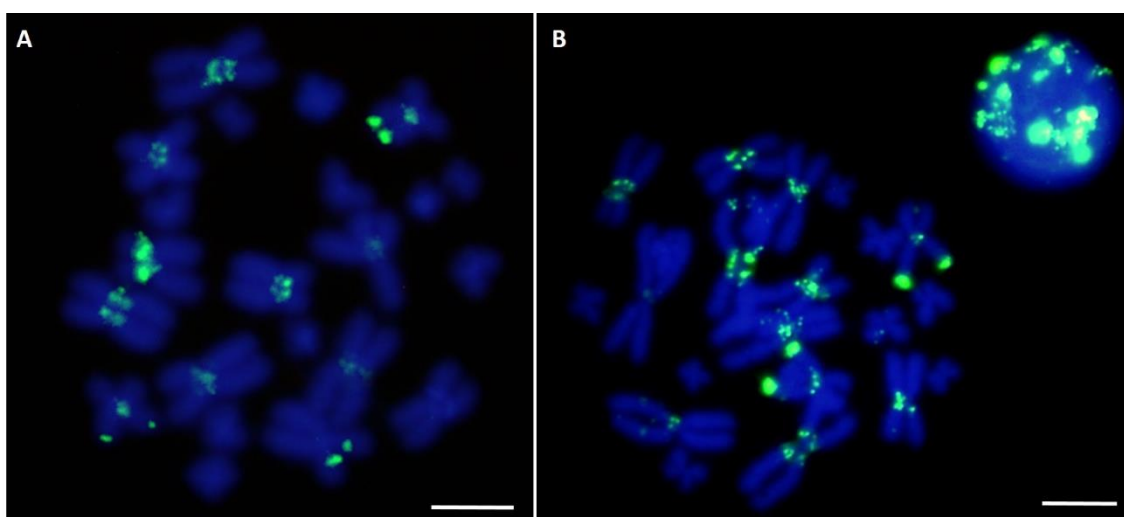


Figura 51. FISH sobre cromosomas metafásicos de individuos adultos de la especie *B. bufo*, utilizando como sonda la secuencia BamHI-210A. A: Macho 2 (Jaén). B: Hembra 3 (Jaén). Escala: 2,5 μ m.

RESULTADOS Y DISCUSION

Concretamente se observan señales positivas en posición centromérica y/o pericentromérica de todas las parejas de cromosomas grandes, y una señal muy intensa en posición terminal del brazo largo de la pareja 6.

Cuando la FISH se realiza sobre cromosomas metafásicos obtenidos a partir de cultivos celulares (permiten ver la señal con mayor claridad al estar los cromosomas menos condensados), y utilizando tres rondas de amplificación de la señal, los resultados obtenidos son similares (Figura 52).

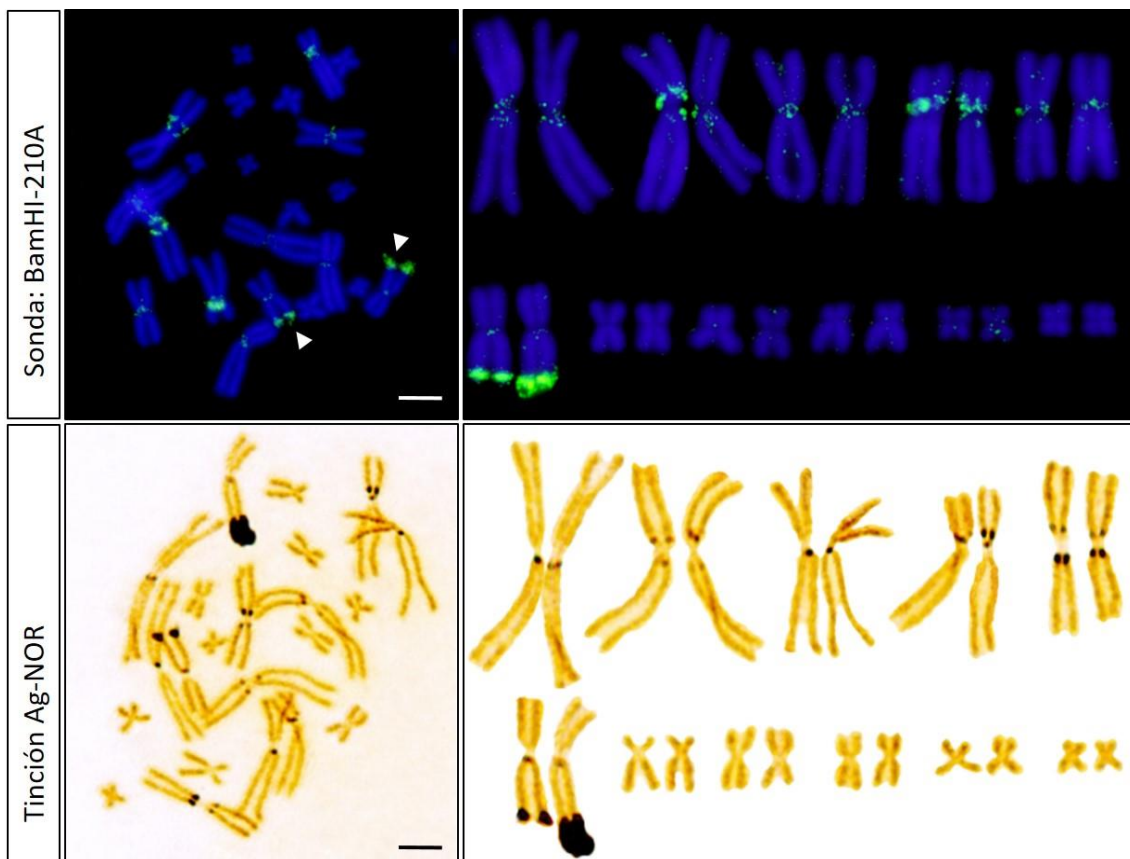


Figura 52. FISH sobre cromosomas obtenidos a partir de cultivos celulares de *B. bufo*, utilizando como sonda la secuencia BamHI-210A y el cariotipo correspondiente. Tinción Ag-NOR sobre cromosomas de *B. bufo* en la que puede verse señal en posiciones distintas a la NOR y cariotipo correspondiente. Escala 2,5 μ m.

Si los cromosomas se organizan por parejas, se puede observar que todas las parejas de cromosomas grandes presentan señal en posición pericentromérica. Además, la pareja 6 presenta señales intensas en posición terminal del brazo largo, en la misma posición en la que se localiza la constricción secundaria correspondiente a la NOR. Finalmente, los cromosomas pequeños no presentan señales para BamHI-210A, lo que no descarta que tengan bajo número de copias de estas secuencias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Si comparamos el cariotipo obtenido mediante FISH utilizando la sonda BamHI-210A y el obtenido mediante tinción Ag-NOR se puede observar que las señales no específicas que aparecen con la tinción Ag-NOR en *B. bufo* coinciden con las señales positivas en las que se localizan las secuencias BamHI-210A (Figura 52).

Como se comentó en el apartado 1.2, las señales Ag-positivas distintas de la NOR observadas en tinciones Ag-NOR se pueden originar por la unión del nitrato de plata a proteínas ácidas (no-histonas) similares a las presentes en la región NOR durante la fase transcripcional activa del ARNr. Estas señales positivas normalmente se localizan en el centrómero y, en *B. bufo*, coinciden con la localización de las secuencias BamHI-210A, sugiriendo que éstas puedan tener un papel importante en la estructura de la heterocromatina centromérica, quizás por su interacción con proteínas centroméricas.

Las señales intensas observadas en posición terminal del brazo largo de la pareja 6 coinciden con la localización de la NOR. Para comprobar si el ADN repetitivo BamHI-210A tiene alguna relación con el ADN ribosómico se realizó una FISH doble, marcando ambas sondas con fluorocromos distintos (Figura 53). Tras la hibridación doble se aprecia que las dos sondas se

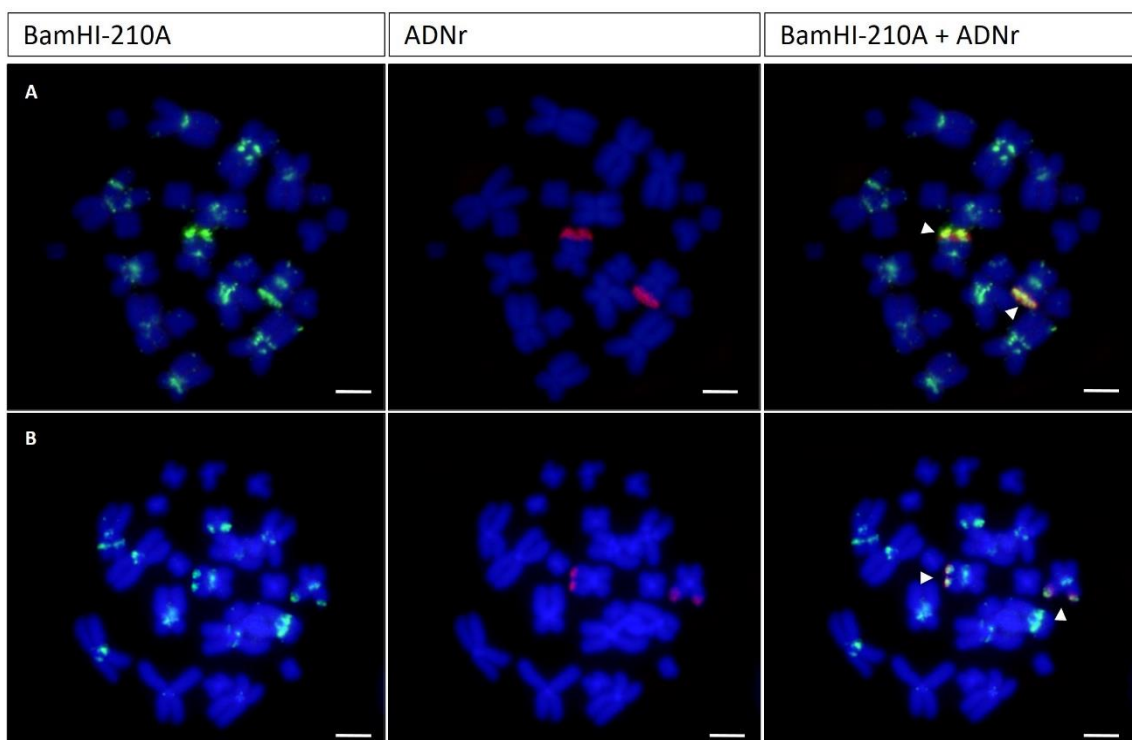


Figura 53. FISH doble sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo*. (A) Hembra 3 de Jaén; (B) Macho 2 de Jaén. La sonda BamHI-210A fue marcada con FITC (verde), mientras que la sonda de ADNr de *D. melanogaster* fue marcada con Spectrum Orange (rojo). Las flechas indican la posición de las NOR, que coinciden con las señales de BamHI-210A y ADNr. Escala 2,5 μ m.

RESULTADOS Y DISCUSION

solapan en la posición subterminal del brazo largo de la pareja 6, dando lugar a una señal de color amarillo (BamHI-210A marcada en verde y ADNr marcado en rojo).

Aunque esta técnica no tiene buena resolución, muestra que ambas señales coinciden en su posición. Estos resultados indican que BamHI-210A es, junto a BamHI-800, otra de las secuencias de ADN repetitivo presente en la heterocromatina localizada a ambos lados de la NOR de *B. bufo*. Para poder establecer una la relación más precisa entre estas dos familias de ADN repetido y los cistrones ribosómicos será necesario recurrir a técnicas como FISH sobre fibras cromosómicas.

Las secuencias BamHI-800 y BamHI-210A no presentan ningún tipo de homología y no se han obtenido clones que incluyan secuencias de ambos repetitivos al mismo tiempo. Sin embargo, el ADN repetitivo BamHI-800 se localiza en posiciones que, en ocasiones, pueden ser similares a las del ADN repetido BamHI-210A (regiones pericentroméricas de todas las parejas de cromosomas grandes). Para comprobar si existe alguna relación entre estas dos familias de ADN repetitivo se realizó una FISH doble utilizando una sonda frente a BamHI-800 marcada con FITC y otra frente a BamHI-210A marcada con Spectrum Orange (Figura 54).

Tras la FISH doble, se observa que ambos ADNs repetitivos presentan una localización próxima en posiciones centroméricas/pericentroméricas, aunque no parecen solaparse. Por otro lado, en la posición terminal de la pareja 6, donde se localiza la NOR, ambos repetitivos tampoco se solapan, estando BamHI-800 más próximo al telómero y BamHI-210A más distal de la posición subtelomérica.

Las diferencias en la longitud total del ADNr se producen por expansión o contracción de las regiones variables. Esto indica que las secuencias de los espaciadores son muy heterogéneas tanto en tamaño, como en secuencia nucleotídica o, incluso, en la estructura secundaria que forman. Esto no afecta a la estructura secundaria del transcrito final (ARNr) o a su función. Los espaciadores estudiados hasta el momento comparten varias características: alto contenido en G+C y presencia de secuencias de ADN repetido cortas en los espaciadores ETS y NTS. Estas secuencias de ADN repetitivo, además de estar asociadas a los genes ADNr también pueden encontrarse dispersas o en tándem en otras localizaciones del genoma, como la cromatina pericentromérica (Segal *et al.* 1976). El ADN repetido BamHI-210A cumple con dos de estas características: alto contenido en G+C, y su localización (coincide con ADNr y además se puede encontrar en otras regiones pericentroméricas). Sin embargo, no se han observado repeticiones internas (directas o invertidas, ni secuencias palíndromicas) dentro de estas secuencias. Para

RESULTADOS Y DISCUSION

determinar si el ADN repetido BamHI-210A presenta una relación estrecha con el ADNr serán necesarios más análisis en este sentido.

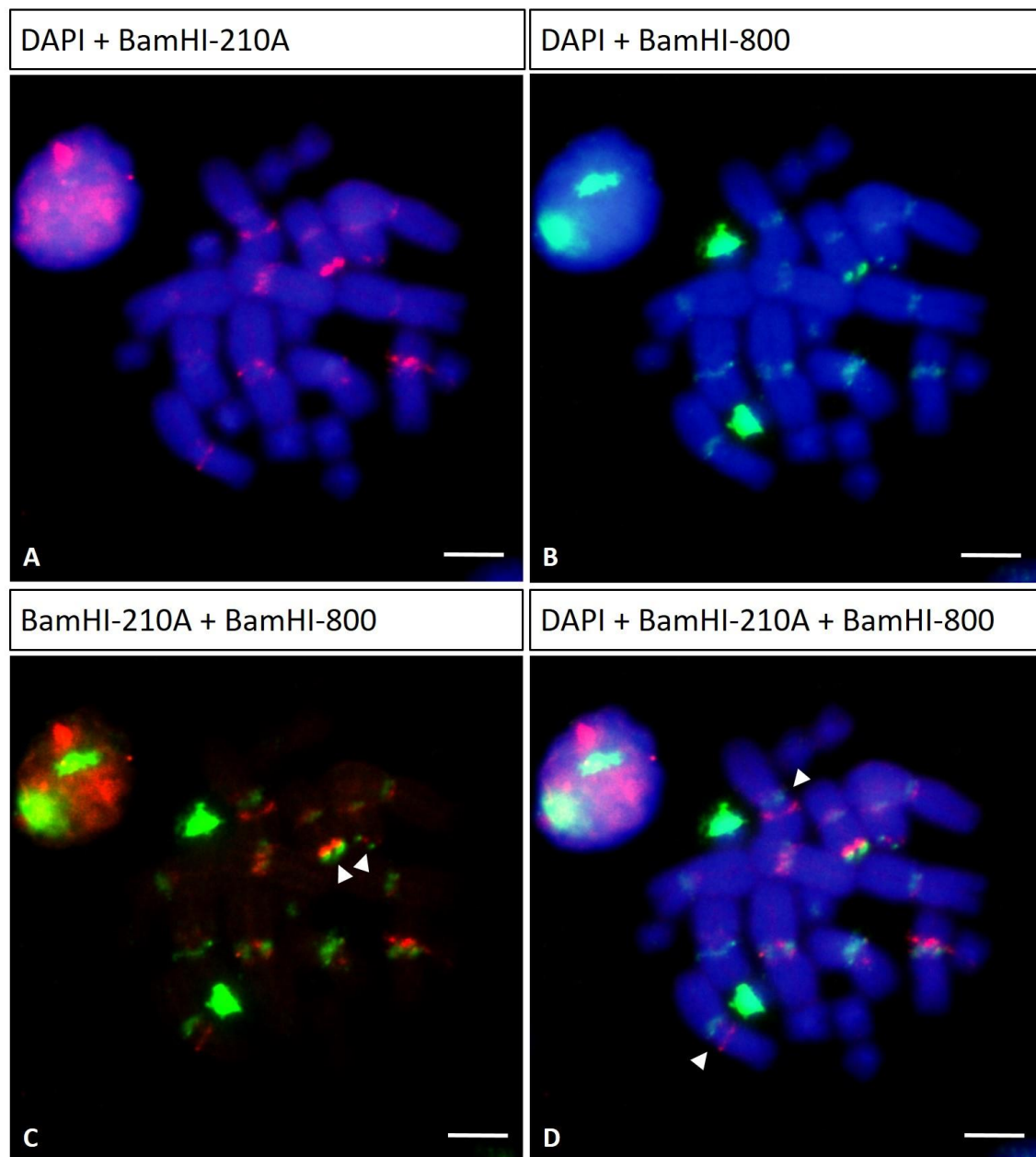


Figura 54. FISH doble sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo* (macho 2 de Jaén). A: Cromosomas teñidos con DAPI y sonda BamHI-210A marcada con Spectrum Orange. B: Cromosomas teñidos con DAPI y sonda BamHI-800 marcada con FITC. C: Sondas BamHI-210A y BamHI-800. Las flechas blancas indican las posiciones correspondientes a la constricción secundaria de la NOR. D: Cromosomas teñidos con DAPI en los que se muestra la señal de las sondas BamHI-210A y BamHI-800. Las flechas blancas indican algunas regiones en las que ambas señales aparecen próximas. Escala 2,5 μ m.

7.5. Patrones de hibridación de las secuencias BamHI-210A en *Epidalea calamita* y otras especies de la familia Bufonidae

La presencia del ADN repetitivo BamHI-210A en otras especies de la familia Bufonidae se analizó mediante “Southern-blot” y posterior hibridación con la sonda BamHI-210A, utilizando ADN genómico de *E. calamita* y *B. viridis* digerido con *Bam*HI (Figura 55A).

Los patrones de bandas observados en estas especies presentan diferencias con los de *B. bufo*. Así, aunque en todas las especies es posible identificar las bandas de 840 y 1.680 pb, las bandas de 210, 420 y 650 pb solo están presentes en *B. bufo*.

La ausencia de las tres bandas de menor tamaño podría estar relacionada con una menor cantidad del ADN repetitivo BamHI-210A en estas especies. Aunque este no parece ser el caso en *E. calamita*, ya que cuando se digieren cantidades mayores de ADN genómico en esta especie (5 a 20 µg), siempre se observa el mismo patrón de bandas: 840 y 1680 pb, pero ninguna banda menor que pueda ser equivalente a los monómeros, dímeros o trímeros del repetitivo BamHI-210A observados en *B. bufo* (Figura 55B).

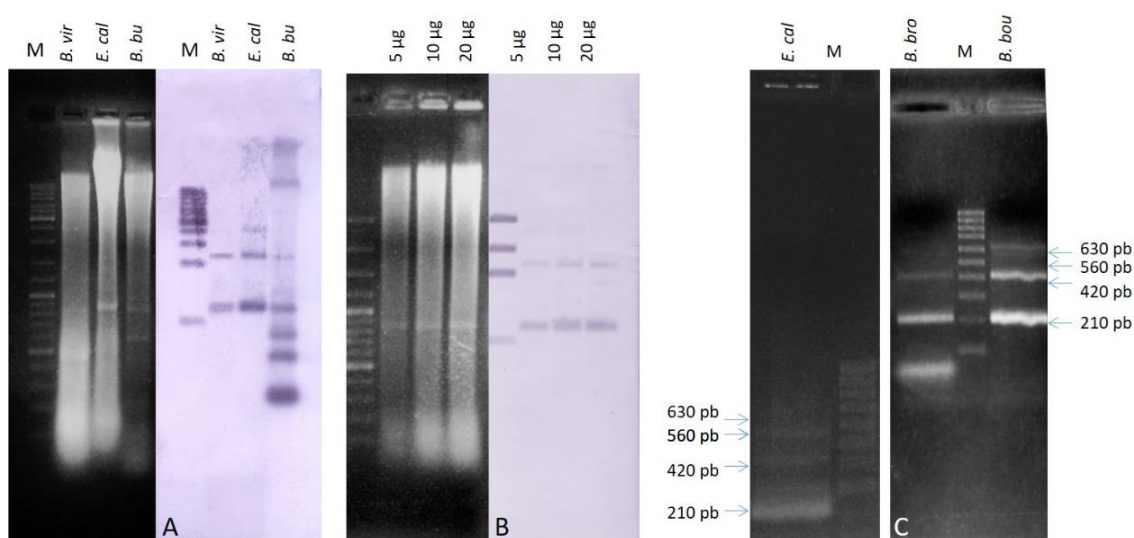


Figura 55. A: ADN genómico de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis* (10 µg) digerido con *Bam*HI, transferido a una membrana mediante “Southern-blot”, e hibridado con la sonda BamHI-210A de *B. bufo*. B: “Southern-blot” de distintas concentraciones de ADN genómico de *E. calamita* (5, 10 y 20 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con la sonda BamHI-210A. C: Electroforesis en el gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X de productos de PCR obtenidos con los cebadores Bbu.BamHI-210A-F2/R2 en *E. calamita*, *B. brongersmai* y *B. boulengeri*.

Estos resultados contrastan con los obtenidos mediante PCRs con los cebadores específicos Bbu.BamHI-210A-F2/R2 (Figura 55C). Con esta técnica, y contrariamente a lo que cabría esperar

RESULTADOS Y DISCUSION

según los patrones de hibridación, en la especie *E. calamita* se observa el mismo patrón de bandas que en *B. bufo*.

Resultados similares se obtienen en otras especies, como *B. brongersmai* y *B. boulengeri*, donde se observa un patrón de bandas exactamente igual al de *B. bufo* para el ADN repetitivo BamHI-210A.

7.6. Análisis de las secuencias BamHI-210A en *Epidalea calamita* y otras especies de la familia Bufonidae

Las bandas obtenidas tras la amplificación por PCR con los cebadores específicos Bbu.BamHI-210A-F2/R2 fueron clonadas y secuenciadas en las especies *E. calamita*, *B. brongersmai* y *B. boulengeri*. En total se han obtenido 62 clones procedentes de distintas PCRs (Tabla 34).

Nombre	Tamaño de banda	Nº de clones	Tamaño medio
<i>B. bufo</i>	210 pb	32*	211-213 pb
	420 pb	1*	412 pb
	650 pb	1*	620 pb
<i>Epidalea calamita</i>	210 pb	10	212-213 pb
<i>Barbarophryne brongersmai</i>	210 pb	8	212-213 pb
	420 pb	9	412-414 pb
<i>Bufotes boulengeri</i>	210 pb	19	212-213 pb
	420 pb	13	412-415 pb (1)
	650 pb	3	617-618 pb (2)

Tabla 34. Clones obtenidos a partir de bandas y productos de PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210A-F2/R2 en distintas especies de la familia Bufonidae. (1) Uno de los clones está incompleto en el extremo 3' (407 pb). (2) Uno de los clones presenta una delección de 35 pb al comienzo de su secuencia (584 pb). (*) clones de *B. bufo* mencionados en el apartado 7.2.

El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se adapta a las secuencias BamHI-210A es el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2+G) con distribución gamma (Tabla 35).

Modelo	Param	BIC	AICc	InL	Invariant	Gamma	R
K2+G	253	8363.000	6293.532	-2891.352	n/a	1.22	1.24

Tabla 35. Modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a las secuencias BamHI-210A. **Param**: número de parámetros utilizados; **BIC**: "Bayesian Information Criterion"; **AICc**: "Akaike Information Criterion corrected"; **InL**: logaritmo de la verosimilitud; **Invariant**: fracción de posiciones evolutivamente invariables; **Gamma**: distribución gamma discreta; **R**: tasa de transiciones/transversiones.

Considerando los clones de cada especie como grupos independientes, se han analizado los siguientes parámetros: tamaño medio, posiciones conservadas/variables y contenido en A+T. Además, utilizando el modelo K2+G, se ha calculado la tasa de transiciones/transversiones (R) y

RESULTADOS Y DISCUSION

el rango de similitud entre las secuencias basado en las distancias genéticas calculadas con el modelo de sustitución propuesto (Tabla 36).

Nombre	N	T	NC	NV		% A-T	R	% similitud
				I	SNP			
<i>Bufo bufo</i>	37	212 pb	106	64	43	47,9%	1,00	100-71,5%
<i>Epidalea calamita</i>	10	211 pb	173	31	9	47,1%	1,00	100-84,6%
<i>Bufoetes boulengeri</i>	54	211 pb	92	74	48	47,5%	1,00	100-77,4%
<i>Barbarophryne brongersami</i>	26	212 pb	128	59	26	47,3%	0,95	100-77,2%

Tabla 36. Análisis de secuencias BamHI-210A en distintas especies de la familia Bufonidae. **N**: número de secuencias analizadas en cada especie. **T**: tamaño medio de las secuencias. **NC**: Número de posiciones conservadas. **NV**: número de posiciones variables: **(I)** Informativas, **(SNP)** Polimorfismo de un solo nucleótido.

De este análisis se deduce que todas las secuencias tienen un tamaño medio similar (211-212 pb), alineando entre sí con un alto grado de similitud (100-71,5%) ([Material suplementario S7](#)). Todos los grupos de secuencias considerados tienen un contenido en A+T aproximadamente de un 47%. Estos valores confirman que las secuencias BamHI-210A tienen una composición ligeramente rica en G+C en todas las especies analizadas.

En relación al número de posiciones conservadas y variables, éste varía considerablemente en cada una de las especies analizadas, lo que probablemente esté relacionado con el número de secuencias analizadas en cada caso. De hecho, si se calcula el número de posiciones conservadas y variables para todas las secuencias, el número de posiciones conservadas disminuye (60 posiciones conservadas) mientras el número de sitios informativos aumenta (110).

Cuando se calculan las distancias dentro de cada grupo, las distancias entre grupos y las distancias netas, se observa que las distancias intraespecíficas son bastante similares, exceptuando las secuencias de *E. calamita*, para las que este parámetro es ligeramente inferior (Tabla 37).

Grupos	Distancia intraespecífica	Distancia interespecífica			Distancia interespecífica neta				
			Bbu	Ecal	Bbou		Bbu	Ecal	Bbou
<i>B. bufo</i>	0,129 ± 0,015								
<i>E. calamita</i>	0,089 ± 0,014	Ecal	0,111 ± 0,014			Ecal	0,002 ± 0,001		
<i>B. boulengeri</i>	0,114 ± 0,013	Bbou	0,126 ± 0,014	0,105 ± 0,014		Bbou	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,002	
<i>B. brongersmai</i>	0,125 ± 0,015	Bbro	0,132 ± 0,015	0,115 ± 0,014	0,120 ± 0,016	Bbro	0,005 ± 0,010	0,007 ± 0,002	0,001 ± 0,001

Tabla 37. Distancias genéticas intraespecíficas, interespecífica e interespecíficas netas entre secuencias BamHI-210A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Si se comparan las distancias interespecíficas, los valores son similares a los de las distancias intraespecíficas, algo corroborado por distancias netas próximas a 0 en todos los casos. Estos valores indican que las secuencias BamHI-210A, a diferencia de BamHI-800, presentan una distribución de variables monoméricas muy homogénea entre las 4 especies analizadas.

Con las secuencias analizadas se construyó un árbol filogenético que, al igual que las distancias, no mostró ninguna separación de las secuencias según la especie de la que proceden ([Material suplementario S8](#)). En el árbol se pueden observar dos grandes ramas, estando presentes en cada una de ellas las secuencias de las cuatro especies analizadas. Esto podría indicar que las secuencias son muy homogéneas, no solo dentro de cada especie. Estos resultados indican que, a diferencia de la familia de ADN repetido BamHI-800, las secuencias BamHI-210A no cumplen con una de las premisas principales de la evolución concertada. Es decir, su tasa de la homogeneización intraespecífica es igual que la tasa a la que aparecen mutaciones y, a la vez, igual que la tasa de fijación o divergencia interespecífica.

