

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS DE LA ORGANIZACION GENOMICA DE LA SALAMANDRA  
PLETHODONTIDAE Bolitoglossa subpalmata (ANFIBIA, URODELA)

Tesis sometida a  
consideración de la Comisión del  
Programa de Estudios de Posgrado en Biología  
para optar al grado de *Magister Scientiae*

JOSE ROBERTO ALEGRIA COTO

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica

1988

## DEDICATORIA

A la memoria de mi madre, por su espíritu de sacrificio y abnegación. A mi esposa, por su paciencia y comprensión durante el desarrollo de esta investigación. A mi hermana Elizabeth, por seguir los pasos de mi madre. A mis hijos y al resto de la familia, con mucho cariño.

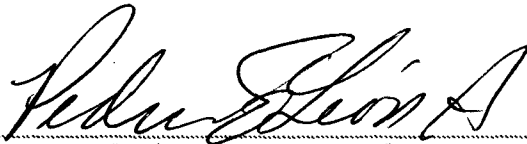
## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sentido agradecimiento al Dr. Pedro León Azofeifa, especialmente por su alta calidad humana y de investigador, así como por haber mantenido siempre las palabras de aliento y el aporte de trabajo personal en el desarrollo de esta investigación. A los Lic. Sandra Silva, Lic. Marielos Mora, Lic. Liz Taylor, Sr. Manuel Sánchez y Dr. Yoshimichi Kosuka, por su constante ayuda. A mis compañeros del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, por su colaboración en diferentes aspectos de este trabajo, así como por el afecto que siempre me brindaron. Al M. Sc. María Isabel Morales Zurcher, por esa comprensión que siempre mantuvo para buscarle solución a las dificultades que le presenté.

También deseo agradecer a la Universidad de El Salvador (UES), al Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), al Consejo Superior Universitario Centroamericano (CSUCA) y a la Universidad de Costa Rica (UCR), por haberme permitido realizar este estudio. Además, deseo resaltar la profunda gratitud que les profeso: al Lic. José Wester Del Cid Ayala; al Dr. Peter Sprechmann y Sra.; a Erika de Seyfried; y a Ana Luz Alfaro; a todos ellos, por haberme brindado su colaboración personal, su cariño y su amistad.

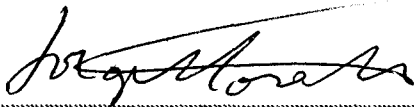
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología, de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*.

APROBADA POR:



Dr. Pedro León Azofeifa

Director de Tesis



Dr. Jorge Mora Urpi

Miembro del Tribunal



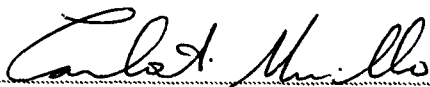
Dra. Pilar Ramírez Fonseca

Miembro del Tribunal



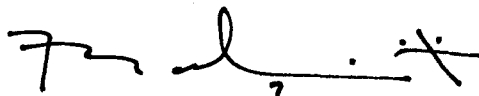
M. Sc. María Isabel Morales Zürcher

Directora del Programa de Estudios de Posgrado en Biología



Dr. Carlos A. Murillo Viquez

Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



José Roberto Alegria Coto

Candidato

## INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA	-ii-
AGRADECIMIENTOS	-iii-
RESUMEN	-vii-
LISTA DE CUADROS	-ix-
LISTA DE FIGURAS	-x-
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	5
MATERIALES Y METODOS	19
1.- Obtención de la muestra	19
2.- Extracción de ADN	20
3.- Cuantificación del ADN	22
4.- Digestión con enzimas de restricción	23
5.- Análisis electroforético del ADN cortado	25
6.- Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa	26
7.- Análisis en gradientes de densidad en sales de cesio	27
8.- Ligación	28
9.- Transformación	29
10.- Selección	30
11.- Preparación de plásmidos en gran escala	31
12.- Transferencia de ADN sobre membranas de nitrocelulosa	33
13.- Preparación de sondas biotiniladas para hibridación	34
14.- Hibridaciones en papel de nitrocelulosa	37
15.- Mapas físicos de los fragmentos de restricción	39
16.- Procedimientos citológicos	39

RESULTADOS	43
1.- Cromosomas de <u>B subpalmata</u>	43
1.1.- Medidas cariológicas	43
1.2.- Bando de los cromosomas	43
2.- Análisis del ADN de <u>B subpalmata</u>	48
2.1.- Análisis del ADN de <u>B subpalmata</u>	48
2.2.- Digestión con enzimas de restricción	48
3.- Análisis de la familia repetitiva <i>A7UI</i> en pUC13	56
3.1.- Clonaje de la familia <i>A7UI</i> en pUC13	56
3.2.- Mapa físico de las clonas pBsA6 y pBsA23	61
3.3.- Análisis de la transferencia de Southern	67
DISCUSION	74
LITERATURA CITADA	79

## RESUMEN

La salamandra B. subpalmata presenta un genoma con un altísimo contenido de ADN (58 pg/C) y cromosomas extraordinariamente grandes. El patrón de Bando C produce bandas heterocromáticas centroméricas en todos los 13 cromosomas del cariotipo. Al hacer un trazado del UA-5 LKB de los gradientes de cesio con actinomicina D y sin actinomicina D, no se observa la presencia de un ADN satélite definido.

Las enzimas de restricción *A7uI* y *HaeIII* producen bandas de secuencias repetitivas en geles de agarosa con el ADN purificado del núcleo de los glóbulos rojos. La banda de secuencias repetitivas más consistente y definida, producida por la digestión de *A7uI* y de aproximadamente de 440 pb, se clonó por ligación de puntas romas en el sitio *SmaI* del vector pUC13. De las diferentes clonas producidas, las cuales se denominaron como pBsA (plásmido, Bolitoglossa subpalmata, de la familia *A7u*), se escogió para análisis posteriores la pBsA6 y la pBsA23. Por medio de electroforesis en geles analíticos de 6 % de poliacrilamida, del ADN de esos plásmidos y con el fragmento de restricción generado por la digestión doble con *BamHI* y *EcoRI*, se elaboraron los mapas de restricción de los insertos de ambas clonas. El inserto de 707 pb de la pBsA6 presenta tres sitios de corte con *HaeIII* y uno con *HaeII* y se sugiere un sitio de corte con *BamHI*, en tanto que el inserto de 470 pb de la pBsA23 presenta dos sitios de corte con *HaeIII* y uno con *HaeII*.

Se estima que las secuencias de ADN clonadas son altamente repetidas y que se encuentran al menos en unos 6 millones de copias en el genoma de esta salamandra.

Es de hacer notar que para realizar la investigación que originó esta tesis, se emplearon muchas de las técnicas básicas que ahora se utilizan en Biotecnología.



LISTA DE CUADROS

CUADROS		PAGINA
I	Datos cuantitativos de cromosomas de <u>B. subpalmata</u> obtenidos como promedio de tres juegos de cromosomas de metafase mitótica de epitelio intestinal.	44

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PAGINA
1	Cromosomas mitóticos de <u>B. subpalmata</u> obtenidos de epitelio intestinal.	45
2	Idiograma con el tamaño relativo y la posición del centrómero sobre cada cromosoma de la salamandra <u>B. subpalmata</u> .	46
3	Cromosomas mitóticos de epitelio intestinal de <u>B. subpalmata</u> que muestran la presencia de heterocromatina centromérica por medio del bandeo C.	47
4	Cromosomas meióticos en diplotene, de macerado de testículo de <u>B. subpalmata</u> mostrando regiones centroméricas con bandeo C.	49
5	Trazado del UA-5 LKB de los gradientes de CsCl con actinomicina D (A) y sin actinomicina D (B).	50
6	Esquema de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción tipo II usadas en esta investigación.	52
7	Gel electroforésis en agarosa al 1.2 %, con digestiones de ADN de <u>B. subpalmata</u> usando enzimas de restricción de puntas pegajosas y de puntas romas.	53
8	Gel electroforesis en agarosa al 0.8 %, con ADN de <u>B. subpalmata</u> digerido con <u>A7uI</u> y <u>HaeIII</u> .	54
9	Digestión de ADN de <u>B. subpalmata</u> con <u>A7uI</u> , separado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.	55
10	Separación del gel de agarosa al 0.8 %, de la banda más conspicua y consistente de 440 pb, producida por <u>A7uI</u> en ADN de <u>B. subpalmata</u> .	57
11	Determinación de los pesos moleculares de bandas producidas por la digestión de ADN de <u>B. subpalmata</u> con <u>A7uI</u> .	58

12	Gel analítico al 0.8 % de agarosa, en el que se comparan los tamaños de los insertos de las clonas pBsA1 a pBsA15.	60
13	Esquema del pUC13 en el que se muestra el sitio de clonación múltiple y las diferentes enzimas que lo cortan.	62
14	Gel analítico de poliacrilamida al 6 %, con 6 de las 9 clonas de pBsA digeridas con <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	63
15	Digestión del ADN de la clona pBsA6 con <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI en gel de agarosa al 1.2%.	64
16	Aislamiento de las bandas producidas por la doble digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI que corresponden al inserto de ADN de <i>B. subpalmata</i> en la clona pBsA6.	65
17	Doble digestión del ADN de la clona pBsA23 con <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI en gel de agarosa al 1.2 %.	66
18	Gel analítico de 6 % de poliacrilamida, de la clona pBsA6 digerida con diferentes enzimas de restricción.	68
19	Gel analítico de 6 % de poliacrilamida, de la clona pBsA23 digerida con diferentes enzimas de restricción.	69
20	Mapa de restricción del plásmido pBsA6.	70
21	Mapa de restricción del plásmido pBsA23.	71
22	Gel de agarosa al 0.8 % con una serie de tres diferentes muestras de ADN.	72
23	Transferencias de Southern a papel de nitrocelulosa del gel de la fig 22.	73

## INTRODUCCION:

Las salamandras se clasifican en nueve familias, ocho de las cuales son encontradas exclusivamente en regiones templadas de Europa, Asia y Norteamérica (Wake, 1966; Wake & Lynch, 1976). Solamente el supergénero Bolitoglossa que comprende once géneros y aproximadamente 138 especies neotropicales, de la altamente derivada familia Plethodontidae, ha penetrado en latitudes tropicales del Nuevo Mundo (Wake & Lynch, 1976; Wake & Elias, 1983).