7.7. Localización de las secuencias BamHI-210A en *Epidalea calamita* y *Bufo viridis*

Para localizar el ADN repetido BamHI-210A sobre cromosomas metafásicos de las especies *E. calamita* y *B. viridis* se realizaron experimentos de FISH utilizando cromosomas procedentes de cultivos celulares y tres rondas de amplificación de la señal (Figura 56).

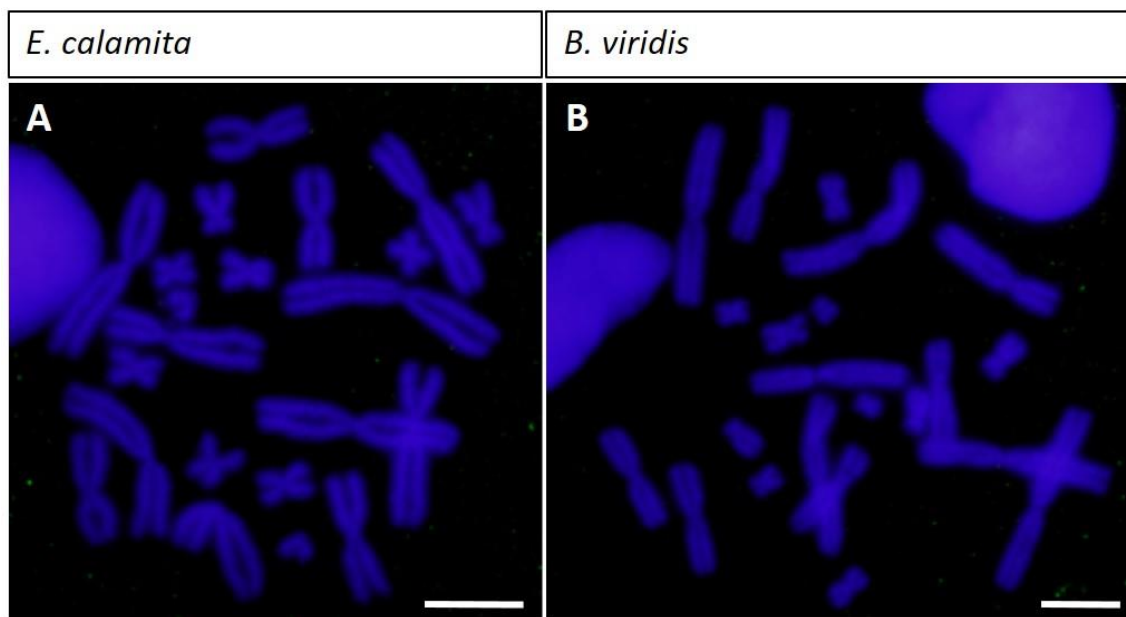


Figura 56. FISH sobre cromosomas metafásicos de *E. calamita* (A) y *B. viridis* (B), utilizando como sonda la secuencia BamHI-210A de la misma especie. Escala 2,5 μ m.

RESULTADOS Y DISCUSION

En ninguna de las especies se observa señal alguna de hibridación en ninguna pareja cromosómica, independientemente de si la sonda utilizada procedía de clones de *B. bufo* o de *E. calamita* (datos no mostrados). La ausencia de señal no descarta la presencia de ADN repetitivo BamHI-210A en estas especies, ya que tanto los resultados de “Southern-Blot” como los de PCR indican que estas secuencias están presentes en *E. calamita* y *B. viridis*. Tenido en cuenta que se trata de secuencias monoméricas cortas (210 pb) presentes en estas especies en forma de repeticiones de 840 y 1.260 pb; si estas secuencias estuvieran en bajo número de copias y/o dispersas a lo largo del genoma, sería posible que pasasen desapercibidas mediante FISH convencional. Para comprobar esta posibilidad, se estimó el número aproximado de copias de BamHI-210A en distintas especies.

7.8. Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-210A mediante “Dot-Blot” sobre ADN genómico

Para averiguar el número aproximado de copias del ADN repetitivo BamHI-210A, se realizó una hibridación sobre diluciones seriadas de muestras de ADN genómico de concentraciones conocidas procedentes de distintas especies de la familia Bufonidae. Para ello las muestras de ADN fueron desnaturalizadas, transferidas a una membrana de nailon (“Dot-Blot”), y finalmente hibridadas utilizando como sonda un clon BamHI-210A de *B. bufo*. Como control se utilizó un

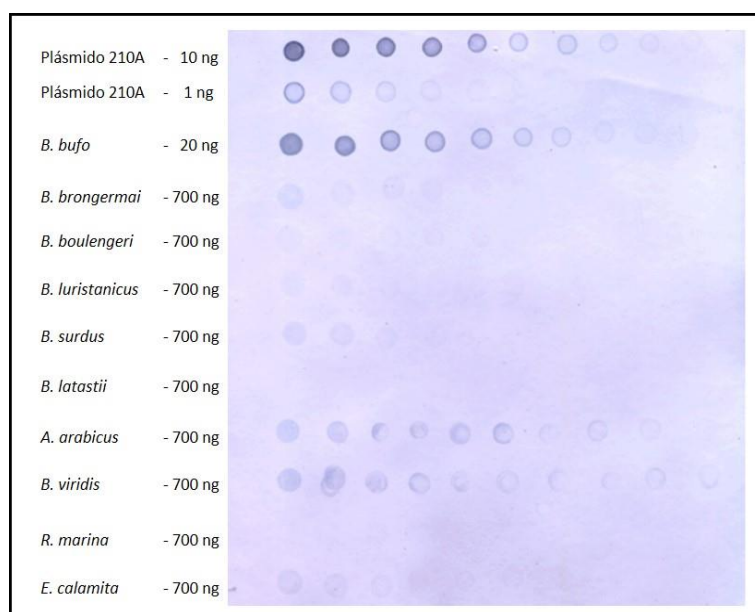


Figura 57. “Dot-Blot” de ADN genómico de distintas especies de la familia Bufonidae (*B. bufo*, *B. brongersmai*, *B. boulengeri*, *B. luristanicus*, *B. surdus*, *B. latastii*, *A. arabicus*, *B. viridis*, *R. marina* y *E. calamita*) hibridado con una sonda BamHI-210A. En todas las especies se partió de una concentración de ADN de 700 ng/ μ l, a excepción del ADN de *B. bufo*, con concentración de 20 ng/ μ l y del plásmido control BamHI-210A, con una concentración de 10 y 1 ng/ μ l.

plásmido con un inserto de BamHI-210A de *B. bufo* (Figura 57). Tras el revelado, en algunas de las muestras no se observó señal positiva alguna (*B. latastii* y *R. marina*).

A partir de la información disponible sobre la cantidad de ADN por núcleo en estas especies, se obtuvieron valores aproximados para el número de copias del ADN

RESULTADOS Y DISCUSION

BamHI-210A por núcleo diploide en aquellas especies en las que fue posible el cálculo (Tabla

Especie	Procedencia	Señal de	C-valor ADN	Nº copias/núcleo
<i>B. bufo</i>	España (Jaén)	5x10 ³ pg	6,03 pg/núcleo ¹	1,4 x 10 ¹⁰ copias
<i>B. brongersmai</i>	Marruecos	31,25 pg	5,7 pg/núcleo ²	2,3 x 10 ⁶ copias
<i>B. boulengeri</i>	Marruecos	15,625 pg	---	---
<i>B. luristanicus</i>	Irán	15,625 pg	---	---
<i>B. surdus</i>	Irán	31,25 pg	---	---
<i>B. latastii</i>	Pakistán	Ausente	8,00 pg/núcleo ²	---
<i>A. arabicus</i>	Yemen	250 pg	5,99 pg/núcleo ²	19,89 x 10 ⁶ copias
<i>B. viridis</i>	Grecia	250 pg	4,69 pg/núcleo ¹	15,50 x 10 ⁶ copias
<i>R. marina</i>	Australia	Ausente	4,22 pg/núcleo ¹	---
<i>E. calamita</i>	España (Jaén)	31,25 pg	4,16 pg/núcleo ¹	1,70 x 10 ⁶ copias

Tabla 38. Estimación del número de copias del ADN repetitivo BamHI-210A mediante "Dot-Blot". ¹Vinogradov (1998). ²Bachinann *et al.* (1978).

38).

Los resultados obtenidos indican que el número de copias presentes en *B. bufo* es cuatro órdenes de magnitud superior (10¹⁰) al del resto de especies en las que se observó señal de hibridación (10⁶), algo esperado si se tienen en cuenta los resultados de FISH sobre cromosomas metafásicos.

Se trata, por tanto, de un número considerable de copias (10⁶), que en las especies *E. calamita* y *B. viridis* no pueden ponerse de manifiesto mediante FISH. Estos resultados podrían indicar que el ADN repetitivo BamHI-210A está disperso en estas especies, ya que el pequeño tamaño de la unidad monomérica no se detecta mediante FISH.

8. ADN repetitivo BamHI-210A-inserto

8.1. Patrones de hibridación del ADN repetitivo BamHI-210A-inserto

La banda de 560 pb obtenida mediante PCRs específicas para amplificar el ADN repetitivo BamHI-210A en *B. bufo* está formada por fragmentos de unos 560 pb que alinean con los monómeros del ADN repetitivo BamHI-210A de tal forma que la secuencia del monómero queda dividida en dos por un inserto de unos 350 pb (Figura 59). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en *B. bufo* como en *B. boulengeri*, y en ambos casos el inserto presenta elevado porcentaje de similitud cuando se compara entre ambas especies. A esta secuencia de 350 pb se le dio el nombre de BamHI-210A-inserto.

Cuando el ADN genómico de *B. bufo* digerido con *Bam*HI se hibrida utilizando como sonda el fragmento BamHI-210A o el inserto de 350 pb (BamHI-210A-inserto), los patrones de bandas

RESULTADOS Y DISCUSION

Bbu-BamHI-210A-BH2-1	GGATCCGAGA	CTTGCAAGGA	TGGTAGAAGG	GGACTTGGGC	TCCAAGAGGA	GACCTCCAGC	CTGTCTGTAC	CATCTTCCTT	CCATGAATGG	CAGA-----	94	
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	94	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	99	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	99	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	99	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	100	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	100	
Bbu-BamHI-210A-BH2-1	94	
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	94	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	AAAGTCAGAT	TATGTTACCC	GATTTCCGTTG	CTCCTTTCCCT	GGGTAGACAT	TTCC-AAAAT	CACCCCTATT	TCTGTGGAAG	TCCTTTCCT	C	CAGTCGACAC	197
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	AAAGTCAGAT	TATGTTACCC	GATTTCCGTTG	CTCCTTTCCCT	GGGTAGACAT	TTCC-AAAAT	CACCCCTATT	TCTGTGGAAG	TCCTTTCCT	C	CAGTCGACAC	197
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	AAAGTCAGAT	TATGTTACCC	GATTTCCGTTG	CTCCTTTCCCT	GGGTAGACAT	TTCC-AAAAT	CACCCCTATT	TCTGTGGAAG	TCCTTTCCT	C	CAGTCGACAC	197
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	GAAATCAGAA	ATTCTTACCC	GCCTACGGTGT	CTCCGTTCCCT	GGGCAGACAT	TTCCAAAAAT	CCCCCTGAA	CCTGTGGAAG	TCCTTTCCT	C	CAGCCGTCAC	200
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	GAAATCAGAA	ATTCTTACCC	GCCTACGGTGT	CTCCGTTCCCT	GGGCAGACAT	TTCCAAAAAT	CCCCCTGAA	CCTGTGGAAG	TCCTTTCCT	C	CAGCCGTCAC	200
Bbu-BamHI-210A-BH2-1	94	
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	94	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	ACCGGATCTC	ATGGAACCTGA	TGGTGGGATC	AAARACACCT	GCCACCTCC	CGGGTCTCT	CTACCTTCTT	CCGGAGGTG	TCCAAAAGG	GGGACCCCTC	297	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	ACCGGATCTC	ATGGAACCTGA	TGGTGGGATC	AAARACACCT	GCCACCTCC	CGGGTCTCT	CTACCTTCTT	CCGGAGGTG	TCCAAAAGG	GGGACCCCTC	297	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	ACCGGATCTC	ATGGAACCTGA	TGGTGGGATC	AAARACACCT	GCCACCTCC	CGGGTCTCT	CTACCTTCTT	CCGGAGGTG	TCCAAAAGG	GGGACCCCTC	297	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	CTCGGATGTC	ATGGAACCTGA	TGGTGGGATC	AAARACACCT	GCCACCTCC	CAGGGTCTCT	CTACCTTCTT	CCGGAGGTG	TTGGAAGGG	GGGCCCTT	300	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	CTCGGATGTC	ATGGAACCTGA	TGGTGGGATC	AAARACACCT	GCCACCTCC	CAGGGTCTCT	CTACCTTCTT	CCGGAGGTG	TTGGAAGGG	GGGCCCTT	300	
Bbu-BamHI-210A-BH2-1	94	
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	94	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	TCGTGTCACA	TGACGCTGAG	ACCCAGGGGT	CTCGAGCCGT	CATGCCACG	CTCCGGTACT	GCTGTCGGTA	AGAGACAGCC	AGGTTCCGATC	TCATAGCTGG	397	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	TCGTGTCACA	TGACGCTGAG	ACCCAGGGGT	CTCGAGCCGT	CATGCCACG	CTCCGGTACT	GCTGTCGGTA	AGAGACAGCC	AGGTTCCGATC	TCATAGCTGG	397	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	TCGTGTCACA	TGACGCTGAG	ACCCAGGGGT	CTCGAGCCGT	CATGCCACG	CTCCGGTACT	GCTGTCGGTA	AGAGACAGCC	AGGTTCCGATC	TCATAGCTGG	397	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	TCGTGTCACA	TGACGCTGAG	ACCCAGGGGT	CTCGAGCCGT	CATGCCACG	CTCCGGTACT	GCTGTCGGTA	AGAGACAGCC	AGGTTCCGATC	TCATAGCTGG	400	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	TCGTGTCACA	TGACGCTGAG	ACCCAGGGGT	CTCGAGCCGT	CATGCCACG	CTCCGGTACT	GCTGTCGGTA	AGAGACAGCC	AGGTTCCGATC	TCATAGCTGG	400	
Bbu-BamHI-210A-BH2-1	141	
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	140	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	TTCTCTTTCT	CAAAACGGCC	AAACGGACAC	CCCTTATGAA	GTTGAGCCCG	GC.....	497	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	TTCTCTTTCT	CAAAACGGCC	AAACGGACAC	CCCTTATGAA	GTTGAGCCCG	GC.....	497	
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	TTCTCTTTCT	CAAAACGGCC	AAACGGACAC	CCCTTATGAA	GTTGAGCCCG	GC.....	497	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	TTCTCTTTCT	CAAAACGGCC	AAACGGACAC	ACTTATGAA	GTTGAGCTCG	GC.....	499	
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	TTCTCTTTCT	CAAAACGGCC	AAACGGACAC	ACTTATGAA	GTTGAGCTCG	GC.....	499	
Bbu-BamHI-210A-BH2-1	GATACATTTT	GCACAAAGTC	CCCCGAAATC	ATGGAAGTTC	AGCCACAGAG	CCTTCTTTCA	AGCTAGGGAT	CC	213			
Bbu-BamHI-210A-BH2-2	.GG..G....	T.....	...C.T..C.A	.A.C.A..GG	212			
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-2	569			
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-10	569			
Bbu-BamHI-210A-PCR3-3.4-11	569			
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-9	571			
Bbo-BamHI-650A-1-PCR2-14	571			

Figura 59. Alineamiento de las secuencias BamHI-210A de *B. bufo* y *B. boulengeri* obtenidas a partir de la banda de 560 pb de PCRs específicas para BamHI-210A con secuencias BamHI-210A procedentes de la banda de 210 pb obtenida tras la digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *BamHI*. El fragmento de 350 pb central constituye el ADN repetitivo BamHI-210A-inserto. El alineamiento se ha realizado con el programa ClustalW, y el procesamiento de las secuencias se ha realizado con BioEdit.

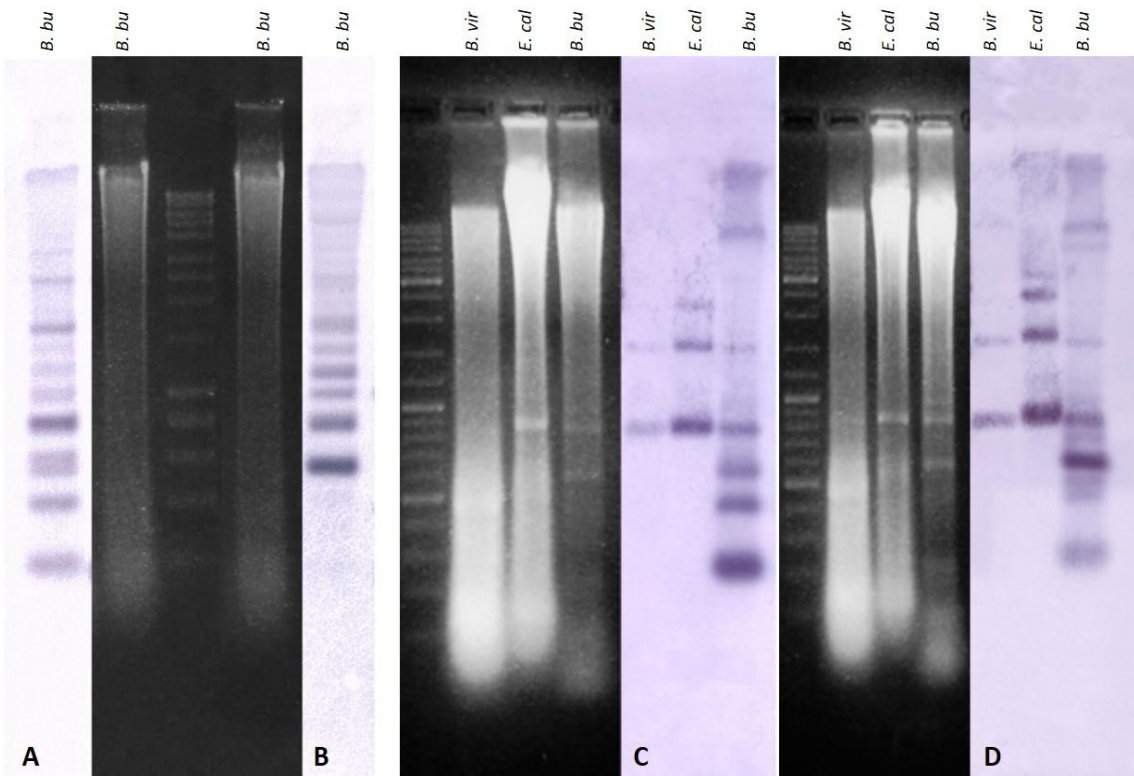


Figura 58. Patrón de hibridación del ADN de *B. bufo*, *B. viridis* y *E. calamita* digerido con *BamHI*, transferido a una membrana mediante "Southern-Blot", e hibridado utilizando como sonda las secuencias BamHI-210A (A y C) o BamHI-210A-inserto (B y D).

observados muestran algunas similitudes (Figura 58A y B). Así, con la sonda BamHI-210A se

RESULTADOS Y DISCUSION

observa el patrón de bandas ya mencionado, con bandas de 210, 420, 560, 650, 800 pb más intensas, y las bandas de más de 1kb se ven con menor intensidad. Cuando la sonda utilizada es BamHI-210A-inserto (fragmento de 350 pb encontrado dentro de BamHI-210A), la banda más baja que se observa es de 560 pb. Por otro lado, las bandas más altas tienen mayor intensidad que con la sonda de BamHI-210A.

Este tipo de análisis también se realizó con las especies *E. calamita* y *B. viridis*, utilizando la digestión de ADN genómico de *B. bufo* como control (Figura 58C y D). Como se puede apreciar, mientras que en la muestra control de *B. bufo* aparece el patrón de bandas de BamHI-210A y BamHI-210A-inserto, en *B. viridis* y *E. calamita* aparece el mismo patrón de bandas en ambos casos, pero distinto al de *B. bufo*. Así, aparecen bandas de 840, 1.680 y, en algunos casos, 2.520 pb aproximadamente, pero están ausentes todas las bandas de tamaños inferiores (Figura 58).

8.2. Clonación y análisis del ADN repetitivo BamHI-210A-inserto

Para comprobar qué organización presentan las secuencias BamHI-210A y BamHI-210A-inserto, se diseñaron oligonucleótidos específicos para BamHI-210A-inserto. De esta forma, si tenemos en cuenta los cebadores específicos que se habían diseñado para el repetitivo BamHI-210A (Figura 60B), el esquema de ambas secuencias con sus cebadores correspondientes queda como se muestra en la Figura 60A.

Con distintas combinaciones de cebadores específicos para BamHI-210A-inserto (Bbu.BamHI-210A-ins-F1/R y Bbu.BamHI-210A-ins-F2/R) se realizaron PCRs en las especies *B. bufo* y *B. boulengeri*. Con las dos parejas de cebadores se obtiene en ambas especies la banda correspondiente a BamHI-210A-inserto, de 350 pb aproximadamente en el primer caso y de 250 pb en el segundo. Además se observan otras bandas de mayor tamaño que podría indicar que estas secuencias están organizadas en tándem (Figura 60C).

Tanto las PCRs realizadas con parejas de cebadores específicos para BamHI-210A-inserto, como aquellas en las que éstos se combinan con cebadores específicos de BamHI-210A y BamHI-210A-inserto dan lugar a amplicones que indican que ambos repetitivos se encuentran relacionados en las especies de la familia Bufonidae en las que se probaron (Figura 62).

Los productos de estas PCRs fueron clonados y secuenciados, obteniéndose 22 clones de distintas especies que contenían, al menos en parte, regiones de BamHI-210A y BamHI-210A-inserto (Tabla 39).

RESULTADOS Y DISCUSION

Nombre	Tamaño	Nº de	Cebadores
<i>B. bufo</i>	350	1	Bbu.BamHI-210A-ins-F1/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
	470	4	Bbu.BamHI-210A-ins-F2/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
	650 ⁽¹⁾	3	Bbu.BamHI-210A-F2/ Bbu.BamHI-210A-R2
	850	3 ⁽²⁾	Bbu.BamHI-210A-ins-F1/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
<i>E. calamita</i>	470	1	Bbu.BamHI-210A-ins-F2/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
	560	2	Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/ Bbu.BamHI-210A-ins-Rint
	750	2	Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/ Bbu.BamHI-210A-ins-Rint
<i>B. luristanicus</i>	470	2	Bbu.BamHI-210A-F1/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
<i>B. surdus</i>	470	2	Bbu.BamHI-210A-F1/ Bbu.BamHI-210A-ins-R
<i>B. boulengeri</i>	650 ⁽¹⁾	2	Bbu.BamHI-210A-F2/ Bbu.BamHI-210A-R2

Tabla 39. Número de clones de BamHI-210A-inserto correspondientes a distintas bandas de PCR utilizando distintas parejas de cebadores en distintas especies de la familia Bufonidae. Debe tenerse en cuenta que algunos clones contienen dos secuencias BamHI-210A-inserto. (1) Clones obtenidos a partir de bandas de 650 pb amplificadas con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210A-F2/Bbu.BamHI-210A-R2 (=560 pb). (2) Uno de los 3 clones obtenidos estaba truncado en el extremo.

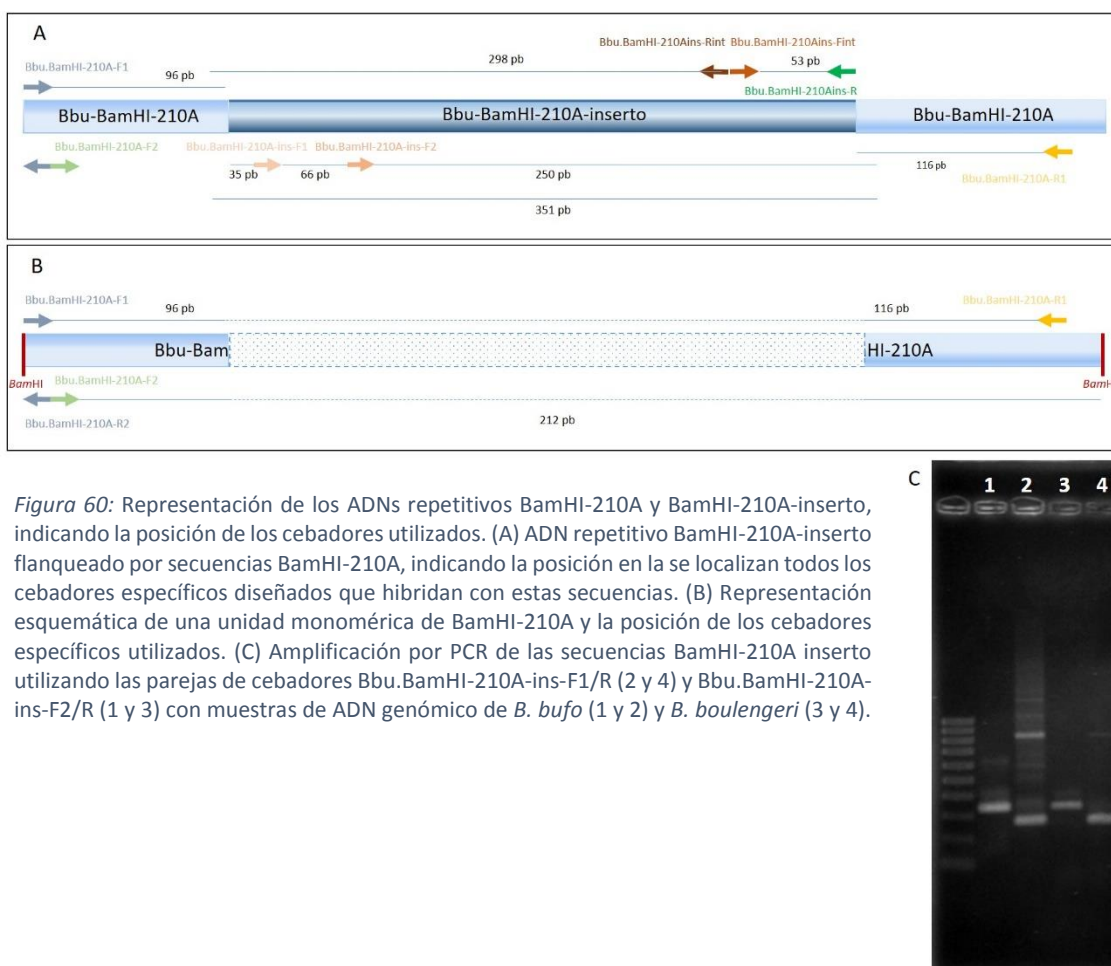


Figura 60: Representación de los ADNs repetitivos BamHI-210A y BamHI-210A-inserto, indicando la posición de los cebadores utilizados. (A) ADN repetitivo BamHI-210A-inserto flanqueado por secuencias BamHI-210A, indicando la posición en la se localizan todos los cebadores específicos diseñados que hibridan con estas secuencias. (B) Representación esquemática de una unidad monomérica de BamHI-210A y la posición de los cebadores específicos utilizados. (C) Amplificación por PCR de las secuencias BamHI-210A inserto utilizando las parejas de cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-F1/R (2 y 4) y Bbu.BamHI-210A-ins-F2/R (1 y 3) con muestras de ADN genómico de *B. bufo* (1 y 2) y *B. boulengeri* (3 y 4).

Además de secuencias correspondientes a BamHI-210A-inserto, se han obtenido 6 tipos de combinaciones diferentes de secuencias BamHI-210A y BamHI-210A-inserto en función de la pareja de cebadores utilizada y del tamaño del amplicón que se analice (Figura 61).