La actual distribución de la Tribu Bolitoglossini comprende el Oeste de Norteamérica, Centroamérica y parte de Suramérica. En Europa, en la región del Mediterráneo, los Bolitoglossini están representados por dos especies del género Hydromantes con orígenes enigmáticos de disyunción (Wake et al., 1978), aunque recientes estudios morfológicos y electroforéticos han subdividido las razas geográficas europeas de Hydromantes, en seis especies (Nardi et al., 1986). Bolitoglossa es el género que tiene más especies en el Orden Caudata, ya que contiene cerca de un cuarto de todas las especies conocidas de salamandras (Wake & Lynch, 1976), y el de más amplio rango de distribución, que va casi continuamente desde las tierras bajas del este de San Luis Potosí, en el norte de México en Norte América, hasta el Sur de las tierras bajas del Amazonas, del Sur de

Perú, las montañas de Cochabamba, Bolivia y el Sur de Minas Gerais, Brasil en Sur América (Wake & Elias, 1983).

Se postula que la especiación de los Plethodontidae ha ido acompañada por un aumento dramático en la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) en el conjunto haploide de cromosomas o valor C (masa de ADN por núcleo espermático dada en picogramos (pg)), que es una medida del tamaño del genoma (Larson, 1984). Un aumento en el valor C, también ocurre en las Plethodon en Norteamérica (Macgregor, 1982), como en los Bolitoglossini que invadieron las regiones tropicales de América, por lo que este hecho podría tener relación significativa con su especiación. John et al., (1986) han presentado evidencia que indica que el tamaño de las bandas C distales (teloméricas) se han incrementado subsecuentemente a la introducción en Australia, de los saltamontes del género Atractomorpha, por lo que consideran que hay buenas bases para concluir que ese incremento ha involucrado la ampliación de las secuencias de ADN altamente repetidas presentes dentro de las bandas C.

Es de hacer notar que los cariotipos de las especies de Bolitoglossa que se encuentran en el trópico, son similares en sus longitudes relativas, índices centroméricos y promedio de los brazos de los cromosomas correspondientes con números haploides de 13. Se supone que el juego de 13 cromosomas en la tribu Bolitoglossini se

deriva por delección o translocación del más pequeño del juego de 14 cromosomas, número que prevalece en los otros géneros de la familia (León & Kezer, 1978).

En Centro América se ha comunicado la presencia de Bolitoglossa subpalmata Boulenger en la Cordillera Central, las márgenes superiores de la Meseta Central y de la Cordillera de Talamanca en Costa Rica y en la región de Campo Boquete en Panamá (Vial, 1968). B. subpalmata, es abundante en el Cerro de la Muerte (Costa Rica) y de fácil captura (Vial 1966). Según Macgregor (1982), B. subpalmata tiene 58 pg de valor C. Debido a este alto valor C, los 13 pares de cromosomas que posee son muy grandes y fáciles de manipular. Además, esta especie tiene glóbulos rojos nucleados exentos de mitocondrias, lo cual garantiza que el ADN extraído no estará contaminado con ADN mitocondrial.

#### OBJETIVO GENERAL:

Investigar la presencia de familias repetidas en el ADN de B. subpalmata y su distribución en el genoma, tanto a nivel de secuencia, como en el cromosoma mismo, así como las implicaciones evolutivas que esto pueda tener.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1- Determinar la estructura del cariotipo de B. subpalmata y localización de bandas heterocromáticas en el mismo, que normalmente se asocian con familias de ADN

repetitivo, para lo cual se hará uso de técnicas de tinción y diferenciación de cromosomas.

2- Aislar, purificar y cortar con diferentes enzimas de restricción, ADN de B. subpalmata para buscar a través de análisis electroforéticos en geles de agarosa y acrilamida, la presencia de familias de secuencias repetidas de ADN. Centrifugar en gradientes de cesio el ADN total para buscar secuencias "satélite".

3- Clonar las secuencias repetidas, por ligación en plásmidos de alta replicación (pUC13) y amplificarlas en cepas adecuadas de Escherichia coli.

4- Elaborar mapas físicos de los fragmentos de ADN clonados usando enzimas de restricción y análisis electroforéticos en geles de acrilamida teñidos con plata.

5- Hibridación de sondas de ADN biotinilado a papel de nitrocelulosa para corroborar su origen.

## REVISION DE LITERATURA:

El genoma de las células eucariónicas está formado por diferentes clases de secuencias de ADN, que pueden ser clasificadas en: 1) secuencias únicas como los ácidos ribonucleicos (ARN) mensajeros; 2) secuencias moderadamente repetidas, de  $10^3$  a  $10^5$  copias como los genes de histonas y de proteínas ribosomales, secuencias para ARN ribosomal y otras no codificantes; y 3) las secuencias altamente repetidas con miles de copias (Jelinek & Schmid, 1982).

El ADN altamente repetido está compuesto por secuencias que varían de 2 hasta al menos 2350 pares de bases (pb), lo cual ha sido determinado en sus secuencias de consenso, a partir de fragmentos de restricción obtenidos por el uso de endonucleasas (enzimas de restricción) en genomas de algunos invertebrados y vertebrados (Gabor, 1982). A causa de la repetición de sus nucleótidos, el contenido de estos puede diferir del promedio de nucleótidos de la banda principal de ADN, por lo que algunos de esos grupos de secuencias repetidas tienen densidades de flotación en gradientes de cloruro de cesio diferentes de la mayoría del ADN de un organismo, y pueden ser observadas como satélites de la banda principal de ADN. Por eso, comúnmente se les conoce como ADN satélite (Jelinek & Schmid, 1982; Baldwin & Macgregor, 1985).



El ADN satélite se caracteriza por poseer repeticiones ubicadas una detrás de la otra en tandem, de una unidad de secuencias de ADN, que pueden ser simples como la repetición A-T en el cangrejo Cancer borealis (Skinner, 1977); secuencias de siete nucleótidos de los satélites de Drosophila virilis (Baldwin & Macgregor, 1985), u otras mucho más grandes y complejas tales como los pares de 2.07 kilobases (Kb) del ADN satélite del cangrejo de tierra de las Bermudas Geocarcinus lateralis (La Marca et al., 1981) y el ADN satélite de ternero con unidades repetitivas de 1.4 Kb y 2.35 Kb (Roizes & Pages, 1982).

Las secuencias de ADN satélite pueden localizarse por medio del bandeo C debido a que son usualmente concentradas en partes heterocromáticas (heterocromatina constitutiva) de los cromosomas (Singer, 1982), ya sea en los centrómeros, telómeros o en sitios intercalares (Barsachi-Pilone, et al., 1986). Algunos ejemplos bien conocidos son los satélites cromocéntricos de Drosophila, los satélites centroméricos de ratón y de la salamandra Plethodon cinereus (Macgregor & Kezer, 1971, Baldwin & Macgregor, 1985), el ADN distal o telomérico altamente repetido de Atractomorpha similis (John et al., 1986), y el ADN altamente repetido del cromosoma heterocromático 1 del tritón crestado (Triturus cristatus) (Macgregor, 1979).

La correlación entre ADN altamente repetitivo y ADN satélite, fue reconocida por primera vez en ADN de ratón, del cual se aisló por centrifugación en gradiente de densidad, el primer ADN satélite (Kit, 1961). La presencia del ADN satélite ha sido confirmada en una gran variedad de animales y plantas, aunque no siempre los ADN repetitivos forman satélites separados de la banda principal en gradientes de cesio (Barsachi-Pilone et al., 1986).

Macgregor & Sessions (1986), proponen un modelo operativo del mecanismo y dirección de los cambios evolutivos en el ADN altamente repetitivo y heterocromatina, que está basado en los patrones de variación observados en Triturus. Ellos proponen que este ADN tiende a acumularse localmente a través de algunos mecanismos que generan duplicación en tandem, como la replicación saltatoria y el intercambio desigual entre cromátidas hermanas, así como por la movilidad de nucleótidos y la conversión de secuencias. Su crecimiento es concentrado en las regiones de los centrómeros, donde aparentemente la replicación tardía es tolerada más fácilmente. El primer paso es un rápido crecimiento del ADN repetido en tandem el cual eventualmente produce una masa citológicamente visible de la heterocromatina centromérica. Subsecuentemente, se producen pequeños rearrreglos cromosómicos al azar, inclusive inversiones e intercambios desiguales en la vecindad de los centrómeros que causan

rompimiento y dispersión de bloques de heterocromatina. Esto resulta en la formación de bandas C pericéntricas y eventualmente en la pérdida de las bandas C centroméricas. Posteriores rearrreglos cromosómicos llevan a la progresiva dispersión de la heterocromatina, lejos de las regiones pericéntricas, hacia afuera de los brazos y a los telómeros de los cromosomas.

El proceso total según Macgregor & Sessions (1986), puede suceder una y otra vez en rápida sucesión, como una ola traslapándose con otra, o puede acaecer una vez sobre un largo período de tiempo evolutivo, involucrando familias independientes de ADN altamente repetitivo. La localización dispersa del ADN heterocromático puede ser más estable que las localizadas en los centrómeros; una vez establecida en los brazos de los cromosomas, una familia de ADN altamente repetitivo, puede persistir, mientras que su cambio es más rápido en los centrómeros.

En conjunción con esos cambios en los principales grupos de ADN altamente repetidos, según Macgregor & Sessions (1986), puede haber numerosos cambios de tamaño muy pequeño, como los "minisatélites" comunicados por Jeffreys et al (1985), en ADN humano, los cuales sufren rápida fluctuación en localizaciones intersticiales. Esos minisatélites representan una clase de "ruido de fondo", que no permiten el apareamiento de los principales satélites, los cuales crecen

en enormes proporciones y se hacen heterocromáticos en las regiones centroméricas.

Aunque la mayoría del ADN heterocromático se mantiene transcripcionalmente inactivo, ya ha sido demostrado su transcripción en asas de cromosomas plumulados, durante la fase de oogénesis, en I. cristatus (Varley et al., 1980; Baldwin & Macgregor, 1985), en Notophthalmus viridescens (Díaz et al., 1981) y en Xenopus laevis (Jamrich et al., 1983). Según Singer (1982), el ADN heterocromático presenta replicación tardía en la fase S del ciclo celular y tiene baja replicación en cromosomas politénicos. Sin embargo, es difícil asignar una función celular a los transcritos de heterocromatina, o mostrar que sean una consecuencia de la lectura a través, de genes estructurales adyacentes (Varley et al., 1980; Díaz et al., 1981; Díaz & Gall, 1985), por lo que si es esto último lo que sucede, su significado puede permanecer oscuro hasta que el fenómeno de lectura a través, sea mejor entendido (Macgregor & Sessions, 1986).

Las secuencias repetidas presentan dos patrones típicos de dispersión: el patrón caracterizado por Xenopus y el de Drosophila. El patrón de Xenopus es típico por poseer: 1) algo más de la mitad de las secuencias de copias únicas con más de 1000 pb, intercaladas con secuencias repetidas cortas de 100-500 pb, formando una corta periodicidad de dispersión (Salinas, 1986), denominadas según

Singer (1982), como secuencias repetidas de corta intercalación (SINES), y por Bouchard (1986), como de corto término, y 2) el resto de las secuencias únicas intercaladas con secuencias repetidas de larga intercalación (LINES) (Singer, 1982), o de largo término (Bouchard, 1986). El patrón de Drosophila presenta secuencias únicas de 10 Kb, intercaladas con familias de unidades repetidas de 6-7 Kb de largo (Deininger & Daniels, 1986). Se considera que el patrón de secuencias repetidas de Xenopus, es más común que el de Drosophila.

Los prototipos de las secuencias llamadas SINES, incluyen a la familia *A7U* en primates, formadas cuando se corta el ADN de éstos con la enzima de restricción *A7UI* y las familias B1 y B2 en roedores (Singer & Skowronski, 1985), las cuales se reconocieron cuando se observó que estaban presentes en el ADN moderadamente repetido en secuencias de ARN heterogéneo nuclear de reasociación rápida, en pequeñas unidades discretas de ARNs y en unidades dispersas de transcripción de ARN polimerasa III (Rogers, 1985; Deininger & Daniels, 1986). Las secuencias *A7U* de humanos, aparentemente descienden de los genes ARN 7SL altamente conservados en todas las especies (Deininger & Daniels, 1986). Se ha demostrado que algunas familias SINES de mamíferos se derivan de genes de ARN de transferencia (Deininger & Daniels, 1986).

Solamente una familia de LINES ha sido identificada en cada una de las especies de primates y genomas de ratón investigadas (Adams et al., 1980; Cheng & Schildkraut, 1980; Manuelidis, 1980; Manuelidis, 1982; Meunier-Rotival et al., 1982; Shafit-Zagordo et al., 1982; Fanning, 1983; Grimaldi & Singer, 1983; Grimaldi, et al., 1984). Las familias de las diferentes especies son homólogas entre sí, en considerables porciones del ADN.

Dos familias LINES, la familia de los primates llamada *Kpnl* y la relacionada familia de los ratones llamada variablemente *BanHI* o MIF1, están ahora mejor caracterizadas (Singer & Skowronski, 1985), y se ha visto que hay heterogeneidad en su composición, en tanto que la familia LINES de rata es más homogénea (D'Ambrosio et al., 1986). También ha sido detectada en perros, conejos y en otros mamíferos la presencia de familias LINES relacionadas (Katzir et al., 1985, Demers, et al., 1986). Por esa razón, Voliva et al. (1983), han simplificado la nomenclatura, y aunque esa familia se encuentre en diferentes especies la denominaron L1 por familia LINES 1; dos letras como sufijo identifican el género y la especie, letras y números adicionales identifican miembros individuales de la familia.

Búsqueda para otras familias L1 adicionales en primates (Sun et al., 1984) y en ratones (Bennett et al., 1984; Bennett & Hastie, 1984) no ha dado resultados

positivos. Singer & Skowronski (1985), consideran que es probable que cada una de las especies de mamíferos tiene solamente una muy abundante familia LINES y que todas las familias de las diferentes especies están relacionadas. En cuanto a su origen, la familia LINES (L1) de mamíferos, parece que se deriva directamente de un gene que codifica para una proteína de identidad desconocida transcrito por ARN polimerasa II (Deininger & Daniels, 1986).

Al examinar los genomas de diversos organismos mediante fraccionamientos de los ADNs nucleares nativos, por centrifugación en gradientes con sales de cesio, y en presencia de ligandos de ADN, tales como  $Ag^+$  o bis acetomercurimetil] dioxano (BAMD), Bernardi et al., (1985), desarrollaron el concepto de genoma compartamentalizado para definir a grandes segmentos de ADN con similares densidades de flotación. Esos estudios sugieren que el ADN nuclear de los vertebrados es un mosaico muy largo con regiones uniformes en su composición, llamadas isócoras (del griego: iso, igual; coros, región) (Cuny et al., 1981).

Según Yunis (1981), las isócoras corresponden a las bandas cromosómicas Giemsa y reversa, que tienen un tamaño promedio de 1250 kb. Las bandas cromosómicas son alternativamente ricas en G + C y A + T, replicándose el ADN respectivamente en la fase temprana y en la fase tardía del ciclo celular (Comings, 1978). Goldman et al (1984), ha

hipotetizado que las diferencias en el tiempo de la replicación y diferencias en la composición de nucleótidos, pueden reflejar a su vez, diferencias en la estructura y función de los genes localizados en esas bandas.

Las isócoras pueden pertenecer a cuatro o cinco clases: dos componente ligeros que pueden ser o no resueltos en algunos genomas de animales de sangre caliente y dos o tres componentes pesados presentes en todos los mamíferos. Las dos isócoras livianas, menos ricas en guanina (G) y citosina (C) son las más abundantes en animales de sangre caliente y constituyen un poco más de la mitad del genoma; en tanto que, las isócoras ricas en G-C, constituyen tan sólo un 12 por ciento del total (Salinas, 1986). Sin embargo, esos ADNs son más heterogéneos que los correspondientes ADNs de vertebrados de sangre fría y contienen cantidades más largas de componentes de ADN ricos en G + C (Thiery et al., 1976).

Bernardi et al. (1985), consideran que la composición compartimentalizada del genoma de vertebrados de sangre caliente: 1) determina la composición de bases de los genes y los codones usados; y ha sido encontrado que los exones ricos en G-C están localizados principalmente en las isócoras ricas en G-C y que los exones ricos en A-T se encuentran en las isócoras ricas en A-T (Filipski, 1987), además, afecta los blancos de integración de las secuencias



móviles y virales, y 2) tiene una función en la determinación del tiempo de replicación del ADN.

Filipski (1987), según su hipótesis, asegura que las diferencias en composición de las isócoras provienen de los diferentes sesgos mutacionales causados en la reparación del ADN por las ADN polimerasas alfa y beta, debido a que ambas tienen diferente fidelidad de transcripción, siendo la beta ADN polimerasa más propensa al error que la alfa ADN polimerasa, según Kunke1 & Loeb (1981) esto ocurre al menos in vitro.

Se ha encontrado que genes activos y las secuencias que los flanquean, son reparados 5 veces más rápidamente, que las lesiones en el ADN transcripcionalmente inactivo, lo cual es realizado por la beta ADN polimerasa (Filipski, 1987). Por lo tanto, de acuerdo con la hipótesis de Filipski (1987), la reparación de las lesiones del ADN en las estructuras de la cromatina relajada, es asegurada principalmente por la beta ADN polimerasa, en tanto que al menos algunas de las lesiones que persisten más largo tiempo en la cromatina condensada, son reparadas durante la replicación del ADN por la alfa ADN polimerasa. Esta hipótesis implica que la acumulación de mutaciones durante la evolución (reloj molecular), no es uniforme a través del genoma, aún en regiones de ADN en las cuales no se ha visto

que lleven una información genética específica (Filipski, 1987).

Se postula que los diferentes patrones de compartimentalización, en los diversos organismos, presentan un rango evolutivo extremadamente amplio, tan lejano como el del genoma mitocondrial y que estos patrones desempeñan un trabajo general en la función y estructura del genoma. Esto indica que los diferentes niveles de isócoras G-C, sus diferentes promedios de CpG a GpC y las diferencias acompañantes en sitios potenciales de metilación, se encuentran unidas y asociadas: 1) con diferencias en el ADN, 2) con la estructura del genoma, 3) con la regulación de la expresión génica (Bernardi, et al., 1985; Salinas, 1986) y 4) con la estructura de los genes (Filipski et al., 1987).