RESULTADOS Y DISCUSION

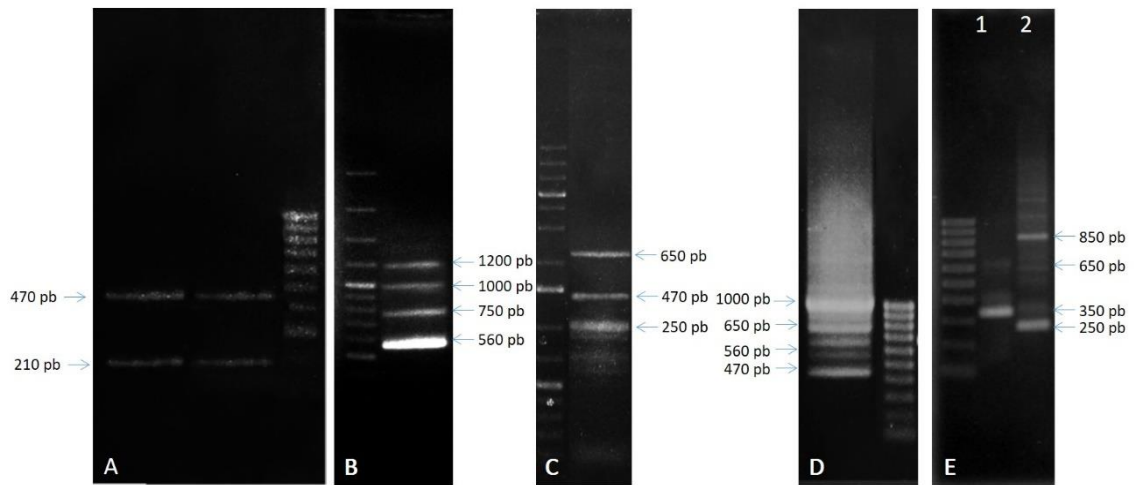


Figura 62. A: PCR específica con los cebadores Bbu.BamHI-210A-F1/Bbu.BamHI-210A-ins-R en las especies *B. luristanicus* y *B. surdus*. B: PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/Rint en la especie *E. calamita*. C: PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-F2/R en la especie *E. calamita*. D: PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-F2/R en la especie *B. bufo*. E: Detalle de la ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~

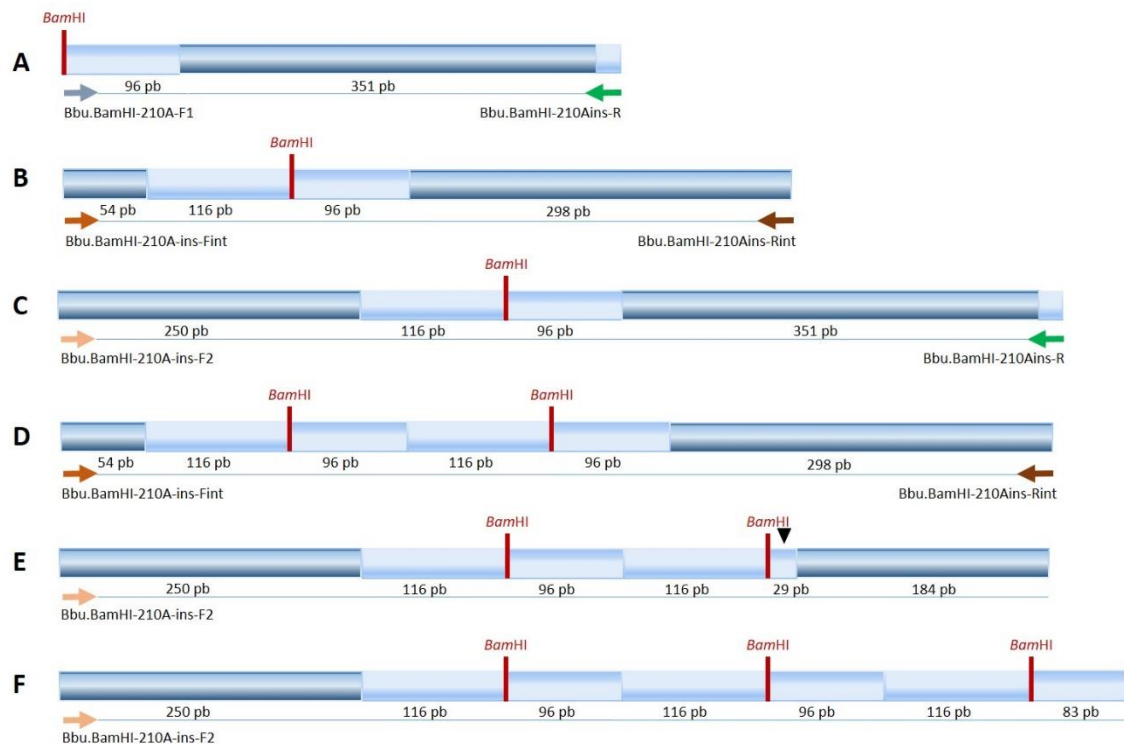


Figura 61. Tipos de clones obtenidos tras la clonación de amplicones a partir de productos de PCRs que combinan cebadores específicos de BamHI-210A y BamHI-210A-inserto. En azul claro se representan las regiones correspondientes a BamHI-210A, mientras que en azul oscuro se muestran las regiones correspondientes a BamHI-210A-inserto. La flecha negra indica la posición de una delección de 67 pb en el monómero BamHI-210A.

A partir de las bandas obtenidas con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210A-F1/ Bbu.BamHI-210A-ins-R (470 pb) se obtienen secuencias parciales de BamHI-210A interrumpidas por

RESULTADOS Y DISCUSION

secuencias completas de BamHI-210A-inserto (Figura 61A). Las bandas más altas obtenidas con las parejas de cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/Bbu.BamHI-210A-ins-Rint y Bbu.BamHI-210A-ins-F2/Bbu.BamHI-210A-ins-R (560 pb y 850 pb) presentan estructuras más complejas que incluyen clones con secuencias de BamHI-210A-inserto separadas por un monómero completo de BamHI-210A (Figura 61B y C). Los insertos de las bandas más altas obtenidas con las parejas de cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/Bbu.BamHI-210A-ins-Rint y Bbu.BamHI-210A-ins-F2/Bbu.BamHI-210A-ins-R (750 y 850 pb) presentan estructuras similares a los de la Figura 61B y Figura 61C, pero en estos casos son dos los monómeros de BamHI-210A flanqueados por secuencias BamHI-210A-inserto (Figura 61D y E), habiéndose encontrado un clon con tres monómeros completos de BamHI-210A precedidos por una secuencia BamHI-210A-inserto (Figura 61F).

Este tipo de organización de las secuencias BamHI-210A y BamHI-210-inserto permiten explicar los dímeros y trímeros observados en secuencias BamHI-210A (ver apartado 0), multímeros que no se han identificado al analizar clones que contienen secuencias BamHI-210-inserto.

La información obtenida del análisis de las secuencias BamHI-210 y BamHI-210-inserto indica que estos dos ADNs repetitivos podrían presentar una organización de orden superior (HOR: higher order repeats) en las especies analizadas (*B. bufo*, *E. calamita*, *B. boulengeri*, *B. luristanicus* y *B. surdus*), formada por combinaciones de BamHI-210A y BamHI-210A-inserto en distinto número de copias.

Cuando el producto de PCRs realizadas con los cebadores Bbu.BamHI-210A F1/R1 en varias especies (*B. boulengeri*, *B. brongersmai*, *E. calamita* y *B. bufo*) se hibrida con las sondas BamHI-210A y BamHI-210A-inserto, en ambos casos el patrón de bandas es similar, aunque la intensidad de las bandas es distinta (Figura 63). Cuando la sonda empleada es BamHI-210A, las bandas de menor tamaño (que comienzan desde 210 pb) tienen mayor intensidad. Si la sonda utilizada es BamHI-210A-inserto, en este caso la primera banda que aparece es la de 470 pb y la siguiente, mucho más intensa, la de 560 pb. Tenido en cuenta que la PCR se realizó con los cebadores específicos de BamHI-210A, esta banda de 560 pb se corresponde con la unidad completa de ambos repetitivos.

En relación a la estructura de este repetitivo en *B. viridis* y *E. calamita*, los patrones de hibridación en "Southern-blot" de ADN genómico digerido con *Bam*HI muestran la presencia de una banda de unos 840 pb, junto con otras que podrían ser dímeros (1680 pb) y trímeros de ésta (2.520 pb). Estos patrones de bandas podrían explicarse si tenemos en cuenta la estrecha relación entre las secuencias BamHI-210A y BamHI-210A-inserto. Así, en estas dos especies la

RESULTADOS Y DISCUSION

unidad que se repite podría estar formada por dímeros de BamHI-210A y monómeros de BamHI-210A-inserto (212 pb + 351 pb + 212 pb = 775 pb). Este tipo de secuencias no se han encontrado nunca entre los clones obtenidos a partir de la banda de 800 pb procedente de la digestión del ADN genómico de esta especie con *Bam*HI, pero es el tipo de organización de los clones procedentes del amplicón de 750 pb obtenido con los cebadores Bbu.BamHI-210A-ins-Fint/ Bbu.BamHI-210A-ins-Rint.

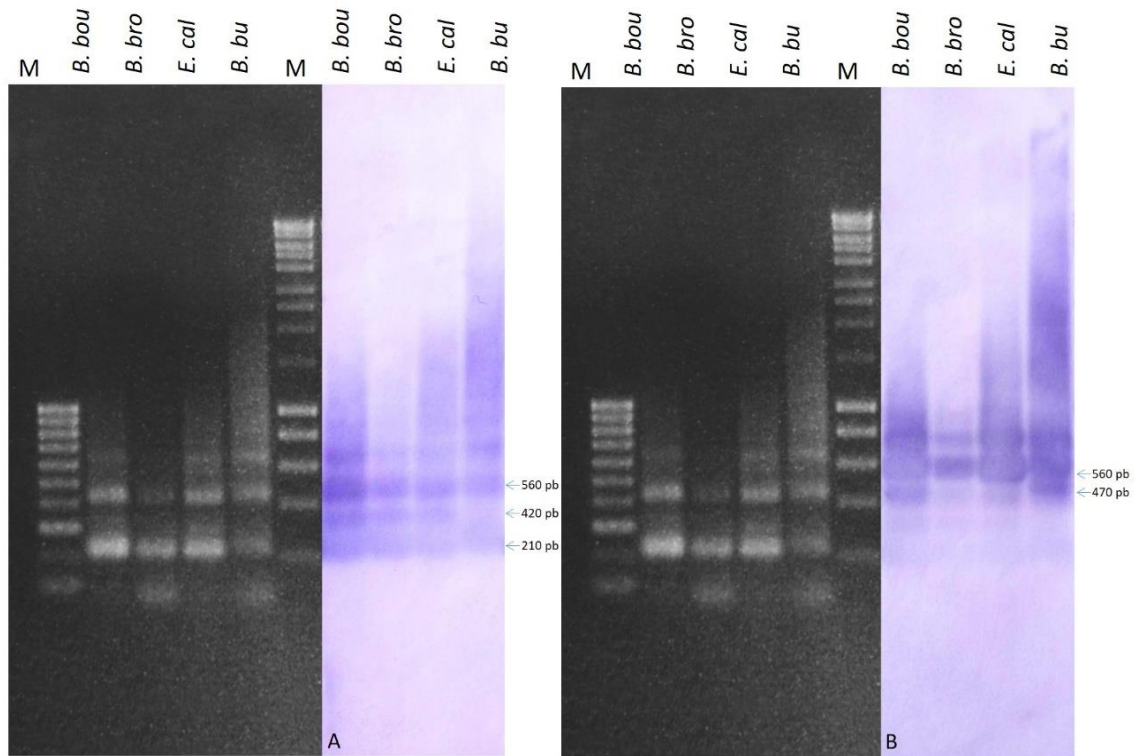


Figura 63. PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210A-F1/R1 en las especies de *B. boulengeri*, *B. brongersmai*, *E. calamita* y *B. bufo*, hibridada con las sondas: (A) sonda BamHI-210A; (B) sonda BamHI-210A-inserto.

8.3. Localización de las secuencias BamHI-210A-inserto en la familia Bufonidae

Cuando los cromosomas metafásicos de cultivos celulares de la especie de *B. bufo* se hibridan mediante FISH utilizando como sonda el fragmento de 351 pb de BamHI-210A-inserto se puede observar un patrón de señales muy similar al obtenido cuando se utiliza como sonda el ADN repetido BamHI-210A (Figura 64). De hecho, BamHI-210A-inserto, al igual que BamHI-210A, se localiza en posiciones centroméricas y pericentroméricas de todos los cromosomas grandes, y en la región en la que se encuentra la NOR (pareja 6).

En las especies *E. calamita* y *B. viridis* las FISH sobre cromosomas metafásicos no muestran señales evidentes independientemente de si la sonda utilizada es BamHI-210A o BamHI-210A-

RESULTADOS Y DISCUSION

inserto (Figura 65). Sin embargo, estos resultados no descartan la presencia de ambos repetitivos en estas dos especies, ya que su presencia ha sido probada mediante hibridación sobre membranas y PCR.

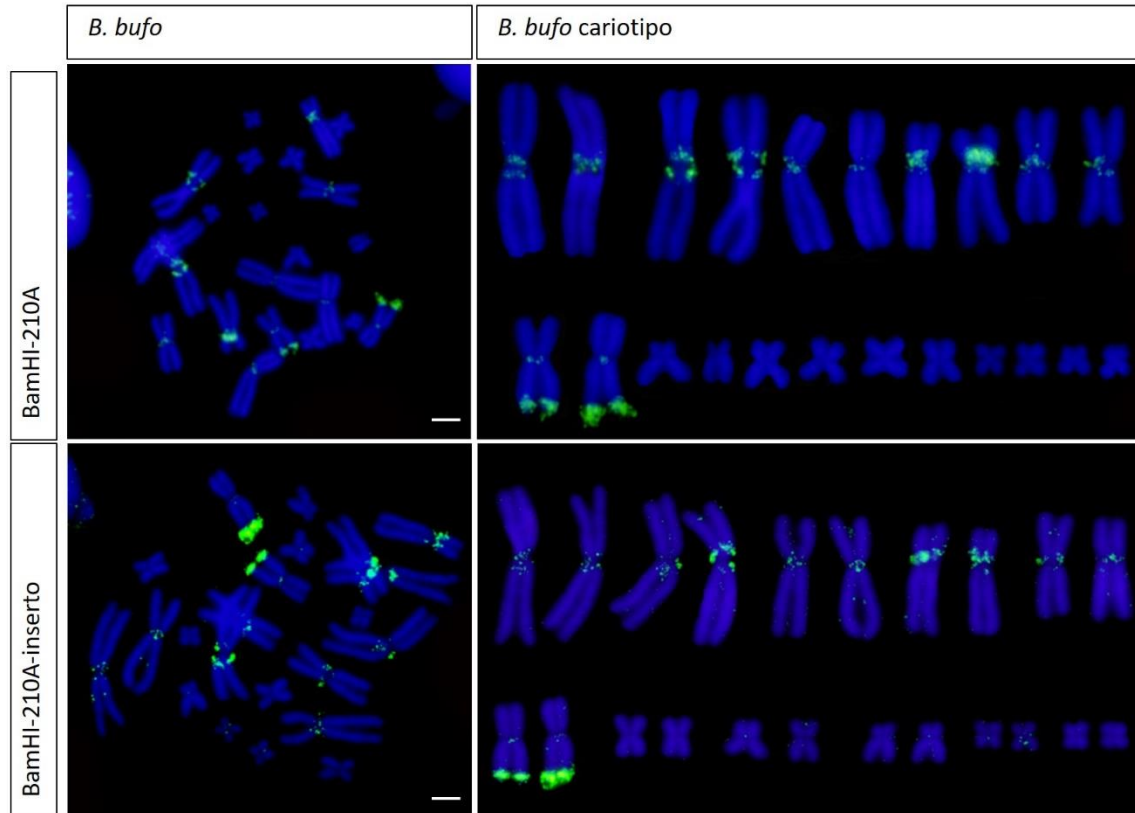


Figura 64. FISH para comparar en patrón de señales sobre cromosomas de *B. bufo* utilizando las sondas BamHI-210A (arriba) y BamHI-210A-inserto (abajo). Escala 2,5 μ m.

8.4. Análisis filogenético de las secuencias BamHI-210A-inserto

Todas las secuencias BamHI-210A-inserto obtenidas (24 clones en total procedentes de distintas especies) fueron alineados entre sí ([Material suplementario S9](#)). Debido a bajo número de secuencias disponibles de cada una de las especies analizadas (Tabla 39), el análisis de posiciones conservadas (289), sitios informativos (49) y SNP (15) se realizó para todas las secuencias en conjunto. De los resultados obtenidos se deduce que el ADN repetido BamHI-210A-inserto presenta un mayor número de posiciones conservadas: 81,87% (289 sobre el total de posiciones consideradas (353)), que el ADN repetido BamHI-210A, con un 27,78% de posiciones conservadas (60 posiciones conservadas sobre 216 consideradas). Estos datos indican que el mantenimiento de las posiciones nucleotídicas es muy importante en el ADN repetido BamHI-210A-inserto, mientras que en el ADN repetido BamHI-210A se conserva más el tamaño que las posiciones. La composición nucleotídica y la tasa de transiciones/transversiones (R) es similar para ambos ADNs repetidos (A+T= 47,5%; R=0.92).

RESULTADOS Y DISCUSION

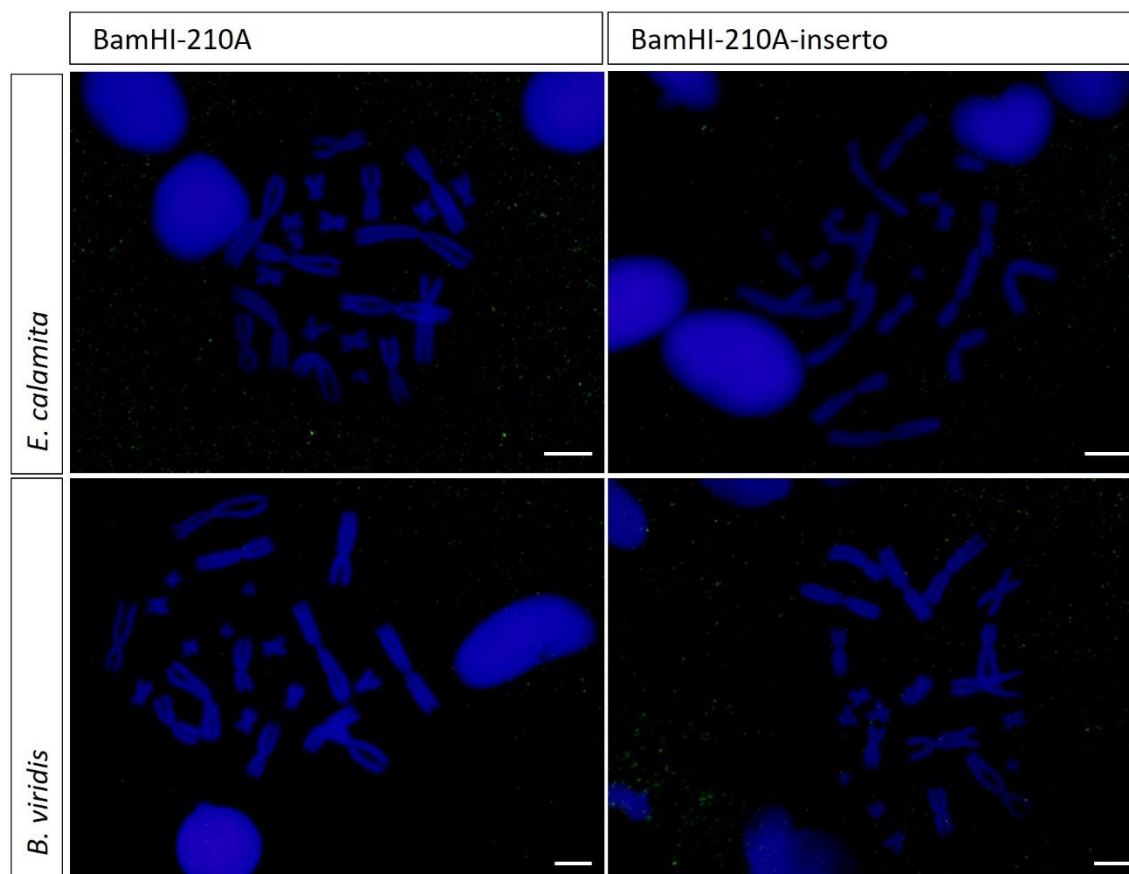


Figura 65. FISH sobre cromosomas metafásicos de *E. calamita* y *B. viridis*, con sondas BamHI-210A y BamHI-210A-inserto. Escala 2,5 μ m.

Los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a las secuencias de BamHI-210A-inserto son el modelo de Jukes-Cantor y el de 2 parámetros de Kimura, ambos con distribución gamma (Tabla 40). Aunque los valores de BIC y AICc son mejores para el modelo de Jukes-Cantor, se utilizó el modelo de 2 parámetros de Kimura porque éste es modelo de sustitución nucleotídica que se utilizó para el análisis de las secuencias BamHI-210A, y los valores de BIC, AICc y InL no son muy diferentes a los del otro modelo propuesto. En cualquier caso, los cálculos de distancias con ambos modelos no mostraron diferencias significativas (datos no mostrados).

Modelo	Param	BIC	AICc	InL	Invariant	Gamma	R
JC+G	46	1839.896	1534.345	-720.794	n/a	0.12	0.50
K2+G	47	1840.317	1528.140	-716.675	n/a	0.12	1.08

Tabla 40. Modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a las secuencias BamHI-210A. **Param**: número de parámetros utilizados; criterios para cálculo de modelo: **BIC**: Bayesian Information Criterion; **AICc**: Akaike Information Criterion corrected; **InL**: logaritmo de la verosimilitud; **Invariant**: fracción de posiciones evolutivamente invariables; **Gamma**: distribución gamma discreta; **R**: tasa de transiciones/transversiones.

Las distancias genéticas intraespecíficas entre secuencias BamHI-210A-inserto son menores que las interespecíficas, aunque debe tenerse en cuenta que, debido a bajo número de secuencias

RESULTADOS Y DISCUSION

empleadas en el análisis, el error estándar es elevado y las diferencias pueden no ser significativas (Tabla 41).

Grupos	Distancia intraespecífica	Distancia interespecífica					Distancia interespecífica neta				
		Bbu	Ecal	Blus	Bsur	Bbu	Ecal	Blus	Bsur		
<i>B. bufo</i>	0,052 ± 0,010										
<i>E. calamita</i>	0,029 ± 0,007	Ecal	0,060 ± 0,011				Ecal	0,019 ± 0,005			
<i>B. luristanicus</i>	0,050 ± 0,14	Blus	0,057 ± 0,010	0,066 ± 0,013			Blus	0,006 ± 0,007	0,026 ± 0,010		
<i>B. surdus</i>	0,000 ± 0,000	Bsur	0,055 ± 0,011	0,049 ± 0,012	0,038 ± 0,010		Bsur	0,028 ± 0,008	0,034 ± 0,011	0,012 ± 0,007	
<i>B. bolengeri</i>	0,000 ± 0,000	Bbou	0,047 ± 0,010	0,069 ± 0,015	0,040 ± 0,010	0,042 ± 0,013	Bbou	0,021 ± 0,006	0,055 ± 0,014	0,014 ± 0,007	0,042 ± 0,013

Tabla 41. Distancias genéticas intraespecíficas, interespecífica e interespecíficas netas entre secuencias BamHI-210A-inserto.

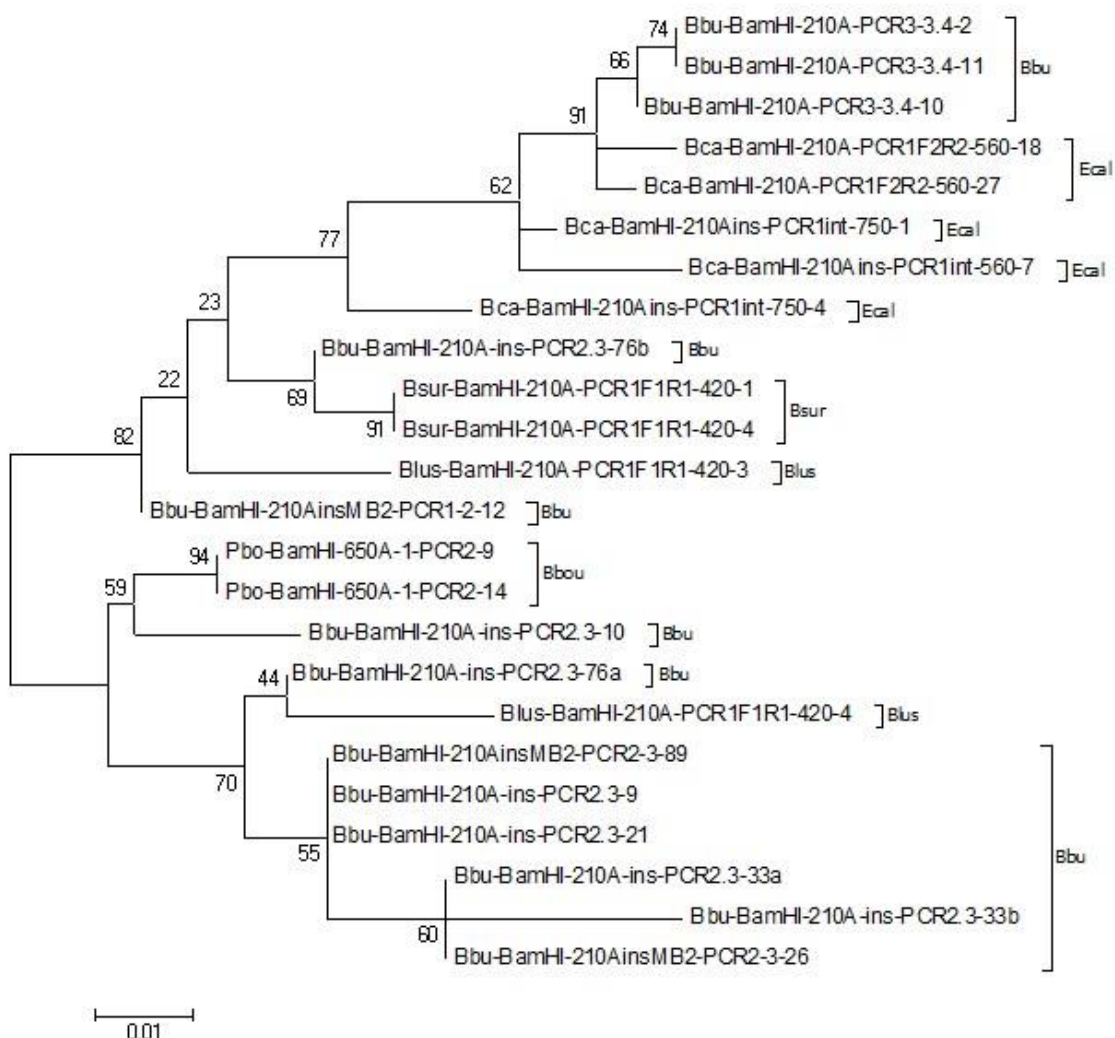


Figura 66. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para las secuencias BamHI-210A-inserto de la familia Bufonidae, que quedan divididas en dos ramas en función de las distancias genéticas. Las secuencias están marcadas según la especie de la que proceden.

9.1. Patrones de hibridación del ADN repetitivo BamHI-210B en *B. bufo*

Cuando se utiliza como sonda alguno de los clones positivos para BamHI-210B en experimentos de hibridación sobre ADN genómico de *B. bufo* digerido con *Bam*HI y transferido a una membrana de nailon, además de la banda esperada de aproximadamente 200 pb se observan otras bandas de 420, 600 y 950 pb. Estas bandas, a priori, no pueden explicarse por la repetición en tándem de una unidad monomérica de unos 200 pb (Figura 68A).

Para determinar la organización de las secuencias BamHI-210B, a partir de las secuencias disponibles se diseñaron cebadores específicos (Figura 69). La pareja de cebadores Bbu.BamHI-210B-F/R da lugar a la amplificación de numerosas bandas de 200, 300, 420, 450, 510, 600 pb, 800 pb y 1000 pb (Figura 68B).