La función activa o pasiva de la variación del tamaño del genoma en los procesos evolutivos, ha sido fuente de gran controversia. Cavalier-Smith (1978, 1980), propuso que el tamaño del genoma es altamente adaptativo y que es controlado precisamente por fuerzas selectivas. Doolittle & Sapienza (1980) y Orgel & Crick, (1980), consideran que las secuencias que aumentan el tamaño de los genomas, como las altamente repetidas, presentan tendencias ortogenéticas que llevan al sistema genómico hacia una dirección particular, por lo cual denominaron al ADN altamente repetido como "ADN

egofista" o "ADN parásito", ya que suponen que su única finalidad es sobrevivir dentro de los genomas. Dover (1980) y Smith (1980), refutan esos conceptos, aunque hasta ahora, el intercambio de ideas no haya aportado pruebas concluyentes que favorezcan a alguna de dichas hipótesis.

Se ha sugerido que los ADNs repetidos, cumplen funciones tales como: 1) control de la expresión génica (Davidson & Britten, 1979; Jelinek et al., 1980); 2) participación de transcritos de SINES (ARN U1) en la maduración de ARN mensajeros; o que SINES como los de la familia *A7u* en primates, sirven como orígenes de replicación del ADN (Jelinek et al., 1980; Jelinek & Schmid, 1982); 3) función estructural y organizativa de los cromosomas (Bouchard, 1982); 4) sitios favorables para la integración de ADN exógeno, como los ADNs virales (Bernardi et al., 1985; Kato et al., 1986). Según Jelinek & Schmid (1982), la constancia en la estructura de mucho del ADN repetido sugiere que éste podría tener una función celular, debido a que ha sido preservado en sus localizaciones cromosómicas durante la evolución reciente de primates.

Una función potencial para ciertos miembros de las familias LINES, es la de actuar como "silenciadores" de la expresión de algunos genes, al retener la actividad transcripcional dentro de sus dominios (Laimins et al., 1986; Zuckerkandl, 1986). Los LINES también pueden tener la función

de actuar como elementos transformantes (Cooper *et al.*, 1986; Rogers, 1986), probablemente como consecuencia de alteraciones estructurales de regiones funcionales que ellos incluyen (Zuckerkindl, 1986). También, hay evidencia preliminar que sugiere que los segmentos (LINES) de la familia L1, pueden favorecer rearrreglos dentro de unidades L1 entre regiones genómicas cercanas (Singer & Skowronski, 1985). Debido a que, repetidamente las secuencias L1 ocurren en las uniones, y definen los bordes de dos diferentes repeticiones directas de genes humanos para las inmunoglobulinas (IgG) e (IgA) y dos para los alfa interferón. Por lo tanto, las secuencias L1 podrían realizar alguna función en los procesos de duplicación propuestos para esos genes (Singer & Skowronski, 1985).

Según Bernardi & Bernardi (1986), las secuencias nucleotídicas de todos los genomas están sujetas a fuerzas que: 1) afectan en igual extensión a las secuencias codificantes y no codificantes; 2) influyen en la estructura, función del genoma, transcripción y formación de proteínas; 3) son el resultado de presiones medio ambientales y, 4) tienen un importante control sobre la fijación de mutaciones. Todo lo cual implica que: 1) las secuencias no codificantes están asociadas con funciones biológicas; 2) el fenotipo del organismo comprende dos componentes, el fenotipo clásico que corresponde al "producto génico" y el "fenotipo

genómico", el cual es definido por las fuerzas que actúan sobre su composición; y 3) es la selección natural y no los eventos al azar, la que realiza la función más importante en la evolución del genoma (Bernardi & Bernardi, 1986).

## MATERIALES Y METODOS:

## 1.- OBTENCION DE LA MUESTRA:

La salamandra Bolitoglossa subpalmata Boulenger, habita una amplia faja altitudinal en el Cerro de la Muerte, ubicado en la margen Norte de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica, 9° 35' Latitud Norte, 83° 45' Longitud Oeste. Su distribución vertical se extiende desde aproximadamente los 1375 metros sobre el nivel del mar, hasta sobre los 2300 metros. Sin embargo, debajo de los 2400 metros, su distribución es localizada, aunque las densidades son bastante bajas (Vial, 1968). Se ha observado que en el Cerro de la Muerte, esta especie no ocupa habitats con biotemperaturas superiores a los 15.2° C (Vial, 1968).

Las formaciones de vegetación tropical habitadas característicamente por B. subpalmata comprenden el Bosque Húmedo Montano Bajo y el Bosque Pluvial Montano (Vial, 1968). Esta salamandra nocturna utiliza, en el Cerro de la Muerte, grietas en el barro, depresiones bajo troncos, piedras y musgo, así como el habitat arbóreo. Según Vial, (1968), la distribución de la especie parece determinada principalmente por límites térmicos, por lo que el tipo de habitat escogido es influido por la temperatura y la humedad tanto en relación a la altitud como a las variaciones estacionales.

Los especímenes estudiados en este trabajo se

obtuvieron de la población que se encuentra en el Cerro de La Muerte, en las localidades de Ojo de Agua y Cerro Sakira a 3.017 y 3.417 metros respectivamente, ubicadas en el margen norte de la Cordillera de Talamanca, en la región más alta de la cordillera accesible por carretera.

Los especímenes testigos de B. subpalmata se depositaron en el Museo de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, por existir todavía, y especialmente previo al presente estudio, dudas referentes a la taxonomía de dichas poblaciones. Esto se debe a la gran diversidad que se da en ellas con respecto a variación de color, diseño de coloración y tamaño. Según Vial (1966), estas salamandras presentan mayor diversidad de color y diseño a altitudes superiores a los 2900 metros en donde sólo las extremidades y la región gular muestran un carácter clinal, y la proporción de rojo aumenta con la altitud.

## 2.- EXTRACCION DE ADN:

El ADN se extrajo de la sangre de cada una de las salamandras. Los animales se midieron y se pesaron antes de ser sacrificados, luego se introdujeron en un frasco que tenía 3 volúmenes de cloroacetona y 1 de agua, en lapsos de 7 a 10 minutos. Cada salamandra se sujetó con el vientre hacia arriba, se abrió cerca de la región gular, se expuso el corazón, se cortaron los cartilagos ioideos y se seccionó la

arteria aorta. La sangre se extrajo en disolución salina citratada (1 X SSC = 0.15 M de NaCl, 0.015 M de citrato de sodio, pH 7.2), con pipetas Pasteur estériles y siliconizadas y se depositó en tubos Eppendorf que reposaban sobre hielo.

La sangre obtenida se resuspendió en agitador Thermolyne Maxi Mix, se centrifugó en microcentrifuga Eppendorf por 10 minutos. El botón resultante se resuspendió en 1 mL de SSC, pH 7.2, se homogenizó por 1 minuto y se centrifugó por 10 minutos. El paso anterior se repitió nuevamente. El botón obtenido se resuspendió en 1 mL de SSC, pH 7.2 más 0.025 M de Nonidet, se homogenizó por 1 minuto, se centrifugó por 10 minutos. A cada botón se le agregó 0.5 mL de tris EDTA pH 7.4 (10 mM de tris + 1 mM de EDTA pH 8.0) y 0.05 mL de proteinasa K (1 mg/mL) y se incubó por 12 horas a 37° C.

A cada digestión se le agregó un volumen igual de fenol saturado en 0.1 M de tris, pH 8.0, preparado según Maniatis et al., (1982), se homogenizó por 1 minuto y se centrifugó por 10 minutos. Luego se extrajo el fenol del fondo del Eppendorf y se le agregó al sobrenadante una mezcla proporcional de fenol saturado en tris y cloroformo isoamilo (24:1). Se homogenizó por 1 minuto, se centrifugó por 10 minutos y se extrajo la fase fenólica. El paso anterior se repitió nuevamente. Para precipitar el ADN, se midió el sobrenadante y se le puso acetato de sodio hasta una



concentración de 0.25 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (Maniatis, et al., 1982).

El ADN obtenido se enrolló en una varilla de vidrio que se introdujo dentro de un tubo de ensayo conteniendo etanol de 70 % frío. Antes de guardar cada barra de ADN a  $-20^{\circ}$  C., esta se identificó con una etiqueta. El ADN de cada barrita se lavó por 1 minuto en cada una de las siguientes disoluciones: 1) etanol de 70%, 2) etanol absoluto, 3) etanol absoluto, 4) éter dietílico, 5) éter dietílico y 6) etanol de 70 %. El éter dietílico se filtró en una columna de óxido de aluminio para liberarlo de peróxidos, dentro de una campana de extracción Labconco.

### 3.- CUANTIFICACION DEL ADN:

El ADN precipitado con etanol a  $-20^{\circ}$  C en la presencia moderada de cationes monovalentes, fue recobrado por centrifugación y reprecipitado varias veces para quitarle cationes divalentes y otros contaminantes. Para cuantificar la concentración, el ADN se disolvió en 0.2 mL de tris HCl pH 7.4, se incubó por 10 minutos a  $37^{\circ}$  C y luego, al menos por 1 hora a temperatura ambiente, antes de medir su absorbancia en un espectrofotómetro Hitachi, modelo 200-20, con accesorio para graficar (Record X-Y Hitachi 057). Usando diluciones de 1:100 en celdas de 1 cm de longitud, se determinó la absorbancia en el rango de la luz ultravioleta.

Para determinar la concentración se utilizó un coeficiente de extinción para ADN. En este caso 1 unidad de absorbancia representa 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN.

Para medir cantidades pequeñas de ADN se usó el Método de la placa de agarosa (Maniatis et al., 1982) que consiste en la estimación de la intensidad de fluorescencia emitida por bromuro de etidio. Se pusieron volúmenes iguales de 3  $\mu\text{L}$  de una serie de diluciones estándares de ADN, sobre un papel "Parafilm M". A la primera gota se le pusieron 3  $\mu\text{L}$  de disolución de ADN (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), se mezclaron las gotas por varias veces en la punta de la "Pipetman". Se tomaron 3  $\mu\text{L}$  y se pusieron a la par de la segunda gota (sin unir las), los otros 3  $\mu\text{L}$  se pusieron en un orden establecido, en un gel de agarosa del 1% (20 mL de tris borato 1X = 0.089 M de tris borato y 0.089 M de ácido bórico + 0.2 g de agarosa) al cual se le agregó 20 microlitros de bromuro de etidio (5 mg/mL); con un tip nuevo se unieron las gotas adjuntas y así sucesivamente. Debido a que puede haber contaminantes en la muestra de ADN, que alteran el patrón de fluorescencia, se dejó el gel a temperatura ambiente por unas pocas horas, de tal manera que pequeñas moléculas contaminantes tuvieran la oportunidad de difundir lejos del ADN.

#### 4.- DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICION:

El ADN purificado se cortó con endonucleasas de

restricción tipo II, que son enzimas que reconocen secuencias de nucleótidos específicos y rompen los enlaces entre dos nucleótidos de dicha secuencia, tanto en una banda como en la otra, ya sea al mismo nivel de la doble banda, produciendo "extremos romos", o a diferentes niveles de ambas bandas, generando "extremos complementarios" o "cohesivos" (Davis, et al., 1986). Se usaron las enzimas: *A1uI*, *BamHI*, *BglIII*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *KpnI*, *MspI*, *PstI*, *Sa1I*, *Sau3aI*, *SmaI*, *XhoI* de diferentes proveedores (Boheringer, Bfo Labs, Biotec, BRL, Genefit, Miles Lab, Pharmacia, PL Biochem).

Para cortar el ADN de *B. subpalmata* se usó: una unidad Weiss de enzima por cada microgramo de ADN que se digirió, poniendo menos del 10 % de la enzima en el volumen total de digestión, para evitar que la actividad de la enzima fuera inhibida por el glicerol en que viene diluida la enzima (Maniatis, et al., 1982). Se agregó albúmina de suero bovino (BSA), como estabilizador enzimático, a una concentración final de 100 microgramos/mL y el amortiguador proveído por el fabricante (a una concentración de 10 X) y agua bidestilada para aforar al volumen total de digestión. La temperatura de digestión para esas enzimas fue de 37<sup>o</sup> C, por 12 horas como mínimo, para aquellas endonucleasas que son estables durante digestiones extendidas (Crouse & Amorese, 1986).

#### 5.- ANALISIS ELECTROFORETICO DEL ADN CORTADO:

El ADN sin digerir y el digerido se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa de 0.8% a 1.2% en presencia de bromuro de etidio al 0.5%. Las bandas que forman las familias repetitivas se observaron y fotografiaron con dos lámparas (Blak-Ray) de 254 nanómetros de luz UV incidente y se fotografiaron con una cámara Mamiya y película instantánea Polaroid tipo 667 (ASA 3000).

Los productos de digestión también se analizaron por electroforesis en geles de 6 % de acrilamida, teñidos con plata según el método de Igloi (1983). Después de concluir la electroforesis, cada gel se lavó en 200 mL de Fijador I (50% de etanol, 10% de ácido acético y agua bidestilada estéril), y se dejó una hora o toda la noche en agitación en 200 mL del fijador I. Luego se lavó brevemente en fijador II (10% de etanol, 1% de ácido acético y agua bidestilada estéril), y se dejó una hora en agitación en 200 mL de fijador II. El fijador II se succionó con vacío y se agregó 200 mL 12 mM de nitrato de plata, donde se dejó en agitación por una hora. Posteriormente se lavó dos veces el gel en agua destilada y se reveló por unos 5 minutos, con una disolución de 0.28% de formaldehído y 0.75 M de KOH. Se lavó brevemente con 0.07 M de carbonato de sodio. La reacción de revelado se detuvo con 5% de ácido acético, disolución en que los geles pudieron ser guardados por muchos días.

La cantidad de pares de bases (pb) de las bandas observadas se determinó con marcadores de peso molecular establecido, tales como ADN DRigest III (Pharmacia) que produce 19 fragmentos de: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 1353, 1078, 872, 603, 564, 310, 281, 271, 234, 194, 125, 118 y 72 pb, respectivamente; ADN de fago *lambda* (Pharmacia) cortado con: *EcoRI* de 21800, 7520, 5930, 5540, 4800 y 3410 pb; *HindIII* de 23700, 9460, 6750, 4260, 2260, 1980, 580 pb; *EcoRI* + *HindIII* de 21800, 5240, 5050, 4210, 3410, 1980, 1900, 1710, 1320, 930, 840 y 580 pb (Philipsen et al., 1978) y pBR 322 cortado con *HaeIII* de 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11 y 7 pb (Sutcliffe, 1978).

Las bandas de los geles de agarosa con fragmentos de interés, se cortaron, se enrollaron en papel parafilm M y se guardaron a temperatura de congelación.

#### 6.- ELUCION DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA:

Para obtener ADN libre de agarosa y de bromuro de etidio se aplicaron los siguientes métodos: 1) Disolución en  $\text{NaClO}_4$  e hidroxapatita (Southern, 1975; 1979); 2) Electroelución en sacos de diálisis (Maniatis et al., 1982); y 3) Filtración en Durapore (Perez, 1986). Además, se aplicó el método de congelamiento y aplastamiento, en el cual los pedazos de agarosa congelados se maceraron a temperatura

ambiente. El líquido que salió de esto se recuperó en tubos Eppendorf, que se centrifugaron por 15 minutos para eliminar restos de agarosa, aunque no se eliminó el bromuro de etidio. Posteriormente el ADN se concentró por precipitación en etanol, en presencia de ARNt de levadura (BRL) como acarreador.

#### 7.- ANALISIS EN GRADIENTES DE DENSIDAD EN SALES DE CESIO:

El ADN total se fraccionó en gradientes preparativos cloruro de cesio (CsCl) o en gradientes con actinomicina D/CsCl (Brown et al., 1971). Se hizo una disolución madre de actinomicina D disuelta en disolución acuosa (1mg/mL) que se guardó en un bote ámbar a 4<sup>o</sup> C. El ADN se ajustó a un índice de refracción de 1.3930 con CsCl sólido y la actinomicina D se añadió a una relación final 2:1 (w/w ADN : actinomicina D) (Brown et al., 1971; Barsachi-Pilone et al., 1986). Se prepararon 3 tubos con 4.3 mL de CsCl con un índice de refracción de 1.3916, a cada uno de dos tubos se le puso 200 µL de ADN de B. subpalmata y 100 µL de actinomicina D y al otro tubo sólo 300 µL de ADN de B. subpalmata con un índice de refracción de 1.3897. Los tubos se equilibraron y se centrifugaron por 72 horas a 18<sup>o</sup> C en una ultracentrífuga preparativa Hitachi 65P (Barsachi-Pilone et al., 1986; John et al., 1986) y luego fueron colectados

del tubo y fraccionadas a través de un analizador ultravioleta UA-5A (LKB) por punción.

#### 8.- LIGACION:

Se utilizó como secuencia a ligar, la banda de 440 pb formada al cortar ADN de B. subpalmata con la enzima de restricción A<sub>1</sub>uI. Para tal efecto, se recuperaron las bandas de 437 pb de 9 hembras y de 9 machos, cada uno de esos grupos se eluyó del gel de agarosa por medio del método de congelamiento y aplastamiento, que resultó ser el más práctico y se concentraron en 10 µL de tris-Cl pH 7.4 por precipitación etanólica.

El fragmento de ADN satélite de B. subpalmata de 440 pb, se usó para la ligación por medio de la ADN ligasa T4, a un plásmido pUC 13 SmaI/BAP (Farmacia), que es un vector cortado en el "polylinker" contenido en la secuencia codificante del alfa-péptido (carboxiterminal) de la enzima beta galactosidasa (Dente, et al., 1985). La enzima SmaI produce puntas romas, que fueron defosforiladas por el fabricante con la fosfatasa bacteriana alcalina (BAP) para minimizar la autoligación del vector. La ADN ligasa T4 (de E. coli infectada con T4), cataliza la formación de un enlace fosfodiéster 3'-OH y 5'-P terminal entre ADN adyacentes (Weiss et al., 1968).

Se hicieron 3 grupos de ligación, cada uno

conteniendo 5  $\mu$ L del pUC 13 *Sma*I/BAP (50 ng/ $\mu$ L disueltos en tris-EDTA), 2  $\mu$ L del ADN a insertar (aproximadamente 100 ng), 4  $\mu$ L del amortiguador de ligación 5 X (250 mM tris HCl pH 7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (w/v) polietilenglicol 8000, 5 mM de ATP, 5 mM de ditiotreitól) y agua bidestilada estéril. A cada grupo de reacción se le añadió 1  $\mu$ L de la ADN ligasa T4 (0.1 unidad/ $\mu$ L). El volumen final de cada reacción fue de 20  $\mu$ L y la ligación fue incubada a temperatura ambiente (23<sup>o</sup> - 26<sup>o</sup> C) por más de 15 horas. Las variantes fueron en cuanto al ADN a ligar: 1) ADN de los machos, 2) ADN de las hembras, 3) ADN de machos y hembras. Además se puso un control sin inserto, con 11  $\mu$ L de agua bidestilada estéril, en vez de los 9  $\mu$ L de los tres grupos anteriores.