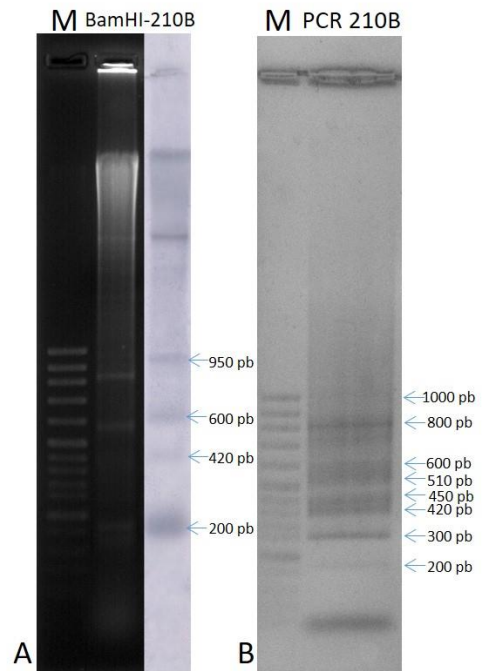


Figura 68. A: "Southern Blot" de ADN genómico de *B. bufo* (10 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con la sonda BamHI-210B. B: Electroforesis en el gel de agarosa al 1% del producto de amplificación por PCR BamHI-210B F/R sobre ADN genómico de *B. bufo*.

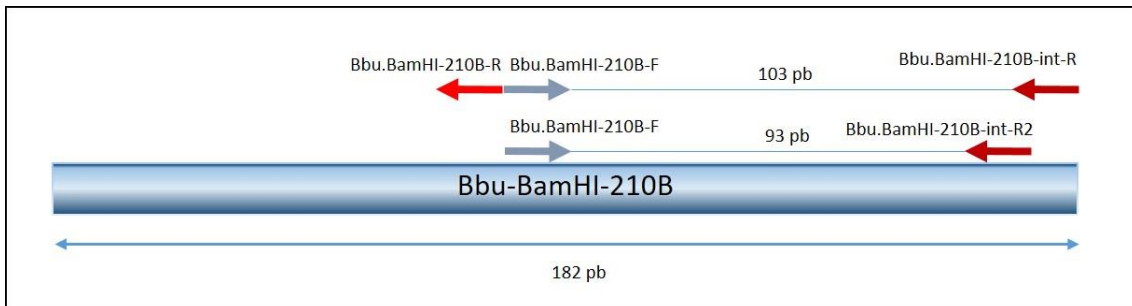


Figura 69. Localización de los cebadores utilizados para amplificar por PCR el ADN repetitivo BamHI-210B en la unidad monomérica de BamHI-210B.

Algunas de estas bandas se clonaron y los clones que mostraron señal positiva tras la hibridación con BamHI-210B se secuenciaron. De este modo se ha obtenido la secuencia de 40 clones procedentes de distintas bandas, con tamaños que oscilan entre 168 y 646 pb.

El alineamiento de estas secuencias ([Material suplementario S10](#)) revela que se trata, en todos los casos, de secuencias BamHI-210B completas o interrumpidas por inserciones de distintos tamaños en su parte central. La secuencia y la posición de las inserciones permiten diferenciar

RESULTADOS Y DISCUSION

distintos subgrupos de secuencias BamHI-210B que, a pesar de presentar un cierto grado de similitud en el alineamiento, no parecen estar relacionadas.

Teniendo en cuenta el alineamiento del [Material Suplementario S10](#), se han distinguido tres grandes grupos de secuencias BamHI-210B (Figura 70). El grupo I (Figura 70A) está formado por todas las secuencias cortas procedentes de la banda de 210 pb observada tras la digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI (secuencias BamHI-210B de la Tabla 31). También se incluyen en este grupo algunas secuencias obtenidas a partir de PCRs específicas para BamHI-210B.

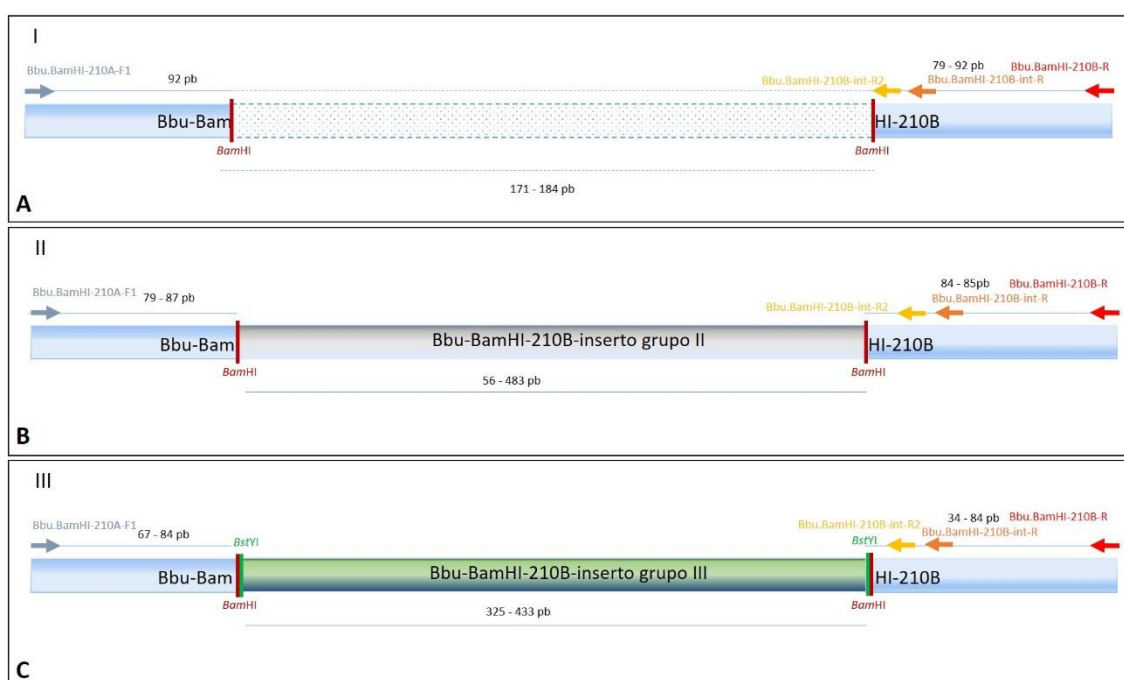


Figura 70. Estructura de los tres grupos de secuencias BamHI-210B obtenidos tras la clonación de productos de PCRs realizadas con los cebadores BamHI-210B-F1/R. En azul claro se representan secuencias correspondientes a BamHI-210B (A), mientras que las inserciones se han representado en gris o verde dependiendo del grupo al que pertenecen las secuencias (gris para el grupo II (B) y verde para el grupo III (C)).

El grupo III (Figura 70C) reúne a las secuencias que alinean en sus extremos con las secuencias del grupo I, pero que se diferencian de éstas por la presencia de un inserto, diferente al de las secuencias del grupo II. Estas secuencias se han obtenido a partir de amplicones de mayor tamaño obtenidos de PCRs específicas para BamHI-210B, y las variaciones en su tamaño se deben a delecciones/inserciones en distintas posiciones de las secuencias. Finalmente, el grupo II (Figura 70B) incluye al resto de las secuencias que solo alinean en los extremos con los grupos I y III. Es decir, estas secuencias presentan en sus extremos secuencias BamHI-210B y en la parte central una inserción de tamaño muy variable (56 – 483 pb), que no presenta homología ni entre

RESULTADOS Y DISCUSION

secuencias de este grupo, ni con secuencias de los otros dos grupos. Este es el grupo más diverso, que no permite obtener valores de análisis fiables, ya que solo permite analizar un pequeño número de posiciones presentes en todas las secuencias.

Debido a la gran variación observada entre las secuencias BamHI-210B obtenidas, que solo alinean en los extremos, cada grupo se ha analizado por separado (Tabla 42). Los grupos I y III presentan un contenido ligeramente rico en G+C, y un rango de similitud entre las secuencias que oscila entre 100 y 80 % (BamHI-210B grupo I), o entre 100 y 91 % (BamHI-210B grupo III). Ambos grupos presentan una tasa de transiciones/transversiones (R) superior a 1, que indica una desviación hacia las transiciones.

Nombre	N	Tamaño	NC	NV		% A-T	R	% similitud
				I	SNP			
BamHI_210B Grupo I	11	168-181 pb	120	32	24	48,6%	1.13	100,0-80,9%
BamHI_210B Grupo II*	14	219-646 pb	356	173	86	51,0%	1.38	100,0-71,4%
BamHI_210B Grupo III	15	452-540 pb	481	29	26	43,9%	1.53	100,0-91,0%

Tabla 42. Análisis de los clones obtenidos tras la clonación de diferentes bandas de PCRs específicas de BamHI-210B en la especie *B. bufo*. Los clones fueron agrupados en función de sus secuencias. (*) El grupo II presenta todas las secuencias que no están incluidas en los grupos I o III. Debido a la gran diferencia en el tamaño que presentan las secuencias de este grupo, los valores de A+T, R y el % de similitud están calculados en función de los 160 pb que comparten todas las secuencias. NC: número de sitios conservados; NV: número de sitios variables; I: número de posiciones informativas; SNP: número de "Single Nucleotide Polymorphisms"

Las secuencias BamHI-210B del grupo III presentan dianas para el enzima de restricción *BstYI* que flanquean el fragmento insertado en BamHI-210B (375 pb aproximadamente dependiendo del clon) y permiten su aislamiento. El clon Bbu.210B-560-PCR1.5-5 (grupo III) se cortó con el enzima *BstYI*, y la banda correspondiente al inserto III se purificó a partir del gel de agarosa, se marcó mediante "random primer" con digoxigenina y se utilizó como sonda en experimentos de hibridación sobre ADN genómico de *B. bufo* digerido con *BstYI* o *BamHI*. El patrón de bandas obtenido es similar para ambas enzimas, salvo por la presencia de algunas bandas extra observadas con *BamHI*, y muestra fragmentos de tamaños difíciles de explicar mediante una organización en tándem simple (Figura 71).

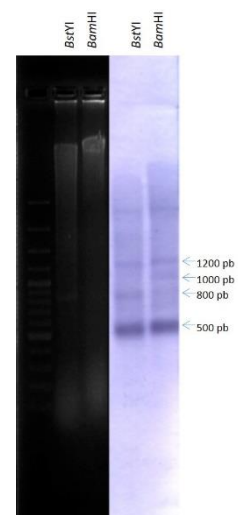


Figura 71. "Southern Blot" de ADN genómico de *B. bufo* digerido con *BstYI* o *BamHI*. La sonda utilizada procede del inserto de secuencias BamHI-210B del grupo III.

9.2. Localización de las secuencias BamHI-210B en *B. bufo*

Mediante FISH sobre cromosomas metafásicos se ha analizado la localización de las secuencias BamHI-210B (177) pb, correspondientes a la región en la que alinean los tres grupos y la del inserto localizado en las secuencias BamHI-210B del grupo III (375 pb). Para ello se han utilizado cromosomas metafásicos de la especie *B. bufo*, realizando tres rondas de ampliación de la señal en cada caso (Figura 72). Como se puede apreciar, las secuencias BamHI-210B del grupo I y el inserto del grupo III muestran señales de hibridación sobre los cromosomas de *B. bufo*, con un patrón disperso en todas las parejas cromosómicas.

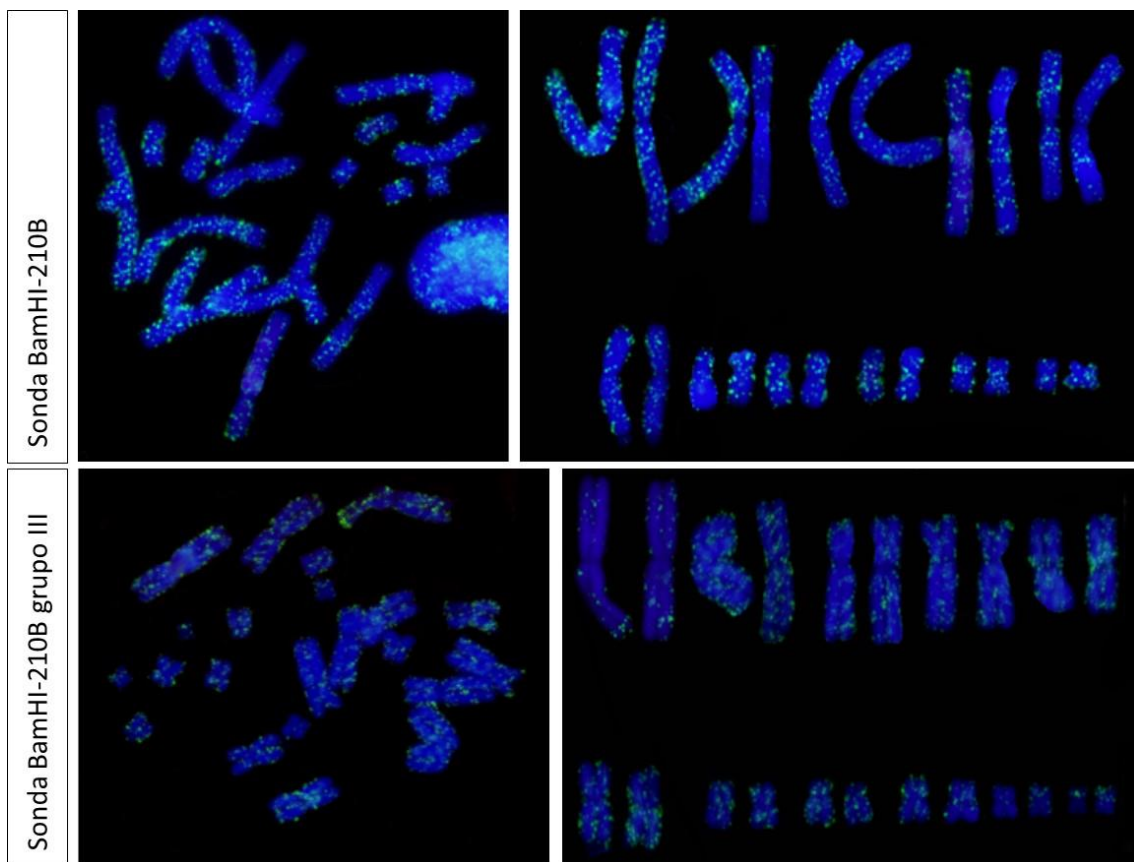


Figura 72. FISH sobre cromosomas de *B. bufo* utilizando las sondas BamHI-210B (arriba) y BamHI-210B_grupo III (abajo). Escala 2,5 μ m.

9.3. Análisis de las secuencias BamHI-210B en otras especies de la familia Bufonidae

Utilizando los cebadores Bbu.BamHI-210B-F1 y Bbu.BamHI-210B-R se realizaron PCRs en las especies *E. calamita*, *B. viridis*, *B. boulengeri* y *B. brongersmai*, utilizando como control la especie *B. bufo*. En todas las especies se obtuvieron productos de PCR de distintos tamaños. Sin embargo, tras su transferencia a una membrana de nailon y posterior hibridación con la sonda

RESULTADOS Y DISCUSION

BamHI-210B (grupo I) se observa que solo aparecen bandas en *B. viridis*, *B. boulengeri* y *B. brongersmai*, pero no en *E. calamita* (Figura 73A).

Si el producto de PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R se hibrida con la sonda correspondiente al inserto de las secuencias BamHI-210B del grupo III (Figura 73B) ocurre lo mismo. Los productos de PCR de *E. calamita* no dan señal positiva tras la hibridación, mientras que en las especies *B. viridis*, *B. boulengeri* y *B. brongersmai* los patrones son similares a los obtenidos con la sonda BamHI-210B. Estos patrones indican que las secuencias del grupo I y las del grupo III están presentes en estas especies y relacionadas entre sí.

Por otro lado, en las especies *B. siculus* y *B. balearicus* los productos de PCR y los patrones de bandas son idénticos, lo que indica que en estas especies las secuencias BamHI-210B del grupo I y III presentan una organización similar.

En *E. calamita*, a pesar de obtenerse productos de PCR de distintos tamaños, éstos no hibridan con la sonda BamHI-210B o con el inserto de BamHI-210B del grupo III. Resultados similares se observan cuando la sonda BamHI-210B se hibrida con ADN genómico de *E. calamita* digerido con *Bam*HI y transferido a una membrana de nailon, donde tampoco se observan bandas de hibridación (Figura 73B). Estos resultados confirman que las secuencias BamHI-210B no están presentes en *E. calamita*.

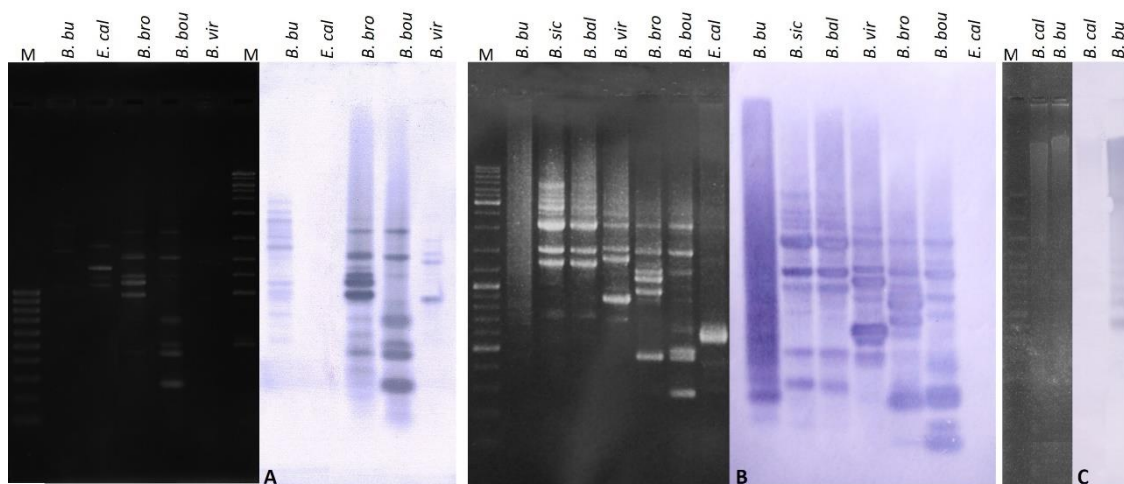


Figura 73. A: PCR con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R en las especies *B. bufo*, *E. calamita*, *B. viridis*, *B. boulengeri* y *B. brongersmai*, y "Southern-Blot" de la PCR anterior hibridado con la sonda BamHI-210B. B: Producto de PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R en las especies *B. bufo*, *B. siculus*, *B. balearicus*, *B. viridis*, *B. brongersmai*, *B. boulengeri* y *E. calamita* y "Southern-blot" de la PCR anterior hibridado con una sonda obtenida a partir del inserto de secuencias BamHI-210B del grupo III. C: ADN genómico de *E. calamita* (10 ug) y *B. bufo* digerido con *Bam*HI, y "Southern-Blot" de la digestión anterior hibridado con la sonda BamHI-210B.

En *B. viridis*, *B. boulengeri* y *B. brongersmai* los productos de PCR hibridan dando un patrón de bandas diferente en cada especie. En *B. brongersmai* las bandas superiores son las de mayor

RESULTADOS Y DISCUSION

intensidad, mientras en *B. bouleangeri* las bandas con mayor intensidad son inferiores a 1 Kb. Teniendo en cuenta las intensidades de los productos de PCR con los cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R, se clonaron las bandas de mayor intensidad en cada una de estas especies.

A partir de las bandas de 250 pb y 450 pb de *B. bouleangeri* se han obtenido 5 clones de la banda de 250 pb y 5 de la banda de 450 pb. Los 10 clones muestran alta identidad entre sí en el alineamiento, salvo por la diferencia en tamaño debida a una delección de 183 pb en la parte central en los clones procedentes de la banda de 250 pb (Figura 74).

```

Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-1 ATAGAGCTTC CTGCCTGGAC TTCTATACTG ACCCACTGGA GCTGTCTTGC TGTGTTCCT GFTTGTCCG ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-2 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-18 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-24 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-38 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 ----- TA CCAGAGCATT ACCCTCCAGA TCCTGTTGG 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 ----- TA CCAGAGCATT ACCCTCCAGA TCCTGTTGG 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 ----- TA CCAGAGCATT ACCCTCCAGA TCCTGTTGG 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 ----- TA CCAGAGCATT ACCCTCCAGA TCCTGTTGG 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 ----- TA CCAGAGCATT ACCCTCCAGA TCCTGTTGG 100

Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-1 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-2 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-18 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-24 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-38 ----- 68
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 GTTTTTGTG TCACCTGTTG TCGCCCACTT GGGCTTATAT GTTTTGTCTG TATTGTCTGT CCTCTCCCTG GTGTTTTCTT TTAGTGTAG TGGTGAGGAC 200
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 GTTTTTGTG TCACCTGTTG TCGCCCACTT GGGCTTATAT GTTTTGTCTG TATTGTCTGT CCTCTCCCTG GTGTTTTCTT TTAGTGTAG TGGTGAGGAC 200
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 GTTTTTGTG TCACCTGTTG TCGCCCACTT GGGCTTATAT GTTTTGTCTG TATTGTCTGT CCTCTCCCTG GTGTTTTCTT TTAGTGTAG TGGTGAGGAC 200
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 GTTTTTGTG TCACCTGTTG TCGCCCACTT GGGCTTATAT GTTTTGTCTG TATTGTCTGT CCTCTCCCTG GTGTTTTCTT TTAGTGTAG TGGTGAGGAC 200
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 GTTTTTGTG TCACCTGTTG TCGCCCACTT GGGCTTATAT GTTTTGTCTG TATTGTCTGT CCTCTCCCTG GTGTTTTCTT TTAGTGTAG TGGTGAGGAC 200

Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-1 ----- AGGGTTAG GCACGTGATC GGGTACGAG TGAAGAAGCT GTCTAGCGAC 117
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-2 ----- 117
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-18 ----- 117
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-24 ----- 117
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-38 ----- 117
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 TAGTGCTCCC ACCGCCCTAT TCACACTCA GGGCTCAGCT TAAGGAAGC C..... 300
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 TAGTGCTCCC ACCGCCCTAT TCACACTCA GGGCTCAGCT TAAGGAAGC C..... 300
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 TAGTGCTCCC ACCGCCCTAT TCACACTCA GGGCTCAGCT TAAGGAAGC C..... 300
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 TAGTGCTCCC ACCGCCCTAT TCACACTCA GGGCTCAGCT TAAGGAAGC C..... 300
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 TAGTGCTCCC ACCGCCCTAT TCACACTCA GGGCTCAGCT TAAGGAAGC C..... 300

Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-1 GTCAGGGCAG TCAGGTGCCA GCTTCAAGT GAGTTAGGGG TCACCACCTC TCCCTTGGAC AGGGCTTTC CCTACCTTG CATCACACT CTGTGATGG 217
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-2 ----- 217
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-18 ----- 217
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-24 ----- .C..... 217
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-38 ----- 400
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 ----- 400
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 ----- 400
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 ----- 400
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 ----- 400
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 ----- 400

Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-1 TAGCCAGTC GTGATAACCT CCTTATATTC CCCCTTCCCA CTTCTCTGGT TGCCAGAT 275
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-2 ----- 275
Pbo-BamHI-210B-PCR1-200-18 ----- 275
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-24 ----- 275
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-38 ----- 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 ----- 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 ----- 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 ----- 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 ----- 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 ----- 458

```

Figura 74. Alineamiento de las secuencias BamHI-210B de *B. bouleangeri* procedentes de las bandas de 250 y 450 pb de PCRs realizadas con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW y la edición se ha realizado con BioEdit.

Las secuencias de *B. bouleangeri* procedentes de la banda de 450 pb alinean con las secuencias BamHI-210B-grupo III de *B. bufo* y, por consiguiente, todas ellas son similares en sus extremos a las secuencias BamHI-210B-grupo I de *B. bufo* procedentes de la banda de digestión (Figura 75).

Sin embargo cuando se calculan las distancias entre las secuencias de los grupos I y III de *B. bufo* y *B. bouleangeri* (Tabla 43) se puede observar que, a pesar del reducido número de secuencias de ambos grupos de *B. bouleangeri*, se puede observar que, a pesar del reducido número de secuencias de ambos grupos de *B. bouleangeri*, las secuencias muestran una cierta distancia entre ellas, sobre todo entre las secuencias de *B. bufo* y *B. bouleangeri*, independientemente del grupo.

RESULTADOS Y DISCUSION

```

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-20 ATAGAGCTTC CTGCGCTGGAC ATCTATACTG ACCCACTGGA GTTGTG----AATCCT GGTGTGCGT CCAGAGTGCT ACCCTCCGGA TCCCTGTTGG 92
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-23 .....T.....C.....T.....A.....CAT.....A..... 92
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-26 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 .....T.....C.....TTGC TGTGCT.....A.....CAT.....A..... 100

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-20 GCTTATTGTT GTCTCCTGTT GTGCGCCACC TGAGATTATA TGTTGAGTCT GGTGTTGCTG TCCTCCCTT GGTGTTTTCC TTAGAGCTA GTAGTGCGGA 192
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-23 .....T.....C.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 192
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-26 .....C.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 .....T.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 .....T.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 .....T.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 .....T.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 .....T.....CA.....G.C.....TT.....A.....T.....C.....T.T.....G..A... 199

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-20 CTAGTGTTC CACCGCCCTG TTCACTATCT AGGGCTACG TCAGGGAAG CAGGGCTTA GGCACGTGAT CGGCGTACGG GTGAGGAACC CGTCTAGGGA 292
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-23 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 292
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-26 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 .....C.....A.....CTC.....T.A.....T.....A.....A.....T.....C... 299

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-20 CGTCAGGGCA GCCAGTGCC AGCCGCAAGG TGAGTTAGGG CTCACCACT TCCCTCTCAC TTGGGCAGGG CATTCTCTCF TCCCTCCCTC TGTGTCAC 390
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-23 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-26 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 .....T.....TT.....CT.....A.....T.....A.....T.....CA...AC 388

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-20 GTATGTGATA GTCACGCCGA CCATGATAA-----TAT TCCCTCTCA CACTCTCTG GTTGCCAGAT 452
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-23 .....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G..... 452
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-26 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-2 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-3 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-17 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-31 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
Pbo-BamHI-210B-PCR1-470-46 .....C.....C.....GT.....AG T.G.....C CTCCTTA.....CT..C 458
    
```

Figura 75. Alineamiento de las secuencias BamHI-210B de *B. bouleengeri* procedentes de la banda de 450 pb del producto de PCR obtenido con los cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R, con clones BamHI-210B del grupo III de *B. bufo*. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW y la edición se ha realizado con BioEdit.

Grupos	Distancia intraespecífica	Distancia interespecífica (grupos)				Distancia interespecífica neta (grupos)			
		Bbou I	Bbu I	Bbou I	Bbu III	Bbou I	Bbou I	Bbou I	Bbu III
<i>B. bufo</i> 210B I	0,112 ± 0,022		Bbu I	Bbou I	Bbu III		Bbou I	Bbou I	Bbu III
<i>B. bouleengeri</i> 210B I	0,000 ± 0,001	Bbou I	0,112 ± 0,027			Bbou I	0,055 ± 0,021		
<i>B. bufo</i> 210B III	0,013 ± 0,007	Bbu III	0,102 ± 0,023	0,072 ± 0,028		Bbou III	0,039 ± 0,014	0,065 ± 0,027	
<i>B. bouleengeri</i> 210B III	0,000 ± 0,002	Bbou III	0,112 ± 0,027	0,000 ± 0,000	0,072 ± 0,028	Bbou III	0,055 ± 0,021	0,000 ± 0,000	0,065 ± 0,027

Tabla 43. Distancias genéticas intraespecíficas en cada grupo, interespecíficas e interespecíficas netas entre secuencias BamHI-210B de los grupos I y III de *B. bufo* y *B. bouleengeri*.

De hecho, cuando se obtiene el árbol filogenético de máxima verosimilitud⁸² (“bootstrap” con 1.000 réplicas), todas las secuencias de los dos grupos de BamHI-210B de *B. bouleengeri* salen agrupadas en una rama con valores de “bootstrap” del 90% (Figura 76). Las secuencias de ambos grupos de BamHI-210B de *B. bufo* también se separan en dos ramas, aunque soportadas por valores de “bootstrap” menores y con algunas secuencias entremezcladas en otras ramas.