#### 9.- TRANSFORMACION:

A los plásmidos pUC13 ligados con insertos se les agregó CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración de 30mM, lo cual permite la penetración de los plásmidos al interior celular. Se usó 45  $\mu$ L de TE pH 7.4 + Ca<sup>++</sup>, para cada 5  $\mu$ L de reacción de ligación de cada uno de los grupos y del control, así como un control positivo (5 microlitros de pUC8 cerrado). La transformación en pUC8 debe producir entre 2 - 8 x 10<sup>5</sup> células transformadas/mL.

A cada uno de los grupos se les agregó, con pipeta fría, 0.2 mL de células competentes de E. coli JM103.



Las bacterias que absorben los plásmidos son los "transformantes" y en ellas el plásmido es capaz de generar múltiples copias de sí mismo. Estas se incubaron a  $0^{\circ}$  C por 30 minutos, luego se pusieron a  $42^{\circ}$  C por 90 segundos para producirles un "Shock térmico". Inmediatamente se les agregó 800 microlitros de LB (para 1 L, 10 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y se ajusta el pH a 7.5 con NaOH) o LB-S (LB más estreptomycin a  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo cual permite que las células se recuperen al incubarse a  $37^{\circ}$  C por 60 minutos sin agitación.

Para determinar la viabilidad de las células E coli JM103, se diluyeron  $10 \mu\text{L}$  del cultivo celular (cuando está en el hielo y en la fase media del crecimiento logarítmico) en  $1 \mu\text{L}$  de LB,  $10 \mu\text{L}$  de esa dilución ( $10^2$ ), en  $1 \mu\text{L}$  de LB (dilución  $10^4$ ) y se sembraron  $10 \mu\text{L}$  sobre agar LB sin antibióticos (dilución  $10^6$ ). Para obtener altas tasas de transformación la densidad celular debe estar en el rango de  $4 - 8 \times 10^7$  células/mL (Hanahan, 1985).

#### 10.- SELECCION:

Antes de agregar las células, se puso  $20 \mu\text{L}$  de IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) de una disolución concentrada a  $20 \text{mg}/\text{mL}$  en agua y  $10 \mu\text{L}$  de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosidasa) de una disolución concentrada a  $20 \text{mg}/\text{mL}$  en dimetilformamida, en las placas de

agar (15 g por L) de LB-SA (LB más estreptomycin y ampicilina a 50 µg/mL) y se incubó a 37<sup>o</sup> C por 12 horas. Los transformantes adquieren resistencia a la ampicilina y forman colonias al crecer en medios de cultivo que la contienen. La detección de las colonias con insertos se basa en la inactivación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa del plásmido, lo cual origina colonias de color blanco en presencia del sustrato artificial X-gal, en tanto que las que no tienen insertos, son de color azul (Focus, 1986).

#### 11.- PREPARACION DE PLASMIDOS EN GRAN ESCALA:

Las células HB 101 con el plásmido pBR 322, así como las células JM103 con las clonas seleccionadas, se usaron para hacer múltiples copias de esos plásmidos. Se inocularon 500 mL de caldo selectivo (Caldo L + antibiótico), que contiene 10 g/L de Bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl (al cual se le ajustó el pH a 7.5 con NaOH), estreptomycin (25 µg/mL) y ampicilina (50 µg/mL). Se incubó a 37<sup>o</sup> C con agitación vigorosa, en un baño de maría Kottermann, por un tiempo aproximado de 2-4 horas, hasta que se obtuvo en cada uno de los cultivos una densidad celular de  $5 \times 10^7$  (absorbancia de 0.4 - 0.6 a 600 nm), entonces se les añadió cloranfenicol (170 µg/mL). Se continuó la incubación toda la noche a 37<sup>o</sup> C con agitación vigorosa.

Los cultivos se centrifugaron a 5,000 revoluciones por minuto (rpm), por 15 minutos en una centrifuga preparativa Hitachi, en botellas de policarbonato (PC) estériles. Los precipitados se resuspendieron en 20 mL de disolución de lisis I fresca (25 mM de tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM de glucosa) a la cual se le añadió 5 mg/mL de lisozima justo antes de su uso. Se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos, antes de agregarles 20 mL de disolución II fresca (0.2 N de NaOH y 1% de SDS a pH 12.38). Se cubrieron las bocas de las botellas con papel parafilm M y se mezclaron suavemente por inversión, las suspensiones celulares en cada botella. Luego se dejaron en hielo por 10 minutos y se les agregó 15 mL de disolución III fría (60 mL de acetato de sodio 5 M pH 4.8 + 11.5 mL de ácido acético glacial aforado a 100 mL de agua destilada). Los contenidos se mezclaron suavemente por inversión y se dejaron en hielo por 10 minutos.

Cada botella se centrifugó a 20,000 rpm por 20 minutos a 4<sup>o</sup> C, donde los restos celulares y el ADN bacteriano forman un precipitado. Por cada botella, se transfirieron iguales cantidades de líquido sobrenadante dentro de cada uno de 2 tubos Corex de 30 mL y se les agregó 2 volúmenes de etanol de 70 %. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Este último paso se repitió una vez más.

El ADN de los botones obtenidos se disolvió en una adecuada cantidad de tris-HCl pH 7.5, se cuantificó por espectrofotometría, se fraccionó en alícuotas, se concentró y se guardó en alcohol de 70 %, en forma de fibras, a  $-20^{\circ}$  C durante varios meses sin deterioro alguno.

#### 12.- TRANSFERENCIA DE ADN SOBRE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA:

Esta técnica se conoce con el nombre de "Southern blot" y se usa para transferir ADN de su posición en un gel de agarosa a filtros de nitrocelulosa (NC), colocados directamente encima del gel. El ADN es desnaturalizado, neutralizado y transferido en un amortiguador de alta concentración de sal por acción capilar. El ADN desnaturalizado a hebra simple, se une al filtro y esta unión se hace permanente al hornear el filtro (Davis *et al.*, 1986).

El gel se midió para determinar el tamaño del papel de nitrocelulosa (Schleider & Schull BA 85) que se requeriría. Se trató sucesivamente el gel en las siguientes soluciones: 1) 0.2 N HCl por 15 minutos, se agitó suavemente y se enjuagó con agua bidestilada, 2) 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl por 20 minutos, se agitó suavemente y se enjuagó con agua bidestilada y 3) 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 3 M NaCl por 30 minutos. Todas las disoluciones se secaron al vacío, para evitar romper el gel.

Para eliminar las impurezas que pueda contener la membrana de nitrocelulosa, se mojó en agua hirviente y luego en 6X SSC. Para hacer la transferencia se usó una bandeja sobre la cual se colocaron tapones de hule; sobre ellos se puso un vidrio del tamaño del gel. Entre el vidrio y el gel se puso un papel filtro Whatman 3 mm que estaba en contacto con la disolución de transferencia 6 X SSC, para que esta subiera por capilaridad. Sobre el gel se puso el papel de nitrocelulosa (el cual se manipuló con guantes, se orientó y codificó). La superficie del gel y el papel de nitrocelulosa se enjuagaron con una esponja antes de ponerlos en contacto entre sí, además se evitó que quedaran burbujas. Sobre el papel de nitrocelulosa se pusieron sucesivamente: 6 hojas Whatman 3, unos 20 cm de papel absorbente, un vidrio y un peso adecuado (unos 5 Kg). Se transfirió en 6X SSC de 4 a 12 horas (lo cual es adecuado para transferir secuencias altamente repetidas) (Southern, 1975). Después de realizada la transferencia, se enjuagó el papel de nitrocelulosa con 3 X SSC, se secó al aire y se metió a la estufa por 2 horas a 80° C.

### 13.- PREPARACION DE SONDAS BIOTINILADAS PARA HIBRIDACION:

Las sondas son segmentos de ADN a los cuales se les ha introducido nucleótidos marcados con biotina, por medio de las reacciones de "nick translation". Esta reacción

depende de la habilidad de la enzima ADN polimerasa I para iniciar una síntesis de ADN a partir de los grupos 3' OH libres, los cuales son expuestos en el ADN sin marcar con la ADNasa I. Los cortes son generados en posiciones al azar por una digestión limitada del ADN con ADNasa I titulada en reacciones previas. La polimerasa sintetiza nuevo ADN en dirección 5' a 3', usando deoxinucleótidos, uno de los cuales está marcado con biotina (UTP) (Rigby *et al.*, 1977).

Se prepararon disoluciones en 0.05 M de tris HCl, pH 7.5, de una mezcla de 20 mM de cada nucleótido trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, con pesos moleculares de 507.2, 483.2, Y 532.2 respectivamente. Se pusieron 50 µL de cada una de las disoluciones, más 850 µL de agua bidestilada estéril. Cada nucleótido quedó a una concentración final de 1 mM. La mezcla de nucleótidos sin marcajes se guardó a - 20° C.

La ADNasa I se disolvió en MgCl<sub>2</sub> 0.1 M a una concentración de 0.5 mg/mL, se fraccionó en alícuotas y se guardó a - 20° C. Se hicieron diluciones de 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000, en amortiguador de dilución (10 mM de tris HCl, pH 7.5, BSA 1 mg/mL). Por medio de reacciones de optimización de la ADNasa I con dATP tritiado (5µCi totales), con lo que se determinó que la dilución 1:1000 es la más eficiente para la incorporación de nucleótidos radiactivos a polinucleótidos.

Se reconstituyó la enzima liofilizada ADN polimerasa I (*E. coli*) 10 unidades/mL (BRL), mediante el siguiente procedimiento: Se incubó por 15 minutos una disolución de glicerol en agua al 50%, mientras se mantuvo el liofilizado a temperatura ambiente. Se adicionaron 55  $\mu$ L de la disolución de glicerol al 50%, se agitó en un vortex, evitando que se formaran burbujas. Se puso la disolución en hielo por 60 minutos. Su máxima actividad se logró a las 4 horas a 4<sup>o</sup> C. Se almacenó a - 20<sup>o</sup> C.

La reacción de "nick translation" para preparar la sonda biotinilada, se hizo de la siguiente manera: Se mezclaron 5  $\mu$ L de amortiguador de "nick translation" 10 X, pH 7.5 (tris HCl 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM); 5  $\mu$ L de una mezcla de nucleótidos sin marcar (dGTP, dATP, dCTP); 5  $\mu$ L de dUTP biotinilado (BRL); 1  $\mu$ g de ADN de pBSA a marcar; 4  $\mu$ L de DNasa I (1:1000); 1.2  $\mu$ L de ADN polimerasa I y agua estéril bidestilada a completar 50  $\mu$ L. La mezcla se incubó a 14<sup>o</sup> C por 90 min y luego se detuvo la reacción enzimática con 5  $\mu$ L 0.2 M de EDTA, pH 7.5. Se le agregó 0.5 % de azul dextrán y se llevó a 200  $\mu$ L con 10 mM de tris HCl, 1 mM de EDTA, pH 7.5. Se almacenó a - 20<sup>o</sup> C.

Para recuperar el ADN marcado con biotina, se montó una columna de Sephadex G-50 (en pipeta Pasteur siliconizada y un pequeño tapón de fibra de vidrio estéril), equilibrada con 10 mM de tris HCl, 1 mM de EDTA, pH 7.5. Se

colectaron 10 fracciones de 200  $\mu$ L. En papel de nitrocelulosa se colocaron 5  $\mu$ L de las diferentes fracciones colectadas, se secó al aire el papel y se horneó a 80<sup>o</sup> C. La sonda siempre se detectó en las fracciones que contenían el azul dextrán.

#### 14.- HIBRIDACIONES EN PAPEL DE NITROCELULOSA:

Se hizo primero una reacción de prehibridación al papel de nitrocelulosa con ADN transferido. Por cada 100 cm<sup>2</sup> de papel de nitrocelulosa se usaron 10 mL de amortiguador de prehibridación: 45 % de formamida, 5 X de SSC, disolución 5 X de Denhardt (0.1 % de BSA, 0.1 % de polivinil pirrolidona, 0.1 % de Ficoll 400) 50 mM de fosfato de sodio, pH 6.5, ADN de salmón 250  $\mu$ g/mL (previamente desnaturalizado a 95<sup>o</sup> C por 5 minutos y enfriado en hielo). El papel de nitrocelulosa se incubó por 2 horas a 37<sup>o</sup> C.

Para reacciones de hibridación se usaron 100 cm<sup>2</sup> de papel de nitrocelulosa prehibridado, 10 mL de amortiguador de hibridación: 45 % de formamida, 5 X de SSC, 1 X de Denhardt, 20 mM de fosfato de sodio, pH 6.5, ADN desnaturalizado de salmón 250  $\mu$ g/mL y la sonda marcada con biotina (100 a 400 ng/mL), previamente desnaturalizada a 95<sup>o</sup> C por 5 minutos y enfriada en hielo. La hibridación se hizo a 37<sup>o</sup> C por 12 a 48 horas.



Se hicieron los siguientes lavados posteriores a la hibridación: dos con SSC 2X, SDS al 0.1 %, por 3 minutos cada uno, a temperatura ambiente; dos con SSC 0.2 X, SDS al 0.1 %, por 3 minutos cada uno, a temperatura ambiente; dos con SSC 0.16 X, SDS al 0.1 %, por 15 minutos cada uno, a 37<sup>o</sup> C. Se enjuagó el filtro con 2X SSC, SDS al 0.1 %, a temperatura ambiente.

El filtro se incubó en amortiguador 2 (3 % de BSA fracción V en amortiguador 1) precalentado a 37<sup>o</sup> C. La estreptavidina liofilizada (Sigma) se resuspendió a 1 mg/mL, en 50 mM de tris-HCl pH 7.5, 0.2 mg/mL de azida de sodio. Se diluyó la estreptavidina a 2 µL/mL (en disolución amortiguadora 1 (0.1 M de tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M de NaCl, 0.002 M de MgCl<sub>2</sub>, 0.05 % (v/v) de tritón X-100). Se usó 3 mL de disolución por filtro de 100 cm<sup>2</sup>, se incubó por 2 horas con agitación suave. El filtro se lavó con amortiguador 1 con 20 a 40 veces más volumen que el utilizado en el paso anterior. Se repitió 3 veces.

La fosfatasa alcalina marcada con biotina liofilizada (Sigma) se resuspendió en 0.5 µg/mL en PBS, pH 7.2. (PBS = 8 g/l de NaCl, 0.2 g/l de KCl, 1.15 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), BSA al 2 %, 0.2 mg/mL de azida de sodio y 0.2 % de Tween 20. La fosfatasa alcalina biotinilada se diluyó a 4 µL/mL en PBS, pH 7.2. Se usó 3 mL de disolución por filtro de 100 cm<sup>2</sup> y 1 mL por filtro

control. Se incubó por 2 horas con agitación suave. Se lavó 3 veces con PBS, pH 7.2, 0.1 % de tritón X-100, por 5 minutos cada vez y 1 vez con amortiguador de dietanolamina (97 mL de dietanolamina, 0.2 g de azida de sodio, para 1 L a pH 9.8 con HCl concentrado).

La visualización del ADN biotinilado se observó por medio de la coloración con 20 mL de amortiguador de dietanolamina, pH 9.8, 67  $\mu$ L de 1 M de  $MgCl_2$ , 2 mg de NBT (nitro blue tetrazolium), 1.2 mg de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), para un filtro de 100  $cm^2$ . La coloración se hizo patente en los primeros 10 minutos. La reacción se detuvo con agua de tubo. El filtro se secó al aire y se guardó en un sitio oscuro.

#### 15. MAPAS FISICOS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN:

Para elaborar mapas físicos de los fragmentos clonados, se hicieron digestiones únicas, dobles y triples de las clonas denominadas pBsA6 y pBsA23 y del PUC13 sin inserto, así como digestiones únicas y dobles de los fragmentos de ADN de B. subpalmata clonados y escindidos de los pBsA6 y pBsA23 con la doble digestión *Bam*HI y *Eco*RI. Los análisis se hicieron por gel electroforesis de 6 % de acrilamida y tinción de plata.

#### 16.- PROCEDIMIENTOS CITOLÓGICOS:

Las preparaciones citológicas de cromosomas mitóticos y meióticos fueron hechas usando la técnica de colchicina para epitelio intestinal descrita por Kezer & Sessions (1979). Al menos tres preparaciones cromosómicas fueron examinadas por cada uno de los especímenes. Las salamandras fueron inyectadas con 0.1 mL por gramo de peso corporal de disolución acuosa de colchicina al 0.1 % - 0.3 %, e incubadas a 16<sup>o</sup> - 18<sup>o</sup> C por aproximadamente 48 horas. Después de que los animales fueron sacrificados, se les removió el intestino y los testículos, se limpiaron de restos tisulares y se agitaron en agua destilada por 10 minutos como tratamiento hipotónico. Posteriormente los tejidos fueron drenados del exceso de agua y transferidos a un vial con fijador (fresco) en el momento (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial). En este paso los tejidos fueron guardados o usados luego de fijar por al menos 30 min. Un aspecto extremadamente útil y conveniente de esta técnica es que los tejidos completos pueden ser guardados en el fijador 3:1 por al menos 10 años en un congelador ordinario sin efectos adversos aparentes sobre las preparaciones cromosómicas (Sessions & Kezer, 1987).

Las preparaciones de láminas fijas fueron hechas sumergiendo los tejidos en 45 % de ácido acético por 1 a 5 minutos y sobre un portaobjetos limpio, en una gota de 45 %

de ácido acético, se separaron cuidadosamente, con un bisturí, pequeñas piezas celulares. Esta suspensión celular se cubrió con un cubreobjetos siliconizado y se maceró sobre una almohadilla de papel absorbente. Las preparaciones sin teñir se examinaron en un microscopio Olympus de contraste de fases y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss estándar con contraste de fases. En este paso, diferentes tejidos y partes de tejidos se examinaron lámina por lámina, dejando para siguientes tratamientos solamente aquellas que tenían un buen esparcimiento de cromosomas. Las preparaciones seleccionadas se hicieron permanentes enfriándolas sobre hielo seco, despegando rápidamente el cubreobjetos con una navaja de rasurar y sumergiendo inmediatamente la preparación en etanol de 95% (Conger & Fairchild, 1953).

La heterocromatina constitutiva se caracteriza por el bandeo C (Arrighi & Hsu 1970; Yunis et al., 1970; Sumner, 1972; Schmid et al., 1979; King, 1980). El bandeo C se hizo usando la técnica de Schmid et al. (1979): las láminas fueron secadas a 60° C de 1-4 días, entonces se sumergieron en una disolución saturada de hidróxido de bario a 35° C por 5 minutos. Este tratamiento fue seguido por un breve lavado en 0.1 N de HCl, un lavado en agua destilada, y 1 hora sumergidas en 2 X SSC a 60° C. Luego las láminas fueron lavadas en agua destilada y teñidas por 5 minutos en un

coplin con 8 % de Giemsa en disolución amortiguadora de fosfato de Sorenson, pH 6.8, 50.8 mL de disolución A (0.067 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 49.2 mL de disolución B (0.067 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). La disolución colorante de Giemsa fue sustituida por agua destilada.