En la especie *B. brongersmai* se han clonado las bandas de 1.000 y 1.200 pb, obteniéndose dos clones de la primera y 3 clones de la segunda. El alineamiento de estos 5 clones entre sí muestra

⁸² Modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura con distribución gamma (K2+G).

RESULTADOS Y DISCUSION

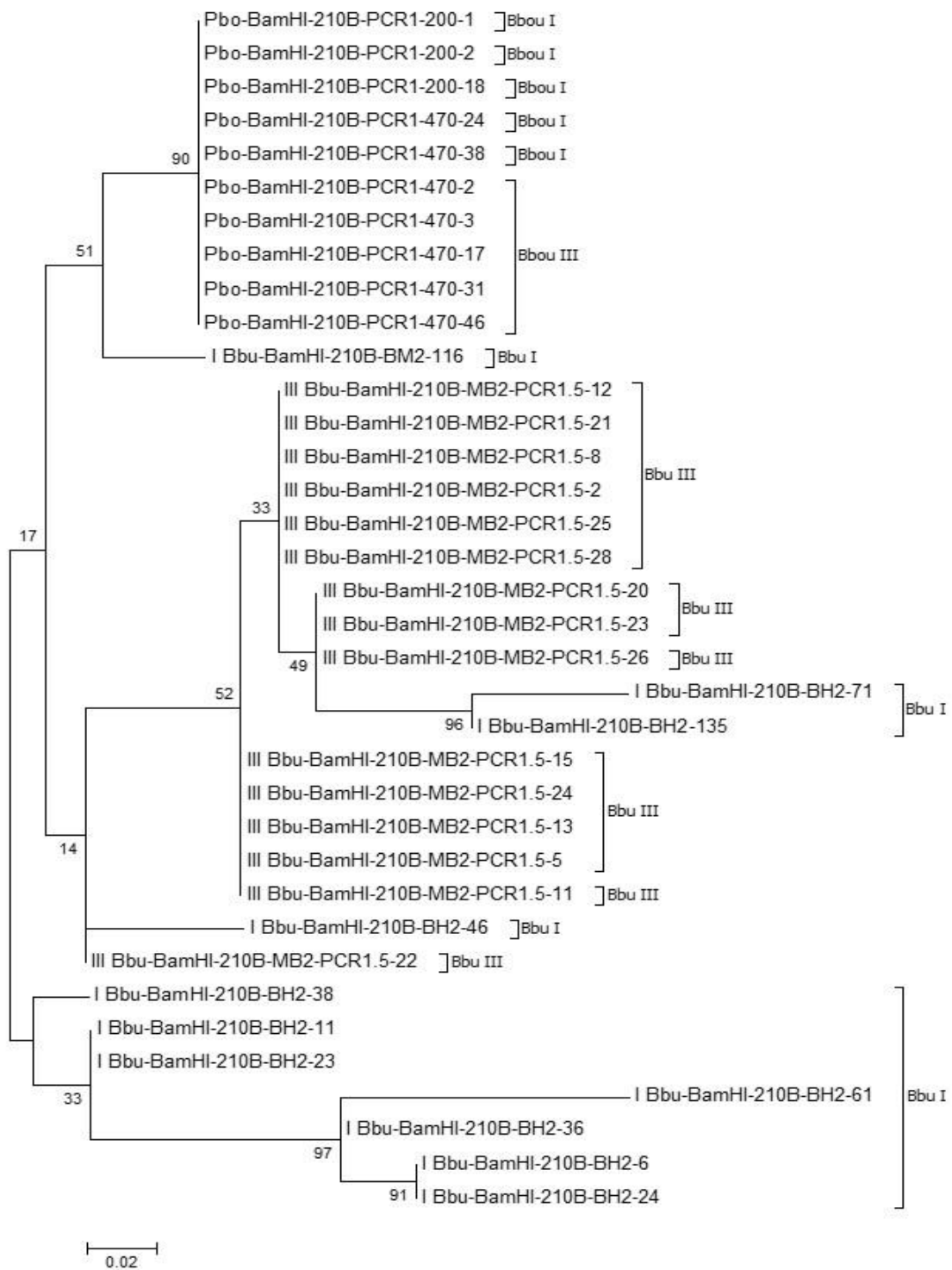


Figura 76. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para las secuencias BamHI-210B de los grupos I y III de las especies *B. bufo* y *B. boulengeri*. Las secuencias están marcadas según la especie de la que proceden y según el grupo BamHI-210B al que pertenecen.

que las 5 secuencias alinean al comienzo (1-332 pb) y al final (las ultimas 82 pb correspondientes a la secuencia BamHI-210B), dejando una región en la parte central de 567 y 721 pb en las

RESULTADOS Y DISCUSION

secuencias de 1.000 y 1.200 pb respectivamente, en la que éstas no alinean entre sí, ni con otras secuencias de ADN repetitivo (Figura 77).

Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	ATAGAGCTTC	CTGCCTGGAC	ATCTATTCTG	ACCTTCTGGA	GCTGTGTGTC	TGGGTTTGGT	GGTAGTGGT	CCAGAACGCT	ACCTTCGGGA	TCCCTGTTGG	100	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	T.....A.....CA.....A.....CC.....T.....T.....T.....	100	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	T.....A.....CA.....A.....TTG.....C.....T.....C.....TA.....G.....T.....	100	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	T.....A.....CA.....A.....TTG.....C.....T.....C.....TA.....G.....T.....	100	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	T.....A.....CA.....T.....TTG.....C.....T.....CCATA.....G.....AT.....	100	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	T.....A.....CA.....T.....TTG.....C.....T.....CCATA.....G.....AT.....	100	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	T.....A.....CA.....T.....TTG.....C.....T.....CCATA.....G.....AT.....	100	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	ACCTTTTGG	TCATTGTGG	TCACCCACCT	GGGTGATGT	G TTTGCTG	TTTTGCTGT	CCTCTCCCT	GTGTTCCCT	CTTAGTGA	GTGGTGGGA	199	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	G.....GG.....GC.....T.....GG.....AT.....A.....A.....A.....T.....G.....T.....TC.....	199	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	G.T.C.G.T.....CGC.....T.....G.....CT.....A.....T.....A.....G.....T.....T.....A.....	199	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	G.T.C.G.T.....CGC.....T.....G.....CT.....A.....T.....A.....G.....T.....T.....A.....	199	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	G.T.....G.T.....CGC.....T.....G.....CT.....A.....T.....A.....G.....T.....T.....AA.....	199	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	G.T.....G.T.....CGC.....T.....G.....CT.....A.....T.....A.....G.....T.....T.....AA.....	199	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	G.T.....G.T.....CGC.....T.....G.....CT.....A.....T.....A.....G.....T.....T.....AA.....	199	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	CTAGCGATCC	CACCGCCTG	TCACATCT	AGGGCTCATA	T TAGGAAA	GCCAGGTTT	AGGCAGCGA	TCGCCGACG	GGTGGAGAC	CCGCTCAGG	298	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8T.....C.....C.....CAC.....C.....T.....G.....T.....	298	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64T.C.....A.....C.....A.....CT.....CG.....AA.....G.....T.....A.....	298	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6T.C.....A.....C.....A.....CT.....CG.....AA.....G.....T.....A.....	298	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3T.C.....A.....C.....A.....CT.....CG.....AA.....G.....T.....A.....T.....A.....A.....	298	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4T.C.....A.....C.....A.....CT.....CG.....AA.....G.....T.....A.....T.....A.....A.....	298	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6T.C.....A.....C.....A.....CT.....CG.....AA.....G.....T.....A.....T.....A.....A.....	298	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	ACGTCAGGGC	AGTCAGGTG	CAGCCGCAAG	GTGAGTTAG	GTTCACCAC	TTTCCCTCT	CCTTGTGAG	GGCTTCCCT	GTTTTCCCT	CGTGGC	395	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	G.....A.....TT.....GAT.....C.....T.....TCA.....	395	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-64	G.....A.....TT.....GAT.....C.....T.....TCA.....	395	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3TT.....GA.....A.....A.....C.....A.....T.....	397	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4TT.....GA.....A.....A.....C.....A.....T.....	397	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6TT.....GA.....A.....A.....C.....A.....T.....	397	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	TCGC	GTCCGT	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	331	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	CATGTC...G	A.....ACGC	CGGTCGTAAT	ATTGGAGTG	AGTGAGCATT	GC	450	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	CATGTC...G	A.....ACGC	CGGTCGTAAT	ATTGGAGTG	AGTGAGCATT	GC	450	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	CACGTC...G	A.....ACGA	CGGTCGTAAT	ATTACATTA	TTTGTCAAC	ATCTAATGTC	CACAGCGGT	GCCTCTCTGT	GTCAAACT	GTACTACAA	497	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	CACGTC...G	A.....ACGA	CGGTCGTAAT	ATTACATTA	TTTGTCAAC	ATCTAATGTC	CACAGCGGT	GCCTCTCTGT	GTCAAACT	GTACTACAA	497	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	CACGTC...G	A.....ACGA	CGGTCGTAAT	ATTACATTA	TTTGTCAAC	ATCTAATGTC	CACAGCGGT	GCCTCTCTGT	GTCAAACT	GTACTACAA	497	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	331	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64AGAGAAA	TTGCTTAAAT	AGCAATTGCT	TAGTGCCTC	CACAGTACTC	TACTACATT	TGTTCCGGAT	TTTGAGGACG	529	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6AGAGAAA	TTGCTTAAAT	AGCAATTGCT	TAGTGCCTC	CACAGTACTC	TACTACATT	TGTTCCGGAT	TTTGAGGACG	529	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	TGAACCCAGT	TTGTTTGGG	AAATTTACA	TTATTGTGC	AACATCTAAT	GTCCACAGG	TGTGCCCTTC	TGTCAAAATC	TGTACCACG	GTGAAGCAG	597	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	TGAACCCAGT	TTGTTTGGG	AAATTTACA	TTATTGTGC	AACATCTAAT	GTCCACAGG	TGTGCCCTTC	TGTCAAAATC	TGTACCACG	GTGAAGCAG	597	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	TGAACCCAGT	TTGTTTGGG	AAATTTACA	TTATTGTGC	AACATCTAAT	GTCCACAGG	TGTGCCCTTC	TGTCAAAATC	TGTACCACG	GTGAAGCAG	597	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	331	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	TTTTCTCTGA	GAAGCGTTG	CAGAAGTTAC	CTCCCCACG	TCCCTATGAT	TACCOCGTTA	ACCTGATTCC	TGGTCAAAA	T	TACCCAAGC	620	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	TTTTCTCTGA	GAAGCGTTG	CAGAAGTTAC	CTCCCCACG	TCCCTATGAT	TACCOCGTTA	ACCTGATTCC	TGGTCAAAA	T	TACCCAAGC	620	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	TGTATTTTGG	GGAAATTT	ACATTAT	TTGTGCAACA	TCT	AA	TGTCACAGC	GTGTGCCCTC	CGGTGCAAA	TACTGTACCA	687	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	TGTATTTTGG	GGAAATTT	ACATTAT	TTGTGCAACA	TCT	AA	TGTCACAGC	GTGTGCCCTC	CGGTGCAAA	TACTGTACCA	687	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	TGTATTTTGG	GGAAATTT	ACATTAT	TTGTGCAACA	TCT	AA	TGTCACAGC	GTGTGCCCTC	CGGTGCAAA	TACTGTACCA	687	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	331	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	CAGGTTAT	AT	AATCTTTCCG	GTCCCGAGAG	ACAGCCATG	AAAGATTCTA	TCTCCGAGAG	680	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	CAGGTTAT	AT	AATCTTTCCG	GTCCCGAGAG	ACAGCCATG	AAAGATTCTA	TCTCCGAGAG	680	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	CAGTTTGT	TAGGGAAAT	TACATTATT	GTGCAACATC	TACTGTCCAC	AACGTGTGCC	TCTCTGTCT	AAATACTGTA	CCACAGGTA	AACCTGTGA	787	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	CAGTTTGT	TAGGGAAAT	TACATTATT	GTGCAACATC	TACTGTCCAC	AACGTGTGCC	TCTCTGTCT	AAATACTGTA	CCACAGGTA	AACCTGTGA	787	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	CAGTTTGT	TAGGGAAAT	TACATTATT	GTGCAACATC	TACTGTCCAC	AACGTGTGCC	TCTCTGTCT	AAATACTGTA	CCACAGGTA	AACCTGTGA	787	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	331	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	CTGTGCTAAG	GGACACATCA	GACCCCTTC	ATCACCCGGT	GCTGCAAGG	TTTTCTTTG	TA	TA	744	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	CTGTGCTAAG	GGACACATCA	GACCCCTTC	ATCACCCGGT	GCTGCAAGG	TTTTCTTTG	TA	TA	744	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	TTTTGGTGA	ATTTACATTA	TTTGTACAC	ATCTACTGC	CACAGCATG	GCCTCTCTGT	CAAACTACTG	ACCCAGGTA	AAACCTGTG	ATTTTGGGA	887	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	TTTTGGTGA	ATTTACATTA	TTTGTACAC	ATCTACTGC	CACAGCATG	GCCTCTCTGT	CAAACTACTG	ACCCAGGTA	AAACCTGTG	ATTTTGGGA	887	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	TTTTGGTGA	ATTTACATTA	TTTGTACAC	ATCTACTGC	CACAGCATG	GCCTCTCTGT	CAAACTACTG	ACCCAGGTA	AAACCTGTG	ATTTTGGGA	887	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	405	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	413	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	AGAAAG	ATGGGGGTG	CCTACCTCT	TGCCAGATT	T	CCGCA	AACTAAACCG	GATAACCATC	CGAGCCCATC	ACCTCTTCC	826
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	AGAAAG	ATGGGGGTG	CCTACCTCT	TGCCAGATT	T	CCGCA	AACTAAACCG	GATAACCATC	CGAGCCCATC	ACCTCTTCC	826
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	AATATACTGT	CACGAGGGT	TCAGGAGCCA	CGCTGACTC	CCTTATTTC	GGGGTCAGGA	AGTCGCAGT	GGTGGCTGTG	CG	CTCTATGC	978
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	AATATACTGT	CACGAGGGT	TCAGGAGCCA	CGCTGACTC	CCTTATTTC	GGGGTCAGGA	AGTCGCAGT	GGTGGCTGTG	CG	CTCTATGC	978
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	AATATACTGT	CACGAGGGT	TCAGGAGCCA	CGCTGACTC	CCTTATTTC	GGGGTCAGGA	AGTCGCAGT	GGTGGCTGTG	CG	CTCTATGC	978
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	463	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	513	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	TAAAGATCAT	CTGTCTTCT	AGTGATTGT	TTCTGTGTT	GC.T.GCA.T	924	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	TCTCATTCCT	GACCTGTACG	ATTCCGGGTG	CTAGTGGTT	924	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	TCTCATTCCT	GACCTGTACG	ATTCCGGGTG	CTAGTGGTT	924	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	TAAAGATCAT	CTGTCTTCT	AATGGTAGCT	TTCTGTGTT	GC.T.GCA.T	1078	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	TAAAGATCAT	CTGTCTTCT	AATGGTAGCT	TTCTGTGTT	GC.T.GCA.T	1078	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9	1078	
Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8	1078	
Pbr-BamHI-210B-PCR1-1000-64	981	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1000-6	981	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-3	1135	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-4	1135	
Bbro-BamHI-210B-PCR1-1200-6	1135	

Figura 77. Alineamiento de las secuencias BamHI-210B de *B. brongersmai*, procedentes de las bandas de PCR de 1.000 y 1.200 pb obtenidas con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210B-F/R, con los clones BamHI-210B del grupo II de *B. bufo*. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW y la edición se ha realizado con BioEdit.

Los primeros 332 pb y los últimos 82 pb alinean con dos clones de *B. bufo* BamHI-210B del grupo II (Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8 y Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9). Las secuencias de *B.*

RESULTADOS Y DISCUSION

brongersmai, a diferencia de los clones de *B. bufo*, presentan una diana para el enzima *Bst*YI que permite aislar la región de la inserción mediante digestión (Figura 78).

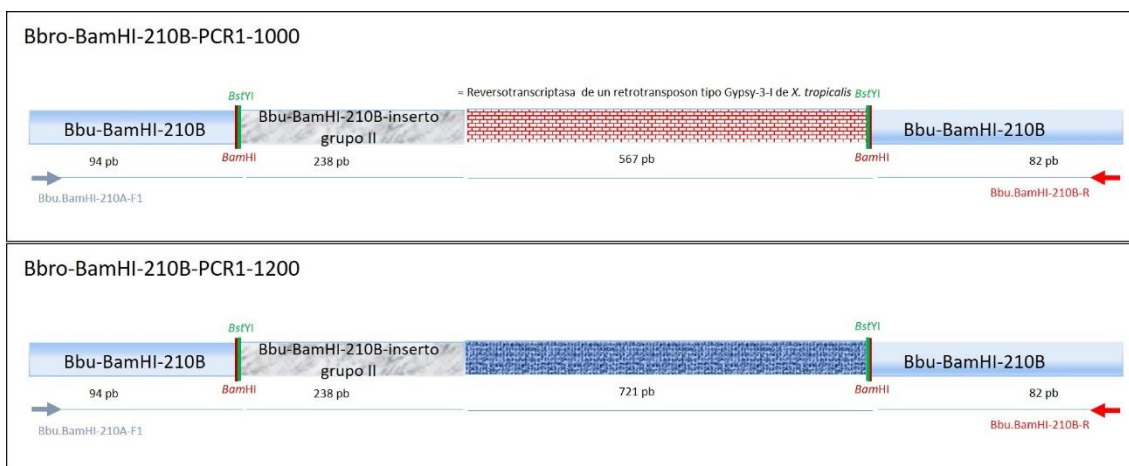


Figura 78. Secuencias procedentes de la clonación de productos de PCRs de 1.000 y 1.200 pb obtenidos con la pareja de cebadores Bbu.BamHI-210B-F1/R en la especie de *B. brongersmai*. En azul claro se representan secuencias correspondientes a BamHI-210B (BamHI-210B del grupo I). En gris se representa la región de la inserción con similitud a los clones Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.6-8 y Bbu-BamHI-210B-MB2-PCR1.5-9 (BamHI-210B del grupo II). En rojo se representa la región de la inserción similar a la reversotranscriptasa del transposon Gypsy-3-I de *X. tropicalis*. Finalmente, en azul oscuro se indica la región de la inserción de los clones procedentes de la banda de 1.200 pb, que no mostró similitud con ninguna otra secuencia.

El fragmento insertado en las secuencias de 1.200 pb no muestra similitud significativa con ninguna secuencia presente en bases de datos de secuencias (NCBI, RepBase) cuando se utilizan para hacer búsquedas mediante BLAST.

El fragmento insertado en las secuencias de 1.000 pb, por el contrario, sí que mostró un 70% de similitud con la LTR de un retrotransposon tipo Gypsy-3-I de *Xenopus tropicalis* (desde la posición 1499 hasta 1850 pb del retrotransposon) (Gypsy Ty3).

Cuando esta parte de la secuencia se utiliza para realizar búsquedas mediante BLASTx, se obtienen dominios de proteínas "RT_like superfamily", como RT-Rtv (Reversotranscriptasa de retrovirus) o RT-LTR (Reversotranscriptasa de transposones y retrovirus con LTR). Esto indica que en algún momento de su evolución las secuencias BamHI-210B han servido como puntos de inserción de transposones, ya que actualmente solo hemos encontrado restos de inserciones con similitud con proteínas de algunos retrotransposones de la especie de *B. bufo*.

La presencia de dianas para *Bst*YI flanqueando las secuencias insertadas permitió aislarlas (BamHI-210B grupo II y RT Gypsy Ty3 parcial) y marcarlas con biotina para su utilización como sondas en experimentos de FISH.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al no disponer de cromosomas metafásicos de *B. brongersmai* o *B. boulengeri* no ha sido posible analizar dónde se localizan estas secuencias en dichas especies. Esto sí ha sido posible en *B. viridis* (perteneciente al mismo género que *B. boulengeri*) y *E. calamita* (hasta no hace mucho incluida en el género *Pseudepidalea*, junto a *B. brongersmai*).

Para ver cómo se organiza el ADN repetitivo BamHI-210B en los cromosomas de estas especies, se realizó una FISH sobre cromosomas procedentes de cultivos utilizando secuencias BamHI-210B grupo I de *B. bufo* como sonda (Figura 79).

En *B. viridis*, al igual que en *B. bufo*, el ADN repetitivo BamHI-210B se distribuye de forma dispersa en todos los cromosomas, aunque en menor cantidad. En *E. calamita*, por el contrario, no se observa señal positiva alguna, corroborando los datos obtenidos mediante hibridación y PCR (Figura 79).

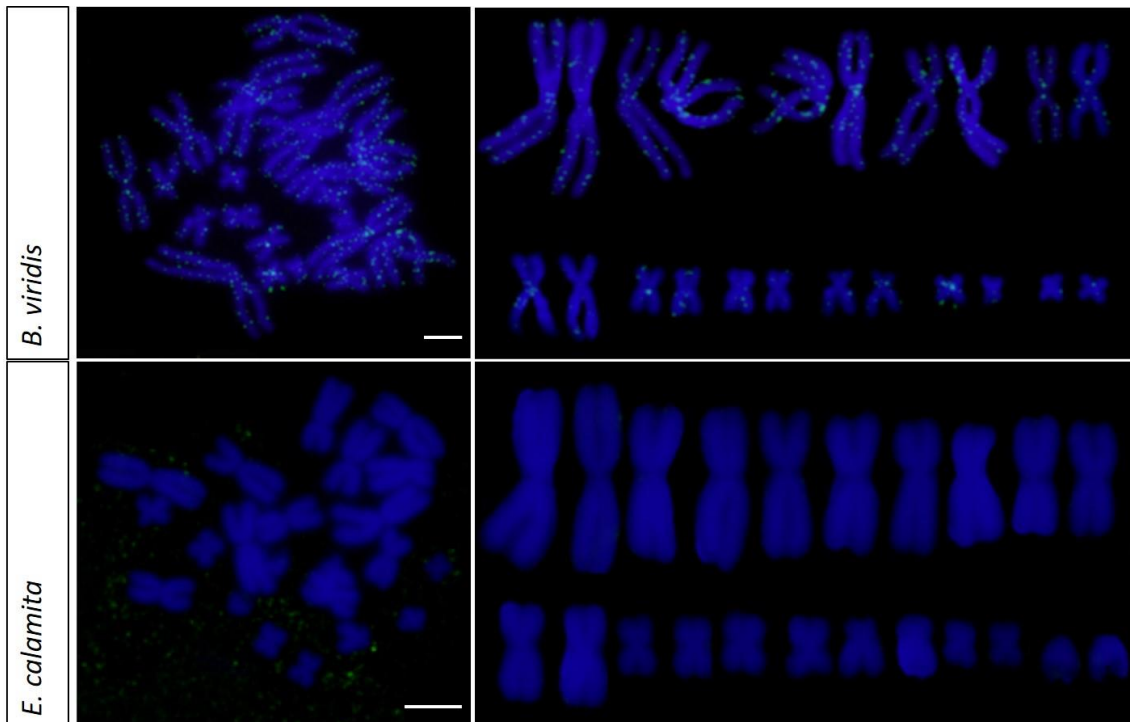


Figura 79. FISH y cariotipo correspondiente de cromosomas metafásicos de *B. viridis* y *E. calamita* hibridados utilizando como sonda secuencias BamHI-210B grupo I de *B. bufo*. Escala 2,5 μ m.

La distribución de las secuencias BamHI-210B del grupo III se ha analizado en *B. viridis* utilizando como sonda una secuencia BamHI-210B del grupo III de la especie de *B. boulengeri* (450 pb), y

RESULTADOS Y DISCUSION

realizando tres rondas de amplificación (Figura 80). El resultado obtenido se ha comparado con la distribución de estas secuencias en *B. bufo* utilizando la misma sonda.

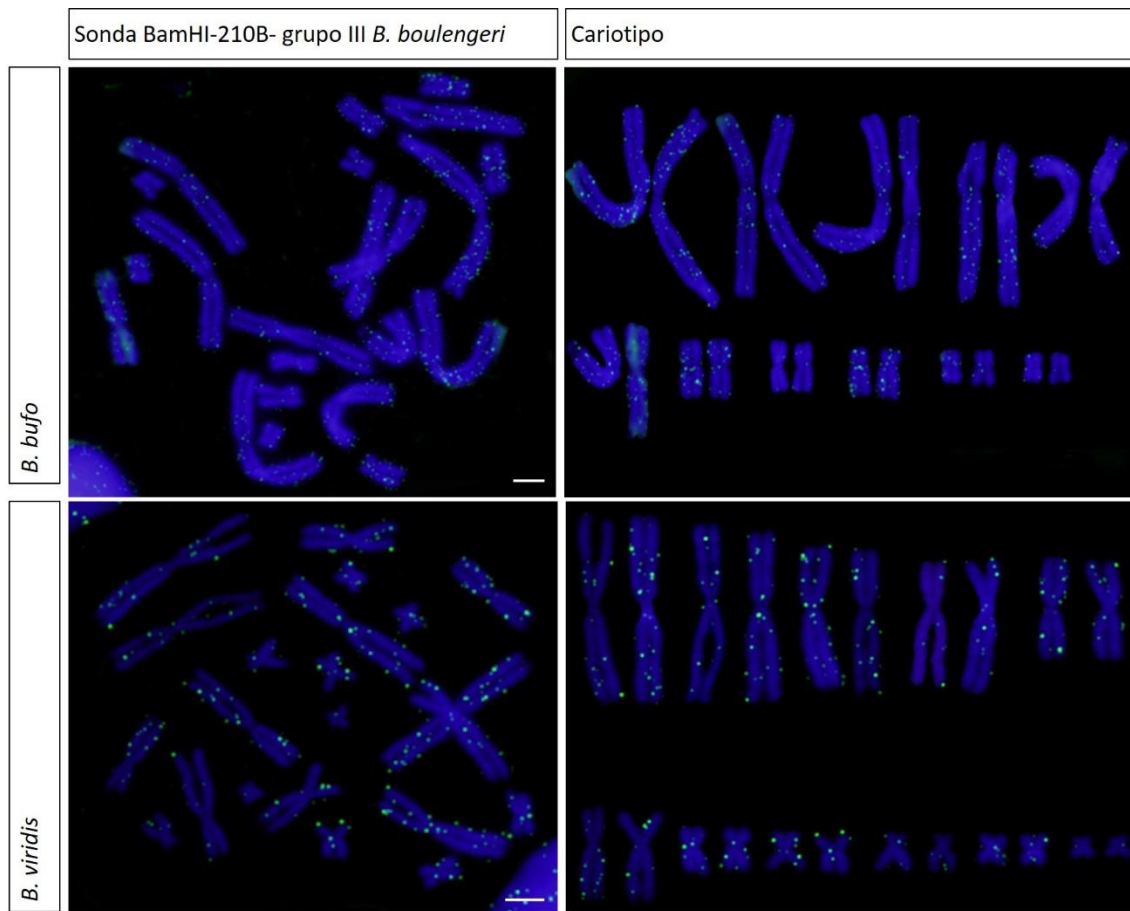


Figura 80. FISH sobre cromosomas de *B. bufo* (arriba) y *B. viridis* (abajo). Utilizando como sonda secuencias BamHI-210B grupo III (450 pb) de *B. boulengeri*. Escala 2,5 μm .

Tanto en *B. viridis* como en *B. bufo* todas las parejas cromosómicas presentan señales de hibridación, aunque de menor intensidad que cuando la hibridación se hace utilizando como sonda secuencias BamHI-210B del grupo III de *B. bufo* (Figura 72). Esto podría indicar que las secuencias de *B. boulengeri*, aunque presentan similitud con las secuencias de *B. bufo*, son lo suficientemente diferentes como para afectar al patrón de hibridación y no mostrar los niveles que se observan con la sonda BamHI-210B del grupo III de *B. bufo* (Figura 72).

Por otro lado, cuando se utiliza como sonda la secuencia BamHI-210B-“Gypsy-Ty3” de *B. brongersmai* (1.000 pb⁸³) sobre cromosomas de *B. bufo* y *B. viridis* (Figura 81), se observan

⁸³ El fragmento aislado con *Bst*YI presentaba un fragmento similar a un fragmento de la inserción de las secuencias BamHI-210B grupo II de *B. bufo* y un fragmento con un 70% de similitud con la reversotranscriptasa de un retrotransposón.

RESULTADOS Y DISCUSION

señales en todos los cromosomas. En la especie *B. bufo* estas señales presentan una distribución dispersa, presentes en todas las parejas cromosómicas, mientras que en *B. viridis* el patrón es similar, pero con señales menos intensas. En ambos casos la intensidad de la señal es equivalente a la intensidad de la señal observada con la sonda BamHI-210B. Es decir, en *B. viridis* hay menor cantidad del ADN repetitivo BamHI-210B y del resto de secuencias derivadas, mientras que en *B. bufo* hay una elevada cantidad de todas las subfamilias del ADN repetitivo BamHI-210B. Este paralelismo no es extraño si tenemos en cuenta que el ADN repetitivo BamHI-210B ha servido como punto de inserción de otros repetitivos.

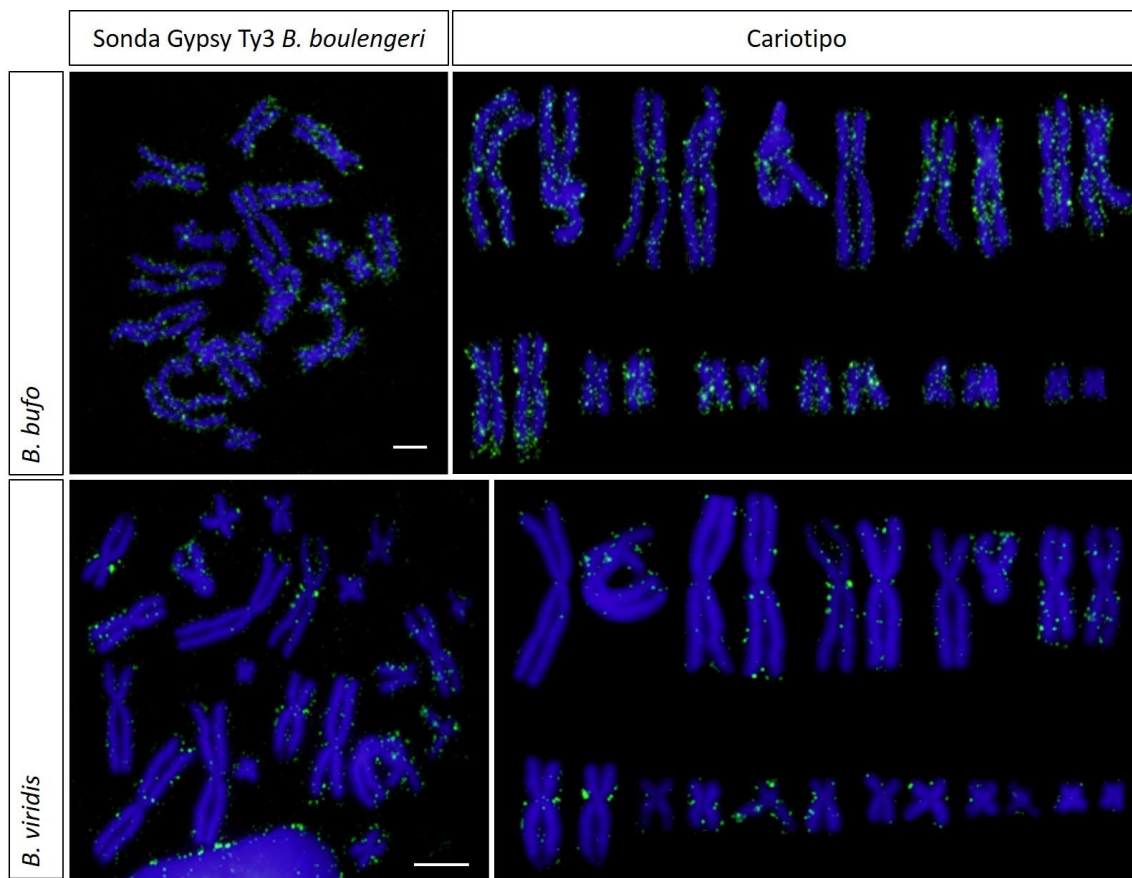


Figura 81. FISH sobre cromosomas de *B. bufo* (arriba) y *B. viridis* (abajo) utilizando como sonda secuencias Gypsy Ty3 (1.000 pb) de *B. brongersmai*. Escala 2,5 μ m.

10. Familia de ADN Repetitivo BamHI-190 en *B. bufo*

La digestión del ADN genómico de *B. bufo* con *Bam*HI da lugar, entre otras, a una banda de unos 190 pb que, según las condiciones de la electroforesis, puede quedar enmascarada por la banda de 210 pb (Figura 83A). Cuando la digestión del ADN genómico se hibrida con la sonda procedente de la banda de digestión aislada y marcada con digoxigenina se observa una banda de 190 pb (Figura 83B).

RESULTADOS Y DISCUSION

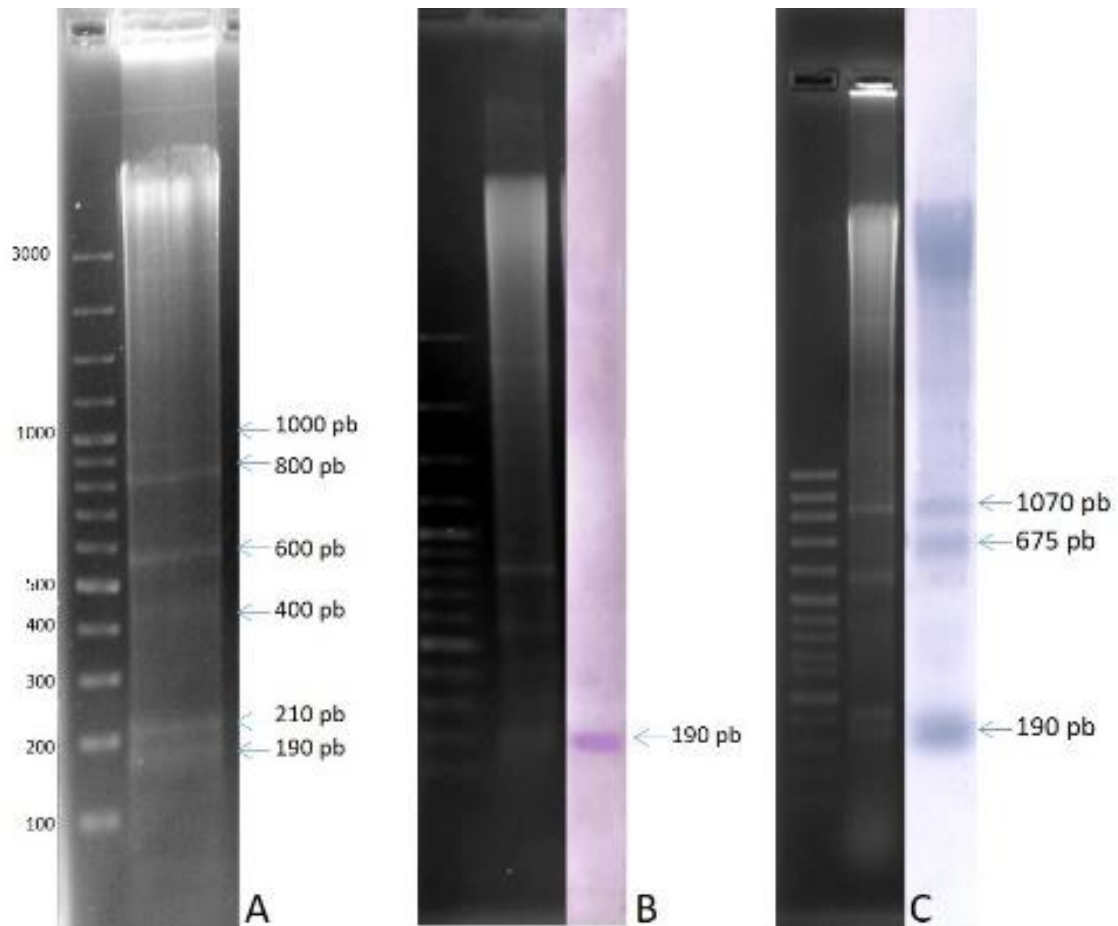


Figura 83. A: Detalle de la Figura 14A. ADN genómico de *B. bufo* (10 µg) digerido con *Bam*HI y separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. A la derecha se señalan los tamaños aproximados de las bandas (190, 210, 400, 600, 800 y 1.000 pb). B: Detalle de la Figura 15B en la que se muestra un “Southern-Blot” de ADN genómico de *B. bufo* (5 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con una sonda procedente de la banda de 190 pb. C: “Southern-Blot” de ADN genómico de *B. bufo* (10 µg) digerido con *Bam*HI e hibridado con sondas procedentes del clon Bbu-BamHI-210C-145 BamHI-190.

```

BamHI
Bbu-BamHI-190-BH2-2  GGATCCGCAAAACGCACACG GACGCTCGAA TGGAACTTA CAGGGCATG ATCAATGACT GTGGTGATCA CCCCATATAG ACTCCCTGAT CACCCCCCTG 100
Bbu-BamHI-190-BH2-3  .....T.....T.....G.....AG.....T.....TA..... 100
Bbu-BamHI-190-BH2-5  .....T.....T.....G.....AG.....T.....TA..... 100
Bbu-BamHI-190-BH2-6  .....T.....AT.....T.....C.....G.....AG.....T.....TA..... 100
Bbu-BamHI-190-BH2-11 .....T.....T.....G.....AG.....T.....TA..... 100
Bbu-BamHI-210C-28   .....T.....A.....G.....T.....T.....T.....T.....T..... 100
Bbu-BamHI-210C-145  .....T.....A.....G.....G.....T.....T.....T.....T..... 100

BamHI
Bbu-BamHI-190-BH2-2  TCATTGATTA CCCCCCTGTC ATGGATCA-A CCCCCTGTA AGCTCCATC AGACGTCGG ATGATTTTA CCGATCC 176
Bbu-BamHI-190-BH2-3  .....T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T..... 177
Bbu-BamHI-190-BH2-5  .....T.....C.....A.....T.....T.....T.....T.....T..... 177
Bbu-BamHI-190-BH2-6  .....A.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....T.....T..... 177
Bbu-BamHI-190-BH2-11 .....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T..... 176
Bbu-BamHI-210C-28   .....A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T..... 176
Bbu-BamHI-210C-145  .....A.....T.....G.....A.....T.....T.....T.....T..... 176
    
```

Figura 82. Alineamiento de los clones positivos para BamHI-190 obtenidos en *B. bufo* a partir de la banda de 190 pb procedente de la digestión de ADN genómico. Para el alineamiento se ha utilizado el programa ClustalW, mientras que el procesamiento de las secuencias se ha realizado con BioEdit. Se han señalado las dianas para *Bam*HI a ambos lados de la secuencia.

El aislamiento y clonación de la banda de 190 pb permitió la obtención de 7 clones que fueron secuenciados y alineados. El análisis del alineamiento reveló que 6 clones son similares entre sí y con los 2 clones BamHI-210C del apartado 6. Teniendo en cuenta su tamaño, todos ellos fueron clasificados como clones pertenecientes a la familia de ADN repetitivo BamHI-190 (Figura 82). El otro clon aislado pertenecía a la familia BamHI-210E.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis de las secuencias muestra que se trata de un ADN repetitivo que presenta un 50,2% de A+T, tiene un tamaño de 176-177 pb, de los cuales 155 pb son posiciones conservadas y 22 son variables. De éstas, 10 son sitios informativos y 12 son SNP. El cálculo de las distancias utilizando en modelo de sustitución nucleotídica de Jukes-Cantor con distribución gamma, revela que la similitud de las secuencias oscila entre 99% y 92%.

A partir de las secuencias se diseñaron dos parejas de cebadores (Figura 84). Dado que la banda de 190 pb a veces está contaminada por secuencias BamHI-210A, se utilizó una de estas parejas de cebadores para obtener sonda marcada correspondiente BamHI-190. Cuando esta sonda se hibrida con “Southern-blots” de ADN genómico digerido con *Bam*HI se observa un patrón de bandas diferente al que se obtiene con la sonda procedente de la banda de 190 pb marcada.

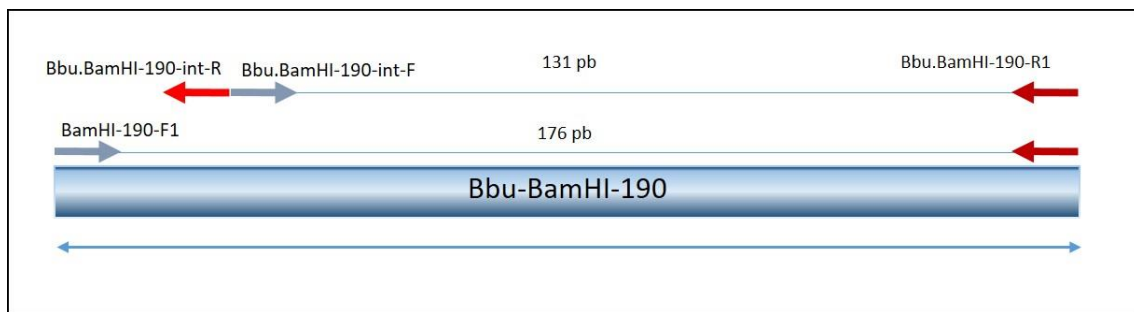


Figura 84. Localización de los cebadores en la unidad monomérica de BamHI-190, utilizados para amplificar por PCR el ADN repetitivo BamHI-190.

Así, con la sonda marcada por PCR, además de la banda de 190 pb (175 pb) se observan bandas de tamaños superiores (675 pb y 1.070 pb aproximadamente), probablemente debido a que las secuencias BamHI-190 están más representadas en esta segunda sonda (Figura 83C).

La distribución de las secuencias BamHI-190 se analizó mediante FISH sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo*, utilizando tres rondas de amplificación de la señal (Figura 85). Los resultados obtenidos muestran que todas las parejas cromosómicas presentan señal positiva para este ADN repetitivo, que se encuentra distribuido de forma dispersa por todos los cromosomas.

El ADN repetido BamHI-190 se ha buscado en la especie *E. calamita* mediante “Southern-blot”, amplificación por PCRs con cebadores específicos, “Dot-Blot” sobre ADN genómico y FISH. Con ninguna de estas técnicas se ha podido poner de manifiesto la presencia de este ADN repetitivo en esta especie.

RESULTADOS Y DISCUSION

La búsqueda de BamHI-190 en otras especies de la familia Bufonidae permitirá establecer si se trata de un ADN repetitivo específico de *B. bufo*, o si se extiende a otras especies del género o la familia.

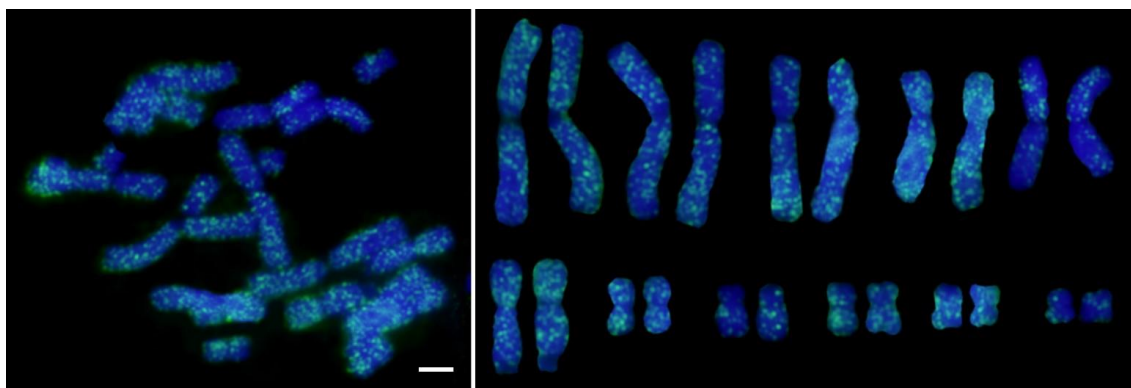


Figura 85. FISH (y cariotipo correspondiente) sobre cromosomas metafásicos de *B. bufo* utilizando como sonda secuencias BamHI-190 de la misma especie. La sonda fue marcada por PCR con los cebadores Bbu.BamHI-190-F/R. Escala 2,5 μ m.

11. Resumen

En la Tabla 44 se muestra un resumen breve de las características y localización de todas las familias de ADN repetitivos descritos en este trabajo.

La representación de todos los repetitivos no dispersos descritos en este trabajo, junto con las señales de GISH, de bandas C y Ag-NOR sobre el cariotipo de las especies *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis* (Figura 87), muestra que algunas bandas C intersticiales se podrían explicar por acumulación de ADNs repetitivos. Esto es especialmente visible para el ADN repetitivo BamHI-

Nombre	Tamaño	A+T %	Similitud %	Organización	Localización en <i>B. bufo</i>	Presencia en otras especies
BamHI-800	818 pb	57,1	98,1-91,8	Tándem	1-5 pericentromérico, 6q-telomérico, 11q	En todas las especies de la familia Bufonidae analizadas
BamHI-210A	212 pb	47,9	100-71,5	Tándem	1-5 pericentromérico, 6q-telomérico	<i>E. calamita</i> , <i>B. viridis</i> , <i>B. boulengeri</i> , <i>B. luristanicus</i> , <i>B. surdus</i> , <i>B. brongersmai</i> , <i>A. arabicus</i>
BamHI-210A-inserto	351 pb	47,5	100-86,3	HOR junto con BamHI-210A Tándem	1-5 pericentromérico, 6q-subtelomérico	<i>E. calamita</i> , <i>B. viridis</i> , <i>B. boulengeri</i> , <i>B. luristanicus</i> , <i>B. surdus</i> , <i>B. brongersmai</i>
BamHI-210B	181 pb	48,6	100-80,9	Monómeros dispersos	Disperso	<i>B. viridis</i> , <i>B. boulengeri</i> , <i>B. brongersmai</i>
BamHI-210B-inserto III	325-433 pb	43,9	100-91	HOR junto con BamHI-210B Disperso	Disperso	<i>B. viridis</i> , <i>B. boulengeri</i> , <i>B. siculus</i> , <i>B. balearicus</i> , <i>B. brongersmai</i>
BamHI-210B tipo RT Gypsy Ty3 de <i>X. tropicalis</i>	805 pb	50,5	100	HOR junto con BamHI-210B Disperso	Disperso	<i>B. viridis</i> , <i>B. brongersmai</i>
BamHI-190	176 pb	50,2	99,4-92,1	Disperso (junto con algún otro repetitivo por las bandas altas)	Disperso	No

Tabla 44. Resumen de todos los ADN repetitivos descritos en este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSION

800, que esta presente en las tres especies en posiciones diferentes en cada una de ellas, y siempre asociado a bandas C positivas.

Algunos de los ADN repetitivos descritos no presentan localización específica, sino que se encuentran dispersos por todos los cromosomas. Estos repetitivos podrían ser, al menos en parte, la explicación de las señales uniformes observadas en experimentos de GISH y GISH cruzada en las especies *B. bufo* y *B. viridis* (Figura 11 y Figura 12). Por otro lado, mediante FISH en la especie *E. calamita* solo se ha localizado el ADN repetitivo BamHI-800, por lo que deben existir otros ADNs repetitivos ampliamente distribuidos en esta especie, y que son compartidos con *B. bufo*.

No se ha identificado ningún ADN repetitivo que pueda ser responsable de las bandas C teloméricas y de la señal telomérica observada en experimentos de GISH, aunque la heterocromatina asociada a las NORs de *B. bufo*, podría estar formada por los ADN repetitivos BamHI-800 y BamHI-210A.

A modo de resumen, en la especie de *B. bufo*, se han identificado varios ADNs repetitivos responsables de la heterocromatina centromérica/pericentromérica presente en las parejas de cromosomas grandes de esta especie. Sin embargo, los centromeros de los cromosomas pequeños de *B. bufo* deben presentar un ADN repetitivo distinto solo identificable hasta el momento mediante GISH y Bandas C.

Respecto a la heterocromatina centromérica de las otras dos especies (*E. calamita* y *B. viridis*), no se han identificado ADNs repetitivos que puedan estar implicados en su formación y mantenimiento. Los resultados obtenidos indican que cada una de estas especies (o cada pareja de cromosomas homólogos dentro de una especie) podría acumular su propio ADN repetitivo centromérico, aunque éste pueda estar presente en localizaciones distintas al centromero en las otras especies (como ocurre con BamHI-800). Por otro lado, la heterocromatina constitutiva centromérica no solo es diferente entre las especies de la familia Bufonidae analizadas, ya que también parece ser diferente entre cromosomas de una misma especie, como ocurre con los cromosomas grandes y pequeños de *B. bufo*.

Los ADN repetitivos analizados se encuentran fuertemente representados en unas especies, y menos representados o ausentes en otras. Esto es lo que ocurre con el ADN repetitivo BamHI-800, fuertemente representado en *B. bufo*, y presente en menor número de copias en *E. calamita* y *B. viridis*; BamHI-210B y sus derivados, presentes en *B. bufo* y *B. viridis*, están ausentes en *E. calamita*. Finalmente, BamHI-210A y sus derivados, con una amplia distribución en *B. bufo*

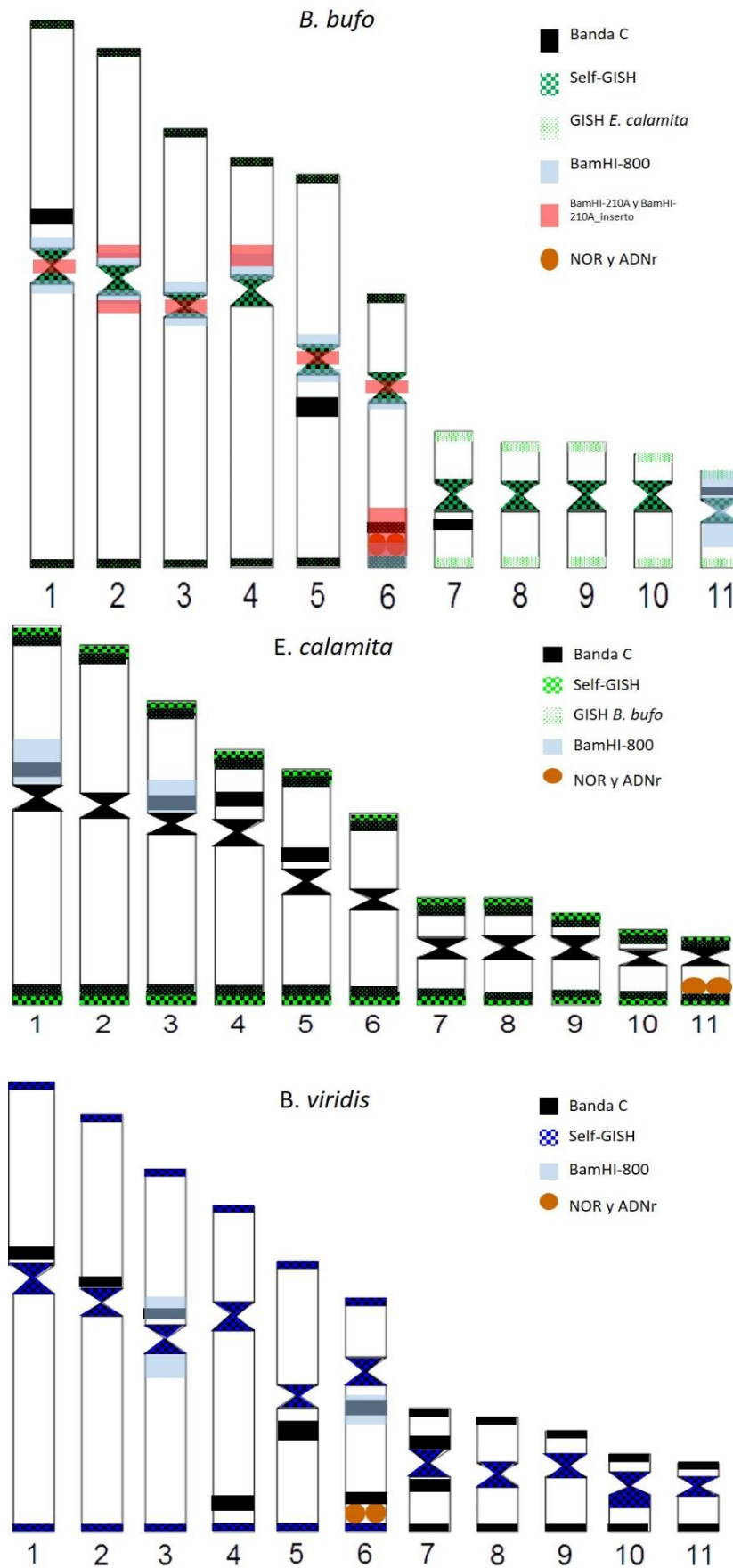


Figura 87. Representación gráfica del cariotipo de *B. bufo*, *E. calamita* y *B. viridis* sobre el que se indican las posiciones de las bandas C heterocromáticas (negro); las señales Ag-NOR y el cúmster de ADN ribosómico (círculos marrones); las señales de GISH (cuadrícula para sonda de la propia especie y círculos para sonda de otra especie. El color varía según la especie de la que proceda la sonda); el repetitivo BamHI-800 (azul transparente) y los repetitivos BamHI-210A y BamHI-210A-insero (rojo transparente).

RESULTADOS Y DISCUSION

y presente en otras especies de la familia Bufonidae, no ha podido localizarse sobre cromosomas metafásicos de *B. viridis* y *E. calamita*, probablemente debido a que en estas especies se encuentra en menor número de copias que en *B. bufo*. Por este motivo, y debido a su pequeño tamaño, no pueden ser puestos de manifiesto mediante FISH.

Los resultados obtenidos indican que existen numerosos ADN repetitivos que son compartidos por distintas especies/generos de una familia, pero se encuentran amplificados de forma diferente en cada especie. El análisis de las distintas familias del ADN repetitivo en la familia Bufonidae indica que existe una biblioteca ("library") de distintos repetitivos compartidas por las especies de esta familia de anfibios. Estos ADNs repetitivos se encuentran amplificados de forma diferencial en cada una de las especies/géneros, por lo que cada especie presentará su propio perfil ("library") de ADN repetitivos, ya que cada uno de ellos evoluciona de forma independiente en cada especie, aunque todos ellos, o en su gran mayoría, sean compartidos por otras especies de esta familia.

La existencia de una colección ("library") de secuencias ADN satélite compartida por especies relacionadas ha sido propuesta y descrita por otros autores (Fry *et al.* 1977; Mestrovic *et al.* 1998; Plohl *et al.* 1998; Cesari *et al.* 2003; Lin *et al.* 2006; del Bosque *et al.* 2011). En este trabajo se muestran evidencias de la existencia de bibliotecas de ADN repetitivo, tanto a de variables monoméricas de un ADN repetitivo (BamHI-800), como de ADNs repetitivos de una especie/género. Teniendo en cuenta que los anfibios son animales que presentan elevada cantidad de ADNs altamente y moderadamente repetidos, que a su vez son los principales responsables de la variaciones genómicas que presentan estos animales incluso entre las especies muy próximas (Introducción), resulta de elevado interés el análisis de estas secuencias.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. New polymorphisms in C bands and NOR's size have been described in samples of *B. bufo*, *E. calamita* and *B. viridis*.
2. Four repetitive DNA families (BamHI-800, BamHI-210A/BamHI-210A-inserto, BamHI-210B and BamHI-190) have been identified in *B. bufo*. All but BamHI-190 are present in other species/genus of Bufonidae family indicating they are not species specific repetitive sequences.
3. The repetitive DNA family BamHI-800 is organized in tandem, has an average monomer size of 816 bp, with a nucleotide composition slightly A+T rich and a number of copies per genome that range from 10^7 in *B. bufo* to 10^6 in other Bufonidae species. This repetitive DNA is located at specific regions in the karyotypes of *B. bufo*, *E. calamita* and *B. viridis*.
4. BamHI-800 sequences follow principles of concerted evolution, with non-independent monomer sequence evolution within a genome and in a population.
5. The repetitive DNA family BamHI-210A/BamHI-210A-inserto has been found in 6 species of Bufonidae family. These sequences are slightly G+C rich, show a higher order organization (HOR), the number of copies per genome range from 10^{10} (in *B. bufo*) to 10^6 (in *E. calamita* and *B. viridis*), and do not follow a pattern of concerted evolution.
6. BamHI-210A/BamHI-210A-inserto sequences are located at specific chromosomal regions in *B. bufo* that are also Ag-positive after Ag-NOR staining (NOR and non-specific pericentromeric staining in large chromosomes). These sequences cannot be detected by FISH in other Bufonidae species where its presence has been proved by Southern Blot and PCR, probably due to lower copy number and smaller cluster organization.
7. BamHI-210B repeated DNA has been found in several species of Bufonidae family (*B. bufo*, *B. viridis*, *B. boulengeri*, *B. siculus*, *B. balearicus* and *B. brongersmai*) but not in *E. calamita*. These repetitive sequences can be classified in groups according to the presence/absence of inserted sequences and to the sequence of the insert.
8. BamHI-210B repeated DNA show a dispersed distribution in all chromosomes of *B. bufo* and *B. viridis* species.
9. One of the sequences inserted in BamHI-210B repetitive DNA show 70% similarity with the reverse transcriptase of transposon Gypsy Ty3 from *X. tropicalis*. This

CONCLUSIONES

sequence also shows a disperse distribution in all chromosomes from *B. bufo* and *B. viridis*, indicating that BamHI-210B repetitive DNA can provide an insertion point for other repetitive DNA, including transposons.

10. The repetitive DNA family BamHI-190 has been identified in *B. bufo* species, but not in *B. viridis* or *E. calamita*. The average monomer size has 176 bp, 50,2% A+T and a dispersed distribution on all the chromosomes of *B. bufo*.
11. PCRs with specific primers for different repetitive DNAs families do not select particular groups of sequences, but rather amplify their monomer variants in a non-selective form, equivalent to restriction-cloning.
12. Bufonidae family has a large library of repetitive DNAs, with diverse variants (for BamHI-800) and different repetitive DNAs (BamHI-800, BamHI-210A/BamHI-210A-inserto, BamHI-210B, BamHI-190) that have been differentially amplified in each species or genus. These repetitive DNAs can provide important information about evolution patterns of repeated DNA sequences and can be used as a complementary tool to establish taxonomic and population relationships in this family.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abramyan, J., T. Ezaz, J. A. M. Graves y P. Koopman (2009). Z and W sex chromosomes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Chromosome research* **17**(8): 1015-1024.
- Ackerman, E. J. (1983). Molecular cloning and sequencing of OAX DNA: an abundant gene family transcribed and activated in *Xenopus oocytes*. *The EMBO journal* **2**(8): 1417.
- Ainouche, M. L. y E. Jenczewski (2010). Focus on polyploidy. *New Phytologist* **186**(1): 1-4.
- Al-Shehri, A. y A. Al-Saleh (2012). Report of *Bufo tihamicus* karyotype from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* **12**(16).
- Aleksandrovskaia, T., V. Birstein y A. Mazin (1979). Size of genome and karyotype in *Pelodytes caucasicus*. *Zoologicheskii Zhurnal* **58**(9): 1365-1373.
- Amaro-Ghilardi, R. C., M. J. de Jesus Silva, M. T. Rodrigues y Y. Yonenaga-Yassuda (2008). Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* **134**(2): 159-168.
- Amor, N., G. Odierna, G. Chinali, K. Said y O. Picariello (2009). Unusual chromosomal distribution of a major satellite DNA from *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet Genome Res* **127**(1): 33-42.
- Anders, C. y H. Schleich (2002). Class Amphibia (amphibians). *Amphibians and reptiles of Nepal: biology, systematics, field guide*: 133-340.
- Arntzen, J. W., J. McAtear, E. Recuero, J. M. Ziermann, A. Ohler, J. van Alphen y I. Martínez-Solano (2013a). Morphological and genetic differentiation of *Bufo* toads two cryptic species in Western Europe (Anura, Bufonidae). *Contributions to Zoology* **82**(4).
- Arntzen, J. W., E. Recuero, D. Canestrelli y I. Martínez-Solano (2013b). How complex is the *Bufo* *bufo* species group? *Molecular phylogenetics and evolution* **69**(3): 1203-1208.
- Avise, J. C., C. Gibling-Davidson, J. Laerm, J. C. Patton y R. A. Lansman (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**(12): 6694-6698.
- Azevedo, M., F. Foresti, P. Ramos y J. Jim (2003). Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Genetics and Molecular Biology* **26**(3): 289-294.
- Bachmann, K., A. Konrad, E. Oeldorf y H. Hemmer (1978). Genome size in the green toad (*Bufo viridis*) group. *Experientia* **34**(3): 331-332.
- Bachmann, K. y M. Nishioka (1978). Genome size and nuclear size in Palearctic frogs (*Rana*). *Copeia*: 225-229.
- Bachmann, L. y D. Sperlich (1993). Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Molecular biology and evolution* **10**(3): 647-659.
- Baldari, C. T. y F. Amaldi (1976). DNA reassociation kinetics in relation to genome size in four amphibian species. *Chromosoma* **59**(1): 13-22.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldari, C. T. y F. Amaldi (1977). Length and interspersion of repetitive and non repetitive DNA sequences in four amphibian species with different genome sizes. *Chromosoma* **61**(4): 359-368.
- Baraquet, M., J. A. Valetti, N. E. Salas y A. L. Martino (2011). Redescription of the karyotype of five species of the family Bufonidae (Amphibia: Anura) from central area of Argentina. *Biologia* **66**(3): 543-547.
- Becak, M. (2014). Polyploidy and epigenetic events in the evolution of Anura. *Genet. Mol. Res* **13**: 5995-6014.
- Beccari, N. (1926). Le nombre des chromosomes dans les cellules genitales de Bufo viridis. *CR Assoc. Anat* **21**: 29-31.
- Betto-Colliard, C., R. Sermier, S. Litvinchuk, N. Perrin y M. Stöck (2015). Origin and genome evolution of polyploid green toads in Central Asia: evidence from microsatellite markers. *Heredity* **114**(3): 300-308.
- Beukema, W., P. De Pous, D. Donaire-Barroso, S. Boaerts, J. Garcia-Porta, D. Escoriza, O. J. Arribas, H. El Mouden el y S. Carranza (2013). Review of the systematics, distribution, biogeography and natural history of Moroccan amphibians. *Zootaxa* **3661**: 1-60.
- Birstein, V. (1981). Specific differential staining patterns of chromosomes in the Anura, some species of the genera Rana and Bufo taken as an example. *ZOOLOGICHESKY ZHURNAL* **60**(2): 246-256.
- Birstein, V. y A. Mazin (1982). Chromosomal polymorphism of Bufo bufo: karyotype and C-banding pattern of B. b. verrucosissima. *Genetica* **59**(2): 93-98.
- Birstein, V. J. (1982). Structural characteristics of genome organization in amphibians: differential staining of chromosomes and DNA structure. *J Mol Evol* **18**(2): 73-91.
- Blaustein, A. R. y D. B. Wake (1990). Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology & Evolution* **5**(7): 203-204.
- Bogart, J. P. (1972). Karyotypes. *Evolution in the genus Bufo*: 171-195.
- Bogart, J. P. (1980). Evolutionary implications of polyploidy in amphibians and reptiles. *Polyploidy*, Springer: 341-378.
- Borkin, L. J., V. K. Eremchenko, N. Helfenberger, A. M. Panfilov y J. M. Rosanov (2013). On the distribution of diploid, triploid, and tetraploid green toads (Bufo viridis complex) in south-eastern Kazakhstan. *Russian Journal of Herpetology* **8**(1): 45-53.
- Borkin, L. J., J. M. Rosanov y S. N. Litvinchuk (2000). Nuclear DNA content in some green toads (Bufo viridis complex) of Turkey and Iran. *Russ. J. Herpetol* **7**(3): 171-180.
- Botchan, P., R. H. Reeder y I. B. Dawid (1977). Restriction analysis of the nontranscribed spacers of Xenopus laevis ribosomal DNA. *Cell* **11**(3): 599-607.
- Boulenger, G. A. (1966). *Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the collection of the British Museum*, Wheldon & Wesley.
- Braasch, I. y J. H. Postlethwait (2012). Polyploidy in fish and the teleost genome duplication. *Polyploidy and genome evolution*, Springer: 341-383.
- Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang y A. C. Wilson (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of molecular evolution* **18**(4): 225-239.

BIBLIOGRAFÍA

- Browne, M. J. y R. Burdon (1977). The sequence specificity of vertebrate DNA methylation. *Nucleic acids research* **4**(4): 1025-1037.
- Browne, R. K., J. Seratt, C. Vance y A. Kouba (2006). Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology and Endocrinology* **4**(1): 1.
- Buggs, R. J., L. Zhang, N. Miles, J. A. Tate, L. Gao, W. Wei, P. S. Schnable, W. B. Barbazuk, P. S. Soltis, *et al.* (2011). Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Current Biology* **21**(7): 551-556.
- Bulazel, K. V., G. C. Ferreri, M. D. Eldridge y R. J. O'Neill (2007). Species-specific shifts in centromere sequence composition are coincident with breakpoint reuse in karyotypically divergent lineages. *Genome biology* **8**(8): 1.
- Burggren, W. W. y S. Warburton (2007). Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *Ilar Journal* **48**(3): 260-269.
- Burgos, M., R. Jimenez y R. Diaz de la Guardia (1986). A rapid, simple and reliable combined method for G-banding mammalian and human chromosomes. *Stain Technol* **61**(5): 257-260.
- Butchart, S. H., M. Walpole, B. Collen, A. Van Strien, J. P. Scharlemann, R. E. Almond, J. E. Baillie, B. Bomhard, C. Brown, *et al.* (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* **328**(5982): 1164-1168.
- Cafasso, D., S. Cozzolino, P. De Luca y G. Chinali (2003). An unusual satellite DNA from *Zamia paucijuga* (Cycadales) characterised by two different organisations of the repetitive unit in the plant genome. *Gene* **311**: 71-79.
- Canestrelli, D., R. Bisconti, A. Chiochio, L. Maiorano, M. Zampiglia y G. Nascetti (2017). Climate change promotes hybridisation between deeply divergent species. *PeerJ* **5**: e3072.
- Cardone, D. E., M. Marotta, C. Rosati, G. Chinali y I. Feliciello (1997). A family of centromeric satellite DNAs from the European brown frog *Rana graeca italica*. *Genome* **40**(5): 774-781.
- Cesari, M., A. Luchetti, M. Passamonti, V. Scali y B. Mantovani (2003). Polymerase chain reaction amplification of the Bag320 satellite family reveals the ancestral library and past gene conversion events in *Bacillus rossius* (Insecta Phasmatodea). *Gene* **312**: 289-295.
- Clack, J. A. (2007). Devonian climate change, breathing, and the origin of the tetrapod stem group. *Integrative and Comparative Biology*.
- Cohen, S. y D. Segal (2009). Extrachromosomal circular DNA in eukaryotes: possible involvement in the plasticity of tandem repeats. *Cytogenet Genome Res* **124**(3-4): 327-338.
- Curtis, S. E. y M. T. Clegg (1984). Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Molecular biology and evolution* **1**(4): 291-301.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation* **128**(2): 231-240.
- del Bosque, M. E., R. Navajas-Perez, J. L. Panero, A. Fernandez-Gonzalez y M. A. Garrido-Ramos (2011). A satellite DNA evolutionary analysis in the North American endemic dioecious plant *Rumex hastatulus* (Polygonaceae). *Genome* **54**(4): 253-260.

BIBLIOGRAFÍA

- Doglio, S., D. Seglie, L. Kabiri y M. Delfino (2010). *Description of the advertisement call and release calls of Bufo (Epidalea) brongersmai Hoogmoed 1972, new distribution records and an attempt to a "total" bibliography*. 15th European Congress of Herpetology, Kusadasi, Turkey.
- Dover, G. A., T. Strachan, E. S. Coen y S. D. Brown (1982). Molecular drive. *Science* **218**(4577): 1069.
- Dover, G. A. y D. Tautz (1986). Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **312**(1154): 275-289.
- Dubois, A. y R. Bour (2010). The nomenclatural status of the nomina of amphibians and reptiles created by Garsault (1764), with a parsimonious solution to an old nomenclatural problem regarding the genus Bufo (Amphibia, Anura), comments on the taxonomy of this genus, and comments on some nomina created by Laurenti (1768). *Zootaxa* **2447**(1): 52.
- Dubois, A. y A. Ohler (1999). Asian and Oriental toads of the Bufo melanostictus, Bufo scaber and Bufo stejnegeri groups (Amphibia, Anura): a list of available and valid names and redescription of some name-bearing types. *Journal of South Asian Natural History* **4**(2): 133-180.
- Duro, G., V. Izzo y R. Barbieri (1993). Methods for recovering nucleic acid fragments from agarose gels. *J Chromatogr* **618**(1-2): 95-104.
- Elgar, G. y T. Vavouri (2008). Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends in Genetics* **24**(7): 344-352.
- Evans, B. J., R. A. Pyron y J. J. Wiens (2012). Polyploidization and sex chromosome evolution in amphibians. *Polyploidy and genome evolution*, Springer: 385-410.
- Falconi, R., D. Dalpiaz y F. Zaccanti (2007). Morphological aspects of gonadal morphogenesis in Bufo bufo (Amphibia anura): Bidder's organ differentiation. *The Anatomical Record* **290**(7): 801-813.
- Farias, C., S. Carvalho-e-Silva y L. de Brito-Gitirana (2002). Bidder's organ of Bufo ictericus: a light and electron microscopy analysis. *Micron* **33**(7): 673-679.
- Feliciello, I., J. Parazajder, I. Akrap y Đ. Ugarković (2013). First evidence of DNA methylation in insect Tribolium castaneum: environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. *Epigenetics* **8**(5): 534-541.
- Feliciello, I., O. Picariello y G. Chinali (2005). The first characterisation of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. *Gene* **349**: 153-164.
- Feliciello, I., O. Picariello y G. Chinali (2006). Intra-specific variability and unusual organization of the repetitive units in a satellite DNA from Rana dalmatina: molecular evidence of a new mechanism of DNA repair acting on satellite DNA. *Gene* **383**: 81-92.
- Ferree, P. M. y D. A. Barbash (2009). Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in Drosophila. *PLoS Biol* **7**(10): e1000234.
- Fitzgerald, D. J., G. L. Dryden, E. C. Bronson, J. S. Williams y J. N. Anderson (1994). Conserved patterns of bending in satellite and nucleosome positioning DNA. *Journal of Biological Chemistry* **269**(33): 21303-21314.

BIBLIOGRAFÍA

- Foote, D., J. Wiley, M. Little y J. Meyne (1991). Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenetic and Genome Research* **57**(4): 196-199.
- Freda, J. (1991). The effects of aluminum and other metals on amphibians. *Environmental Pollution* **71**(2): 305-328.
- Fredga, K. (1977). Chromosomal changes in vertebrate evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **199**(1136): 377-397.
- Frost, D. (2009). Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 5.3 (12 February 2009). American Museum of Natural History, New York.
- Frost, D. R. (2016). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. *Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>*. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D. R., T. Grant, J. Faivovich, R. H. Bain, A. Haas, C. F. Haddad, R. O. De Sá, A. Channing, M. Wilkinson, *et al.* (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of natural History*: 1-291.
- Fry, K. y W. Salser (1977). Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* **12**(4): 1069-1084.
- García-Muñoz, E., F. Guerrero y G. Parra (2009). Effects of copper sulfate on growth, development, and escape behavior in *Epidalea calamita* embryos and larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology* **56**(3): 557-565.
- García-Muñoz, E., F. Guerrero y G. Parra (2010). Intraspecific and interspecific tolerance to copper sulphate in five Iberian amphibian species at two developmental stages. *Archives of environmental contamination and toxicology* **59**(2): 312-321.
- García-Porta, J., S. Litvinchuk, P.-A. Crochet, A. Romano, P. Geniez, M. Lo-Valvo, P. Lymberakis y S. Carranza (2012). Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palaearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**(1): 113-130.
- Garrido-Ramos, M., M. Jamilena, R. Lozano, C. Ruiz Rejon y M. Ruiz Rejon (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenetic and Genome Research* **65**(4): 233-237.
- Garrido-Ramos, M. A., R. de la Herran, M. Jamilena, R. Lozano, C. Ruiz Rejon y M. Ruiz Rejon (1999). Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Mol Phylogenet Evol* **12**(2): 200-204.
- Gemayel, R., M. D. Vences, M. Legendre y K. J. Verstrepen (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual review of genetics* **44**: 445-477.
- Gigantino, R., G. Aprea, T. Capriglione, F. Guarino, G. Odierna, G. Odierna y F. Guarino (2002). Caratteristiche genomiche dei vertebrati ectotermi del Parco del Matese. I. Risultati dell'analisi cromosomica. *I vertebrati ectotermi del Parco Regionale del Matese. Napoli*: 29-55.
- Glinka, S., D. De Lorenzo y W. Stephan (2006). Evidence of gene conversion associated with a selective sweep in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* **23**(10): 1869-1878.

BIBLIOGRAFÍA

- Gojobori, T., W.-H. Li y D. Graur (1982). Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes and functional genes. *Journal of Molecular Evolution* **18**(5): 360-369.
- Gomez-Mestre, I., S. Kulkarni y D. R. Buchholz (2013). Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PloS One* **8**(12): e84266.
- Graybeal, A. (1997). Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zoological Journal of the Linnean Society* **119**(3): 297-338.
- Gregory, T. R., J. A. Nicol, H. Tamm, B. Kullman, K. Kullman, I. J. Leitch, B. G. Murray, D. F. Kapraun, J. Greilhuber, *et al.* (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research* **35**(suppl 1): D332-D338.
- Greilhuber, J. (1977). Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theoretical and Applied Genetics* **50**(3): 121-124.
- Haaf, T., H. Weis, D. Schindler y M. Schmid (1984). Specific silver staining of experimentally undercondensed chromosome regions. *Chromosoma* **90**(2): 149-155.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hanada, H. (2002). G and C banding show structural differences between the Z and W chromosomes in the frog *Buergeria buergeri*. *Hereditas* **136**(2): 151-154.
- Hellsten, U., R. M. Harland, M. J. Gilchrist, D. Hendrix, J. Jurka, V. Kapitonov, I. Ovcharenko, N. H. Putnam, S. Shu, *et al.* (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* **328**(5978): 633-636.
- Hikosaka, A. y A. Kawahara (2004). Lineage-specific tandem repeats riding on a transposable element of MITE in *Xenopus* evolution: a new mechanism for creating simple sequence repeats. *Journal of molecular evolution* **59**(6): 738-746.
- Hikosaka, A., E. Yokouchi y A. Kawahara (2000). Extensive amplification and transposition of a novel repetitive element, Xstir, together with its terminal inverted repeat in the evolution of *Xenopus*. *Journal of molecular evolution* **51**(6): 554-564.
- Hoogmoed, M. (1972). On a new species of toad from southern Morocco. *Zool. Meded* **47**: 49-67.
- Horz, W. y W. Altenburger (1981). Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic Acids Res* **9**(3): 683-696.
- Hummel, S., W. Meyerhof, E. Korge y W. Knochel (1984). Characterization of highly and moderately repetitive 500 bp Eco RI fragments from *Xenopus laevis* DNA. *Nucleic acids research* **12**(12): 4921-4938.
- I., C. B. (2014). A Checklist of North American Amphibians and Reptiles: The United States and Canada by M. J. Fouquette and Alain Dubois. *The Quarterly Review of Biology* **89**(4): 404-405.
- Jabbari, K. y G. Bernardi (2004). Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene* **333**: 143-149.
- Jabbari, K., S. Cacciò, J. P. P. de Barros, J. Desgrès y G. Bernardi (1997). Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. *Gene* **205**(1): 109-118.

BIBLIOGRAFÍA

- Jimenez, R., M. Burgos y R. Diaz de La Guardia (1988). A study of the Ag-staining significance in mitotic NORs. *Heredity* **60**(1): 125-127.
- Jungfer, K.-H., V. K. Verdade, J. Faivovich y M. T. Rodrigues (2016). A new species of spiny-backed treefrog (*Osteocephalus*) from Central Amazonian Brazil (Amphibia: Anura: Hylidae). *Zootaxa* **4114**(2): 171-181.
- Keinath, M. C., V. A. Timoshevskiy, N. Y. Timoshevskaya, P. A. Tsonis, S. R. Voss y J. J. Smith (2015). Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing. *Scientific reports* **5**: 16413.
- Kejnovsky, E., Z. Kubat, J. Macas, R. Hobza, J. Mracek y B. Vyskot (2006). Retand: a novel family of gypsy-like retrotransposons harboring an amplified tandem repeat. *Molecular Genetics and Genomics* **276**(3): 254-263.
- King, K., J. Jobst y V. Hemleben (1995). Differential homogenization and amplification of two satellite DNAs in the genus *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Journal of molecular evolution* **41**(6): 996-1005.
- Konkel, M. K. y M. A. Batzer (2010). *A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome*. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Kuhn, G. C., F. M. Sene, O. Moreira-Filho, T. Schwarzacher y J. S. Heslop-Harrison (2008). Sequence analysis, chromosomal distribution and long-range organization show that rapid turnover of new and old pBuM satellite DNA repeats leads to different patterns of variation in seven species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *Chromosome Research* **16**(2): 307-324.
- Kulkarni, S., I. Gomez-Mestre, C. Moskalik, B. Storz y D. Buchholz (2011). Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *Journal of evolutionary biology* **24**(11): 2445-2455.
- Kuramoto, M. (1990). A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bulletin of Fukuoka University of Education* **39**: 83-127.
- Kwet, A., M. Di-Bernardo y R. Maneyro (2006). First record of *Chaunus achavali* (Anura, Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for the identification of the species in the *Chaunus marinus* group. *Iheringia. Série Zoologia* **96**(4): 479-485.
- Lam, B. S. y D. Carroll (1983). Tandemly repeated DNA sequences from *Xenopus laevis*: I. Studies on sequence organization and variation in satellite 1 DNA (741 base-pair repeat). *Journal of molecular biology* **165**(4): 567-585.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, *et al.* (2001). International human genome sequencing consortium. *Nature* **409**: 860-921.
- Legendre, M., N. Pochet, T. Pak y K. J. Verstrepen (2007). Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome research* **17**(12): 1787-1796.
- Lin, C. y Y. Li (2006). Chromosomal distribution and organization of three cervid satellite DNAs in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*). *Cytogenetic and genome research* **114**(2): 147-154.
- Lippman, Z. y R. Martienssen (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**(7006): 364-370.

BIBLIOGRAFÍA

- Lorite, P., J. A. Carrillo, A. Tinaut y T. Palomeque (2004). Evolutionary dynamics of satellite DNA in species of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Gene* **332**: 159-168.
- Luchetti, A., M. Marini y B. Mantovani (2006). Non-concerted evolution of the RET76 satellite DNA family in *Reticulitermes* taxa (Insecta, Isoptera). *Genetica* **128**(1-3): 123-132.
- Maciel, N. M., R. G. Collevatti, G. R. Colli y E. F. Schwartz (2010). Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**(2): 787-797.
- Makino, S. (1932). Notes on the chromosomes of *Rana temporaria* L. and *Bufo sachalinensis* (Nikolski). *Proceedings of the Imperial Academy* **8**(1): 23-26.
- Malik, H. S. y S. Henikoff (2001). Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* **157**(3): 1293-1298.
- Mantovani, B. (1998). Satellite sequence turnover in parthenogenetic systems: the apomictic triploid hybrid *Bacillus lynceorum* (Insecta, Phasmatodea). *Molecular biology and evolution* **15**(10): 1288-1297.
- Martínez-Solano, I. y E. G. Gonzalez (2008). Patterns of gene flow and source-sink dynamics in high altitude populations of the common toad *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **95**(4): 824-839.
- Matsui, M., P. Yambun y A. Sudin (2007). Taxonomic relationships of *Ansonia anotis* Inger, Tan, and Yambun, 2001 and *Pedostibes maculatus* (Mocquard, 1890), with a description of a new genus (Amphibia, Bufonidae). *Zoological science* **24**(11): 1159-1166.
- Meštrović, N., M. Plohl y P. Castagnone-Sereno (2009). Relevance of satellite DNA genomic distribution in phylogenetic analysis: a case study with root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne*. *Molecular phylogenetics and evolution* **50**(1): 204-208.
- Mestrovic, N., M. Plohl, B. Mravinac y D. Ugarkovic (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*--experimental evidence for the "library" hypothesis. *Mol Biol Evol* **15**(8): 1062-1068.
- Miller, S., D. Dykes y H. Polesky (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**(3): 1215.
- Miller, W. J., J. F. McDonald, D. Nouaud y D. Anxolabéhère (2000). Molecular domestication—more than a sporadic episode in evolution. *Transposable Elements and Genome Evolution*, Springer: 197-207.
- Miura, I. (1995). Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. *Caryologia* **48**(2): 123-136.
- Miura, I., H. Ohtani, H. Hanada, Y. Ichikawa, A. Kashiwagi y M. Nakamura (1997). Evidence for two successive pericentric inversions in sex lampbrush chromosomes of *Rana rugosa* (Anura: Ranidae). *Chromosoma* **106**(3): 178-182.
- Miura, I., H. Ohtani, A. Kashiwagi, H. Hanada y M. Nakamura (1996). Structural differences between XX and ZW sex lampbrush chromosomes in *Rana rugosa* females (Anura: Ranidae). *Chromosoma* **105**(4): 237-241.
- Modi, W. S., S. Ivanov y D. S. Gallagher (2004). Concerted evolution and higher-order repeat structure of the 1.709 (satellite IV) family in bovids. *Journal of molecular evolution* **58**(4): 460-465.

BIBLIOGRAFÍA

- Morescalchi, A. (1973). Amphibia. *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*: 233-348.
- Morescalchi, A. (1977). Phylogenetic aspects of karyological evidence. *Major patterns in vertebrate evolution*, Springer: 149-167.
- Morescalchi, A. y V. Serra (1974). DNA renaturation kinetics in some paedogenetic Urodeles. *Experientia* **30**(5): 487-489.
- Morrison, C. y J. M. Hero (2003). Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology* **72**(2): 270-279.
- Mravinac, B. y M. Plohl (2007). Satellite DNA junctions identify the potential origin of new repetitive elements in the beetle *Tribolium madens*. *Gene* **394**(1): 45-52.
- Mravinac, B. y M. Plohl (2010). Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. *Molecular biology and evolution* **27**(8): 1857-1867.
- Mravinac, B., E. Ugarkovic, D. Franjevic y M. Plohl (2005). Long inversely oriented subunits form a complex monomer of *Tribolium brevicornis* satellite DNA. *J Mol Evol* **60**(4): 513-525.
- Murray, B. G., M. D. Bennett y K. R. W. Hammett (1992). Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and in-situ hybridization. *Heredity* **68**(5): 473-478.
- Nanda, I., M. Fugate, C. Steinlein y M. Schmid (2009). Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetic and genome research* **122**(3-4): 396-400.
- Nardi, I., R. Batistoni, S. Marracci y B. Lanza (1999). Repetitive DNA components of the large *Hydromantes* genome: phylogenetic and molecular aspects. *Herpetologica*: 131-139.
- Navajas-Perez, R. y A. H. Paterson (2009). Patterns of tandem repetition in plant whole genome assemblies. *Mol Genet Genomics* **281**(6): 579-590.
- Nei, M. y A. Hughes (1992). *Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci*. 11th histocompatibility workshop and conference. Oxford University Press, Oxford.
- Nei, M. y A. P. Rooney (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 121-152.
- Nijman, I., M. Otsen, E. Verkaar, C. De Ruijter, E. Hanekamp, J. Ochieng, S. Shamshad, J. Rege, O. Hanotte, *et al.* (2003). Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity* **90**(1): 10-16.
- Nijman, I. J. y J. A. Lenstra (2001). Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats. *Journal of Molecular Evolution* **52**(4): 361-371.
- Nishioka, M., H. Hanada, I. Miura y M. Ryuzaki (1994). Four kinds of sex chromosomes in *Rana rugosa*. *Scientific report of the Laboratory for Amphibian Biology* **13**: 1-34.
- Nishioka, M., I. Miura y K. Saitoh (1993). Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. *Scientific report of the Laboratory for Amphibian Biology* **12**: 55-81.
- Obara, Y., K. Kogame y K. Saitoh (1975). Distribution pattern of the constitutive heterochromatin in the chromosomes of *Bufo bufo japonicus* Schlegel. *Chromosome Inf. Serv*(18): 15-17.

BIBLIOGRAFÍA

- Odierna, G., G. Aprea, T. Capriglione, S. Castellano y E. Balletto (2004). Evidence for chromosome and Pst I satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (Amphibia, Anura). *Chromosome Res* **12**(7): 671-681.
- Odierna, G., G. Aprea, T. Capriglione, S. Castellano y E. Balletto (2007). Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palearctic green toads (Amphibia, Anura). *Journal of biosciences* **32**(4): 763-768.
- Odierna, G., G. Aprea, T. Capriglione, P. Parisi, O. Arribas y M. A. Morescalchi (1999). Chromosomal and molecular analysis of some repeated families in *Discoglossus Otth*, 1837 (Anura, Discoglossidae): taxonomic and phylogenetic implications.
- Ogata, M., Y. Hasegawa, H. Ohtani, M. Mineyama y I. Miura (2008). The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. *Heredity* **100**(1): 92-99.
- Ohler, A. y A. Dubois (2016). The identity of the South African toad *Sclerophrys capensis* Tschudi, 1838 (Amphibia, Anura). *PeerJ* **4**: e1553.
- Ohno, S. (2013). *Sex chromosomes and sex-linked genes*, Springer Science & Business Media.
- Okada, N. (1991). SINEs. *Current opinion in genetics & development* **1**(4): 498-504.
- Okumura, K., R. Kiyama y M. Oishi (1987). Sequence analyses of extrachromosomal Sau3A and related family DNA: analysis of recombination in the excision event. *Nucleic Acids Res* **15**(18): 7477-7489.
- Olmo, E. (1973). Quantitative variations in the nuclear DNA and phylogenesis of the Amphibia. *Caryologia* **26**(1): 43-68.
- Olmo, E., T. Capriglione y G. Odierna (1989). Genome size evolution in vertebrates: trends and constraints. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **92**(3): 447-453.
- Olmo, E. y A. Morescalchi (1978). Genome and cell sizes in frogs: a comparison with salamanders. *Experientia* **34**(1): 44-46.
- Ortega-Andrade, H. M. y H. J. Valencia (2012). A New Species of the *Pristimantis frater* Group (Anura: Strabomantidae) from the Eastern Evergreen Lowland Forests Of Ecuador. *Herpetologica* **68**(2): 244-255.
- Palomeque, T. y P. Lorite (2008). Satellite DNA in insects: a review. *Heredity (Edinb)* **100**(6): 564-573.
- Pardue, M. L. (1974). *Localization of repeated DNA sequences in Xenopus chromosomes*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pasero, P., N. Sjakste, C. Blettry, C. Got y M. Marilley (1993). Long-range organization and sequence-directed curvature of *Xenopus laevis* satellite 1 DNA. *Nucleic acids research* **21**(20): 4703-4710.
- Pathak, D. y S. Ali (2012). Repetitive DNA: a tool to explore animal genomes/transcriptomes. *Functional genomics. InTech, Published*: 155-180.
- Pauly, G. B., D. M. Hillis y D. C. Cannatella (2004). The history of a Nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the Nearctic toads (*Bufo*). *Evolution* **58**(11): 2517-2535.

BIBLIOGRAFÍA

- Pérez, M., C. Rojo y M. T. Encinas (2009). MODELOS ANIMALES EN ANFIBIOS/AMPHIBIAN ANIMAL MODELS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* **3**(2): 315.
- Picariello, O., I. Feliciello, R. Bellinello y G. Chinali (2002). S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome* **45**(1): 63-70.
- Picariello, O., I. Feliciello y G. Chinali (2016). S1 satellite DNA repetitive units display identical structure and overall variability in all Anatolian brown frog taxa. *Genetica* **144**(1): 47-57.
- Pinkel, D., T. Straume y J. W. Gray (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(9): 2934-2938.
- Piontkivska, H., A. P. Rooney y M. Nei (2002). Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family. *Molecular biology and evolution* **19**(5): 689-697.
- Plohl, M. (2010). Those mysterious sequences of satellite DNAs. *Periodicum biologorum* **112**(4): 403-410.
- Plohl, M., A. Luchetti, N. Meštrović y B. Mantovani (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene* **409**(1): 72-82.
- Plohl, M., N. Mestrovic, B. Bruvo y Đ. Ugarković (1998). Similarity of structural features and evolution of satellite DNAs from *Palorus subdepressus* (Coleoptera) and related species. *Journal of molecular evolution* **46**(2): 234-239.
- Plohl, M., N. Mestrovic y B. Mravinac (2012). Satellite DNA evolution. *Genome Dyn* **7**: 126-152.
- Pontecorvo, G., B. De Felice y M. Carfagna (2000). A novel repeated sequence DNA originated from a Tc1-like transposon in water green frog *Rana esculenta*. *Gene* **261**(2): 205-210.
- Portik, D. M. y T. J. Papenfuss (2015). Historical biogeography resolves the origins of endemic Arabian toad lineages (Anura: Bufonidae): Evidence for ancient vicariance and dispersal events with the Horn of Africa and South Asia. *BMC evolutionary biology* **15**(1): 1.
- Pramuk, J. B. (2006). Phylogeny of south American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological journal of the Linnean society* **146**(3): 407-452.
- Pramuk, J. B. y F. Kadivar (2003). A new species of Bufo (Anura: Bufonidae) from southern Ecuador. *Herpetologica* **59**(2): 270-283.
- Pramuk, J. B., T. Robertson, J. W. Sites y B. P. Noonan (2008). Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography* **17**(1): 72-83.
- Pruitt, K. D., G. R. Brown, S. M. Hiatt, F. Thibaud-Nissen, A. Astashyn, O. Ermolaeva, C. M. Farrell, J. Hart, M. J. Landrum, *et al.* (2014). RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic acids research* **42**(D1): D756-D763.
- Pyron, R. A. y J. J. Wiens (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol* **61**(2): 543-583.
- Quesada del Bosque, M. E., I. López-Flores, V. N. Suárez-Santiago y M. A. Garrido-Ramos (2013). Differential spreading of *Hinfl* satellite DNA variants during radiation in Centaureinae. *Annals of botany* **112**(9): 1793-1802.

BIBLIOGRAFÍA

- Recuero, E., D. Canestrelli, J. Vörös, K. Szabó, N. Poyarkov, J. Arntzen, J. Crnobrnja-Isailovic, A. Kidov, D. Cogălniceanu, *et al.* (2012). Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular phylogenetics and evolution* **62**(1): 71-86.
- Reik, W., W. Dean y J. Walter (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**(5532): 1089-1093.
- Roco, Á. S., A. W. Olmstead, S. J. Degitz, T. Amano, L. B. Zimmerman y M. Bullejos (2015). Coexistence of Y, W, and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(34): E4752-E4761.
- Roelants, K., D. J. Gower, M. Wilkinson, S. P. Loader, S. D. Biju, K. Guillaume, L. Moriau y F. Bossuyt (2007). Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(3): 887-892.
- Royo, V., A. Martínez-Lage, M. Giovannotti, A. M. González-Tizón, P. N. Cerioni, V. C. Barucchi, P. Galán, E. Olmo y H. Naveira (2015). Evolutionary dynamics of two satellite DNA families in rock lizards of the genus *Iberolacerta* (Squamata, Lacertidae): different histories but common traits. *Chromosome Research* **23**(3): 441-461.
- Rooney, A. P. (2004). Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. *Molecular biology and evolution* **21**(9): 1704-1711.
- Rosati, C., D. Cardone, I. Feliciello y G. Chinali (1993). Cloning and preliminary characterization of two satellite-like DNA sequences from the brown frog *Rana graeca*. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* **70**(8-9): 207-212.
- Rosbash, M., P. J. Ford y J. O. Bishop (1974). Analysis of the C-value paradox by molecular hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**(9): 3746-3750.
- Rudd, M. K., G. A. Wray y H. F. Willard (2006). The evolutionary dynamics of α -satellite. *Genome research* **16**(1): 88-96.
- Rufas, J. S., G. Gimenez-Martin y P. Esponda (1982). Presence of a chromatid core in mitotic and meiotic chromosomes of grasshoppers. *Cell Biol Int Rep* **6**(3): 261-267.
- Saba, N., N. Tripathi y W. K. Balwan (2014). Karyotypic Study of the Common Indian Toad, *Duttaphrynus Melanostictus*, from Jammu and Kashmir, India. *Researchers World* **5**(1): 61.
- Sambrook, J. y D. Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scaia, M. F., E. Regueira, A. G. Sassone, M. C. Volonteri y N. R. Ceballos (2011). The Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **315**(8): 439-446.
- Schmid, M. (1978). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* **66**(4): 361-388.
- Schmid, M. (1980). Chromosome-banding in Amphibia. 5. Highly differentiated ZW-ZZ sex-chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (ANURA, RANIDAE). *Chromosoma* **80**(1): 69-96.

BIBLIOGRAFÍA

- Schmid, M. (1983). Evolution of sex chromosomes and heterogametic systems in Amphibia. *Mechanisms of Gonadal Differentiation in Vertebrates*, Springer: 13-22.
- Schmid, M., S. Ohta, C. Steinlein y M. Guttenbach (1993). Chromosome banding in Amphibia. *Cytogenetic and Genome Research* **62**(4): 238-246.
- Schmid, M., C. Steinlein, R. Friedl, C. De Almeida, T. Haaf, D. Hillis y W. Duellman (1990). Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). *Chromosoma* **99**(6): 413-423.
- Schneider, H. y U. Sinsch (2004). Calls and calling behaviour of the common toad, *Bufo b. bufo*. Hungary and a comparison with the advertisement call of the giant toad, *Bufo b. spinosus*. *Zeitschrift für Feldherpetologie* **11**: 187-201.
- Segal, S., M. Garner, M. F. Singer y M. Rosenberg (1976). In situ hybridization of repetitive monkey genome sequences isolated from defective simian virus 40 DNA. *Cell* **9**(2): 247-257.
- Session, A. M., Y. Uno, T. Kwon, J. A. Chapman, A. Toyoda, S. Takahashi, A. Fukui, A. Hikosaka, A. Suzuki, *et al.* (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* **538**(7625): 336-343.
- Shiura, H., A. Okamoto, H. Sasaki y K. Abe (2014). Whole-mount MeFISH: a novel technique for simultaneous visualization of specific DNA methylation and protein/RNA expression. *PLoS One* **9**(4): e95750.
- Smith, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**(4227): 528-535.
- Smith, H. M. y D. Chiszar (2006). Dilemma of name-recognition: why and when to use new combinations of scientific names. *Herpetological Conservation and Biology* **1**(1): 6-8.
- Spasic-Boskovic, O., T. Lazic, G. Bilic y M. Vujosevic (2000). C-banding karyotypes and location of nor's in the toad species *bufo bufo* and *bufo viridis* from yugoslavia. *Genetika* **32**(2): 145-153.
- Speybroeck, J., W. Beukema y P.-A. Crochet (2010). A tentative species list of the European herpetofauna (Amphibia and Reptilia)—an update. *Zootaxa* **2492**: 1-27.
- Stöck, M., C. Dufresnes, S. N. Litvinchuk, P. Lymberakis, S. Biollay, M. Berroneau, A. Borzée, K. Ghali, M. Ogielska, *et al.* (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**(1): 1-9.
- Stöck, M., R. Gunther y W. Bohme (2001). Progress towards a taxonomic revision of the Asian *Bufo viridis* group: Current status of nominal taxa and unsolved problems (Amphibia: Anura: Bufonidae). *ZOOLOGISCHE ABHANDLUNGEN-STAATLICHES MUSEUM FÜR TIERKUNDE IN DRESDEN* **51**(2): 253-319.
- Stöck, M., D. K. Lamatsch, C. Steinlein, J. T. Epplen, W.-R. Grosse, R. Hock, T. Klapperstück, K. P. Lampert, U. Scheer, *et al.* (2002). A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature genetics* **30**(3): 325-328.
- Stöck, M., C. Moritz, M. Hickerson, D. Frynta, T. Dujsebayaeva, V. Eremchenko, J. R. Macey, T. J. Papenfuss y D. B. Wake (2006). Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Mol Phylogenet Evol* **41**(3): 663-689.

BIBLIOGRAFÍA

- Stöck, M., M. Schmid, C. Steinlein y W. R. Grosse (1999). Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions.
- Stöck, M., C. Steinlein, D. K. Lamatsch, M. Scharl y M. Schmid (2005). Multiple origins of tetraploid taxa in the Eurasian *Bufo viridis* subgroup. *Genetica* **124**(2-3): 255-272.
- Stöck, M., J. Ustinova, D. K. Lamatsch, M. Scharl, N. Perrin y C. Moritz (2010). A vertebrate reproductive system involving three ploidy levels: hybrid origin of triploids in a contact zone of diploid and tetraploid Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Evolution* **64**(4): 944-959.
- Strachan, T., D. Webb y G. A. Dover (1985). Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *The EMBO journal* **4**(7): 1701.
- Straus, N. A. (1971). Comparative DNA renaturation kinetics in amphibians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 799-802.
- Sudman, P. D. y I. F. Greenbaum (1989). Visualization of kinetochores in mammalian meiotic preparations and observations of argentophilic differences between mitotic and meiotic kinetochores. *Genome* **32**(3): 380-382.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* **75**(1): 304-306.
- Sun, Y.-B., Z.-J. Xiong, X.-Y. Xiang, S.-P. Liu, W.-W. Zhou, X.-L. Tu, L. Zhong, L. Wang, D.-D. Wu, et al. (2015). Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(11): E1257-E1262.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**(12): 2725-2729.
- Teruel, M., F. Ruíz-Ruano, J. Marchal, A. Sánchez, J. Cabrero, J. P. Camacho y F. Perfectti (2014). Disparate molecular evolution of two types of repetitive DNAs in the genome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **112**(5): 531-542.
- Tone, M., N. Nakano, E. Takao, S. Narisawa y S. Mizuno (1982). Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, *Gallus g. domesticus*. *Chromosoma* **86**(4): 551-569.
- Ugarkovic, D. (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO reports* **6**(11): 1035-1039.
- Ugarkovic, D. y M. Plohl (2002). Variation in satellite DNA profiles--causes and effects. *Embo j* **21**(22): 5955-5959.
- Ullerich, F.-H. (1965). Notizen: Unterschiede im DNS-Gehalt der Genome von *Bufo bufo* und *Bufo viridis*. *Zeitschrift für Naturforschung B* **20**(7): 720-722.
- Ullerich, F.-H. (1966). Karyotyp und DNS-Gehalt von *Bufo bufo*, *B. viridis*, *B. bufo* *B. viridis* und *B. calamita* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* **18**(2): 316-342.
- Van Bocxlaer, I., S. D. Biju, S. P. Loader y F. Bossuyt (2009). Toad radiation reveals into-India dispersal as a source of endemism in the Western Ghats-Sri Lanka biodiversity hotspot. *BMC Evol Biol* **9**: 131.

BIBLIOGRAFÍA

- Van Bocxlaer, I., S. P. Loader, K. Roelants, S. D. Biju, M. Menegon y F. Bossuyt (2010). Gradual Adaptation Toward a Range-Expansion Phenotype Initiated the Global Radiation of Toads. *Science* **327**(5966): 679-682.
- Varriale, A. y G. Bernardi (2006). DNA methylation in reptiles. *Gene* **385**: 122-127.
- Vershinin, A., E. Alkhimova y J. Heslop-Harrison (1996). Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. *Chromosome Research* **4**(7): 517-525.
- Vié, J.-C., C. Hilton-Taylor, C. Pollock, J. Ragle, J. Smart, S. N. Stuart y R. Tong (2009). The IUCN Red List: a key conservation tool. *Wildlife in a changing world—An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*: 1.
- Vinogradov, A. E. (1998). Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. *Cytometry* **31**(2): 100-109.
- Volpe, E. P. y B. M. Gebhardt (1968). Somatic chromosomes of the marine toad, *Bufo marinus* (Linné). *Copeia*: 570-576.
- Wake, D. B. y V. T. Vredenburg (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(Supplement 1): 11466-11473.
- Wakeley, J. (1994). Substitution-rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Molecular Biology and Evolution* **11**(3): 436-442.
- Wakeley, J. (1996). The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in ecology & evolution* **11**(4): 158-162.
- Walsh, J. B. (1987). Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* **115**(3): 553-567.
- Wallace, H., G. Badawy y B. Wallace (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **55**(6-7): 901-909.
- Wang, S., M. D. Lorenzen, R. W. Beeman y S. J. Brown (2008). Analysis of repetitive DNA distribution patterns in the *Tribolium castaneum* genome. *Genome biology* **9**(3): 1.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey y P. Chomczynski (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**(3): 474-476, 478-481.
- Wu, Z. y E. Tan Anming Zhao (1987). Cytogenetic Studies on Four Species of *Amolopa* in the Hengduan Range. *Acta Genetica Sinica* **1**: 010.
- Xiao, J. H., C. E. Chen, W. C. Zhang, C. X. Nie y B. W. Li (1993). [Comparison of the repetitive DNA sequences between *Paragonimus westermani* and *Pagumogonimus skrjabini* from six areas]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* **11**(4): 279-281.
- Yadav, J. y R. Pillai (1975). Somatic karyotypes of 2 species of Indian frogs (ANURA, AMPHIBIA). *Cytobios* **13**(50-5): 109-115.
- Yang, Y. (1993). *Karyological studies on amphibians in China*. Proceeding of First Asian Herpetological Meeting, Forestry Press.

BIBLIOGRAFÍA

Zurawski, G., M. T. Clegg y A. H. Brown (1984). The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics* **106**(4): 735-749.

CURRICULUM VITAE

Guzman Katerina

ID: X2879753S Date of birth: 01-11-1985 Sex: Female. Nationality: Belarus

Current residence: Valencia, Spain

Contacts: e-mail: katerina_guzmnan@iislafe.es telephone number: +34 685540369



Academic Achievements:

- **Master's degree in BASIC AND APPLIED RESEARCH IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY.** Master with Distinction of Quality (MCD2006-00068). University of Jaen Title issue date: 22th of February, 2011
- **DEGREE IN BIOLOGY** University of Jaen Title issue date: 25th of September, 2009

Work experience:

- Scientific Research professional group 5, associated with the Project: "Transferencia horizontal de factores de virulencia contenidos en elementos genéticos móviles de *Staphylococcus aureus* en pacientes con fibrosis quística / Horizontal transference of virulence factors contained in mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients" SAF2014-56986-R MINECO Severe Infection Research Group IIS La Fe (Healthy Research Institute La Fe), Project Manager M^aAngeles Tormo Más: From: Dec 2015 to cur
- Scientific Research professional group 5, associated with the Project: "I+D Ramón y Cajal" MEC RYC-2012-12246" Severe Infection Research Group IIS La Fe (Healthy Research Institute La Fe), Project Manager M^aAngeles Tormo Más: From: Jun 2015 to Dec 2015
- Scientific Research professional group 5 associated with the Project: "Microbial Comparative Genomics, Consolider-Ingenio 2010" Severe Infection Research Group IIS La Fe (Healthy Research Institute La Fe), Project Manager M^aAngeles Tormo Más: From: Oct 2014 to May 2015

CURRICULUM VITAE

- Scientific Research professional group A, associated with the Project: “Microbial Comparative Genomics, Consolider-Ingenio 2010” IVIA , Project Manager M^aAngeles Tormo Más: From: Sep 2013 to Sep 2014
- Scientific Research associated project: “Alterations in testicular development associated with Down syndrome and their relationship to their high frequency of germ cell tumors: a study of mouse models of Down syndrome” P07-CVI-02486 FEDER (PAIDI 2007-2013) From: Mar 2010 to Jan 2013. Project Manager: Monica Bullejos Martin
- Remunerated traineeship in Clinical Analysis laboratory PROLAB C.B., 150 h in: Hematology, Clinical Biochemistry, Immune-serology, Microbiology and Clinical Parasitology. From Jul to Sep of 2007.

Experimental techniques

- Technologies of Molecular and Cellular Biology: PCR, PCRq, Southern-blot, Western-blot, Cloning,
Primers design...
Bioinformatics analysis of the sequences.
Transformation, obtaining and expression of bacterial mutants.
Experience in bacteriophage manipulation techniques.
- Technologies of analysis Cytogenetic.
- Bioinformatics analysis of phylogenetic relationships
- Cellular cultures; establishment of primary lines of cultures.
- Samples genotyping and processing.
- Technologies of analysis of Expression and Proteomics.
- Experience in handling with animals of experimentation (Amphibians and Murinos).
- Experience in techniques and analysis of Repetitive DNA (tandem and dispersed)

Other merits:

- Internal Student contributor in Genetics area, Experimental Sciences Faculty, University of Jaen from Sep of 2007 – to Feb 2011
- Bioinformatics:
 - Sequence analysis programs: ClustalW, MUSCLE, BioEdit, NEBcutter, and SnapGen.
 - Phylogenetic analysis programs: MEGA, PHYLIP.
 - Data bases: BLAST, XenBase, RepBase.

Languages and Complementary Courses:

- Spanish, Russian: Bilingual.
- English (High read, oral and intermediate written).
- **Bioinformatics course** in science research. Univ. of Jaen (20 h).
- **Emerging Diseases course** in a Global world. Univ. of Jaen (21 h).
- Scientific workshop **“Secuenciación, Captura de Secuencia, PCR a Tiempo Real y Discovery / Sequencing, Sequence capture, Real Time PCR and discovery”** Roche Life Science (5 h)
- Scientific course **“Antibióticos y resistencias: un reto recurrente / Antibiotics and resistances: a recurrent challenge”** UIMP (18 h)

Participation in Research Projects:

- Scientific program for Society Challenges “Transferencia horizontal de factores de virulencia contenidos en elementos genéticos móviles de *Staphylococcus aureus* en pacientes con fibrosis quística / Horizontal transference of virulence factors contained in mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients” SAF2014-56986-R MINECO Severe Infection Research Group IIS La Fe (Healthy Research Institute La Fe), Project Manager M^aAngeles Tormo Más: From: Dec 2015 to cur
- Project of Excellence, awarded by the Ministry of Innovation, Science and Enterprise of “Junta de Andalucía” with the title “Alterations in testicular development associated with Down syndrome and their relationship to their high frequency of germ cell tumors: a study of mouse models of Down syndrome” P07-CVI-02486 FEDER (PAIDI 2007-2013) Duration: 3 years. The responsible person for project: Monica Bullejos Martin.
- Project “Study of sex determination and gonad differentiation in amphibians: Bufo bufo and Xenopus tropicalis as model organisms”. University of Jaen; 2006-2009 The responsible person for project: Monica Bullejos Martin.
- Teaching Innovation Project “Stimulus learning of Plant Physiology course by creating new teaching materials using Virtual Teaching Platform”. University of Jaen; 2006-2007 responsible person for project: Maria Del Pilar Cordovilla Palomares.

Grants:

- **EMBO Short-Term Fellowship** for visit of the laboratory of Ruth Massey in Bath, UK, for 90 days.

CURRICULUM VITAE

- General Grant for **University Studies** Ministry of Education and Science of Spain: 2008/2009, 2007/2008; 2006/2007, 2005/2006 University of Jaen.
- General Grant for **Master Studies** Ministry of Education and Science of Spain: 2009/2010 University of Jaen.
- Grant for **Introduction to Research**. University of Jaen: 2008/2009 Department of Experimental Biology

Participation in Seminars, Conferences and Scientific Outreach Events:

- I National Congress of Biomedicine of Young Investigators 28-29 of November 2016 Valencia “**Characterization of virulence factors contained in mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis.**” Authors: Guzmán K, Cervera M, Ziemite M, Martí M, Hernández A, Tormo-Mas MA.
- XI Molecular microbiology reunion (Spanish Society of Microbiology) 6-8 de Septiembre 2016 Sevilla. Poster: “**Transferencia horizontal de factores de virulencia contenidos en elementos genéticos móviles de *Staphylococcus aureus* en pacientes con fibrosis quística / Horizontal transference of virulence factors contained in mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients**” Authors: Guzmán K, Cervera M, Ziemite M, Martí M, Hernández A, Tormo-Mas MA.
“**Mobilization mechanism of pathogenicity islands by endogenous phages of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients**” Authors: Ziemite M, Guzmán K, Cervera M, Gonzalez E, Tormo-Mas MA.
“**Las islas de patogenicidad regulan genes cromosómicos de virulencia en *Staphylococcus aureus* / Regulation of chromosome virulence gen by pathogenicity island in *Staphylococcus aureus***” Authors: Cervera M, Guzmán K, Ziemite M, Toledo A, Lasa I, Tormo-Mas MA.
- Virus of microbes 2016 – EMBO 18-22 of July Liverpool. Poster: “**Mobilization mechanism of pathogenicity islands by endogenous phages of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients**” Authors: Cervera M, Guzmán K, Ziemyte M, Tormo-Mas MA
- XIII National congress of Spanish Society of Cystic fibrosis 5 – 7 Nov 2015. Presentation “**Transferencia horizontal de factores de virulencia contenidos en elementos genéticos móviles de *Staphylococcus aureus* en pacientes con fibrosis quística / Horizontal transference of virulence factors contained in mobile genetic elements of**

- Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients**” Authors: **Guzmán K**, Cervera M, Pastor A, Hernández A, Salavert M, Ontanga JL, Tormo-Mas MA y Solé A. Best presentation award.
- **X Molecular microbiology reunion (Spanish Society of Microbiology) 2014** Presentation / Poster Titles “**Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* son capaces de controlar factores de virulencia cromosómicos / Pathogenicity island of *Staphylococcus aureus* are capable to control chromosome virulence factors**” Authors: **Guzmán K**, Cervera M, Toledo-Arana A, Lasa I, Tormo-Mas MA.
 - **VII Cytogenetic Seminar:** Vigo (Spain) 27 - 30 Jun. 2012. “**Conference on Cytogenetic and molecular analysis of a satellite DNA family, BamHI- 800, in several species of the family Bufonidae**” Authors: **Guzmán K**, Roco A, Bullejos M.
 - **XXXVIII Congress SEG-2011 (Spanish Society of Genetics)** Murcia (Spain) 21-23 Sept. 2011
Book of Abstracts / Poster Titles: “**Caracterización de una nueva familia de ADN satélite (BamHI-800) en la familia *Bufonidae* / Characterization of a new family of satellite DNAs (BamHI-800) in the family Bufonidae**” Authors: **Guzmán K.**, Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“**Caracterización de una nueva familia de ADN satélite (BamHI-210) en el género *Bufo* / Characterization of a new family of satellite DNAs (BamHI-210) in the genus Bufo**”
Authors: **Guzmán K.**, Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“**Caracterización de un nuevo ADN satélite (AluI-300) en la especie *Bufo bufo* / Characterization of a new satellite DNA (AluI-300) in the species Bufo bufo**” Authors: Martínez-Padilla A, **Guzmán K.**, Roco A, Bullejos M.
 - **XVIII International Chromosome Conference** 29 Aug - 2 Sept 2011 Manchester U.K.
“**Characterization of a novel satellite DNA in the family *Bufonidae***” Authors: **Guzmán K**, Martínez-Padilla A, Roco A, Bullejos M.

“**Characterization of a new satellite DNA family in *Bufo bufo***” Authors: Martínez-Padilla A, **Guzmán K**, Roco A, Bullejos M.
 - **IV Cytogenetic Seminar** Córdoba (Spain) 29 Sep-2 Oct. 2010. “**En busca de los cromosomas sexuales de *X. tropicalis* y *B. bufo* / Searching of sex chromosomes *Xenopus tropicalis* and *Bufo bufo***”. Authors: Roco A, **Guzmán K**, Martínez-Padilla A, Bullejos M.
 - **XXXVII Congress SEG-2009 (Spanish Society of Genetics)** Málaga (Spain) 29 Sept. - 2 Oct. 2009. Book of Abstracts / Poster Titles: **Reversión sexual B6-YDOM: fondo genético y**

diferenciación gonadal / B6-YDOM sexual Reversal: genetic background and gonadal differentiation. Authors: Bullejos M, **Guzmán K**, Martínez-Padilla A, Díaz de la Guardia Quiles R, Marchal JA, Sánchez A y Roco A.