## RESULTADOS:

1.- CROMOSOMAS DE B. subpalmata:

El número diploide de cromosomas de B. subpalmata es de 26 (Fig 1). Estas salamandras no presentan cromosomas sexuales, y el cariotipo somático básico de todos los individuos analizados fue  $2n = 26$ . En células que se encuentran en el diplotene de la meiosis, se observa fácilmente que  $N = 13$ .

## 1.1.- MEDIDAS CARIOLÓGICAS:

Los datos cuantitativos de cromosomas de B. subpalmata, fueron obtenidos como promedio de tres juegos de cromosomas en metafase mitótica del epitelio intestinal. En el Cuadro I se muestra el porcentaje del genoma a que corresponde cada uno de los cromosomas, y se presenta la localización del centrómero, obtenida como promedio de la relación longitud del brazo largo/longitud del brazo corto. Con los datos anteriores se construyó el idiograma de B. subpalmata (Fig 2).

## 1.2.- BANDEO C DE LOS CROMOSOMAS:

El bandeo C de los cromosomas de B. subpalmata se localizó en las regiones centroméricas de todos los cromosomas, como se puede observar en la Fig 3, en un grupo

Cuadro I. Datos cuantitativos de cromosomas de B. subpalmata, obtenidos como promedio de tres juegos de cromosomas de metafase mitótica de epitelio intestinal. El porcentaje del genoma se obtuvo de la siguiente manera: tamaño del cromosoma  $\times 100$  / sumatoria del tamaño de todos los cromosomas. La longitud del brazo largo/longitud del brazo corto es el promedio de los brazos, el cual indica la posición del centrómero.

Número del cromosoma	% del genoma	Promedio del brazo largo/ brazo corto
1	12.1	1.42
2	10.4	1.03
3	10.1	3.20
4	9.9	1.41
5	8.5	1.07
6	8.0	2.33
7	7.2	1.32
8	6.3	1.62
9	6.0	1.40
10	5.9	2.47
11	5.8	1.52
12	5.2	1.60
13	4.6	1.55

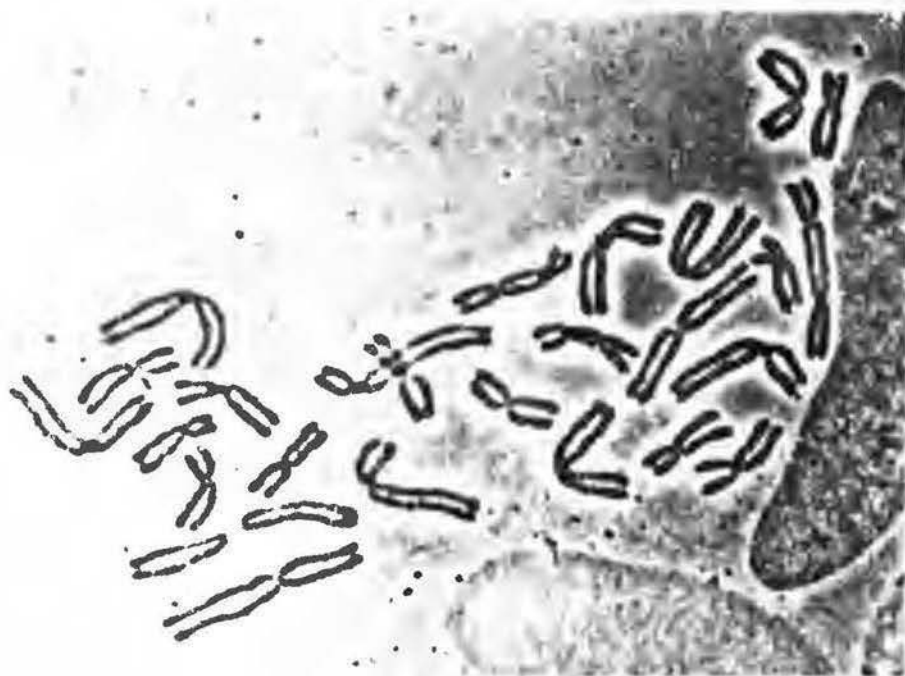


Fig. 1. Cromosomas mitóticos de *B. subpalmata* obtenidos de epitelio intestinal. Se observan 26 cromosomas, que es el número diploide de esta salamandra.



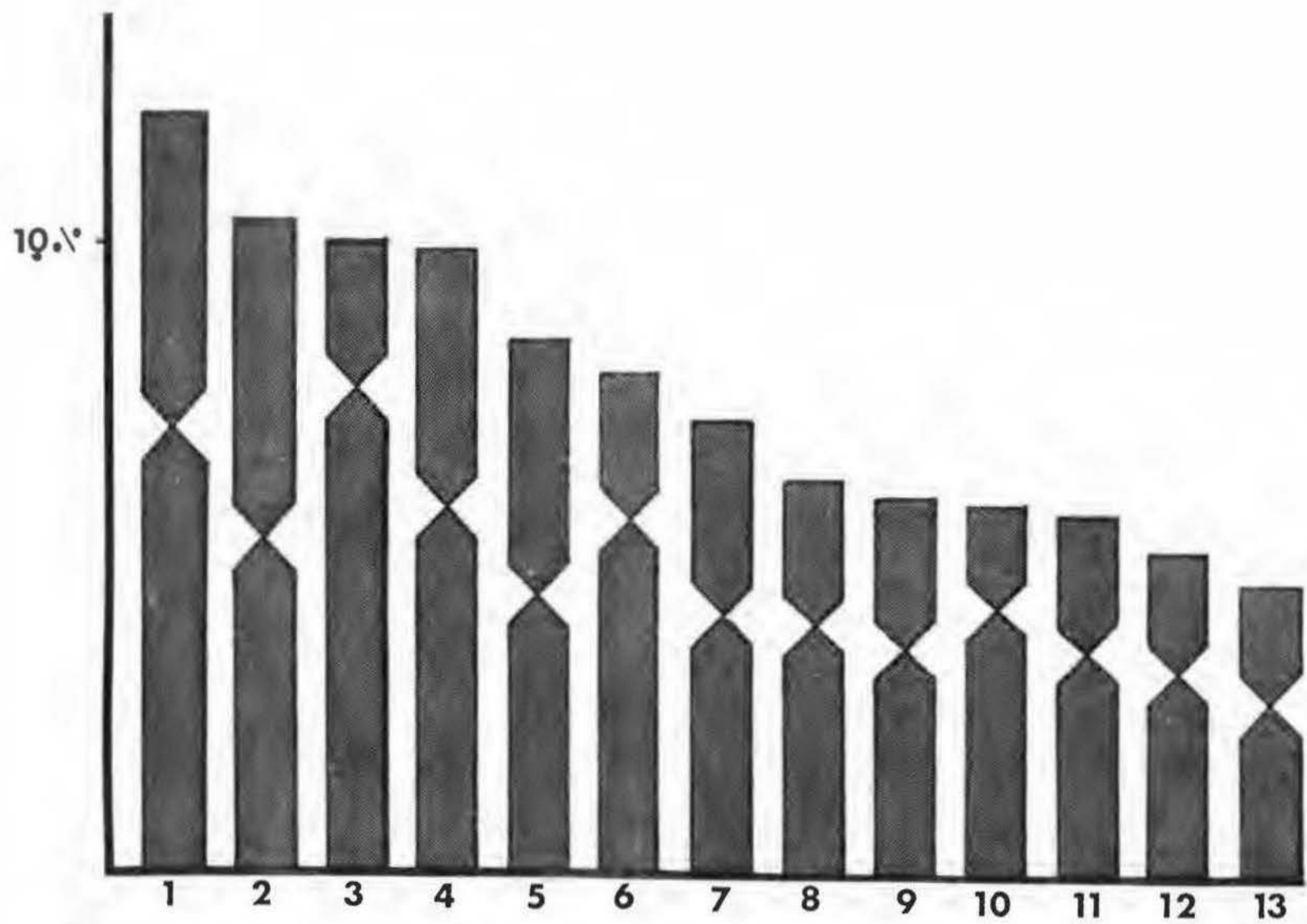


Fig. 2. Idiograma elaborado con los datos del cuadro I, mostrando el largo relativo y la posición del centrómero sobre los cromosomas de la salamandra *B. subpalmata*.



Fig. 3. Cromosomas mitóticos de epitelio intestinal de B. subpalmata en los que se demuestra la presencia de heterocromatina centromérica, por medio del bandeo C. En la preparación se encuentran cromosomas de varias células y en todos ellos se visualiza la heterocromatina a nivel de los centrómeros. Algunos de los más notables se señalan con flechas.

de cromosomas mitóticos de un macerado de células intestinales. En la Fig 4, se observa un diplotene (Meiosis I) bandeado en las regiones centroméricas, en un macerado de células de testículo.

## 2.- ANALISIS DEL ADN DE B. subpalmata:

El ADN de B. subpalmata, obtenido del núcleo de los glóbulos rojos, se caracterizó por gradientes de flotación en cloruro de cesio y mediante el uso de enzimas de restricción del tipo II.

### 2.1.- GRADIENTES DE FLOTACION EN CsCl:

En el trazado de los gradientes de CsCl con actinomicina D (Fig 5A) y sin actinomicina D (Fig 5B), que fueron fraccionados por punción y analizados por absorbancia de luz ultravioleta en un analizador UA-5 de LKB, no se observan satélites claramente separados de la banda principal, aunque sí hay indicación de un satélite ligero en el hombro izquierdo de esa banda.

### 2.2.- DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:

La digestión del ADN total de B. subpalmata con las enzimas de restricción: *A1uI*, *HaeIII*, *SmaI* (cortes de puntas romas) y *BanHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *MspI*,

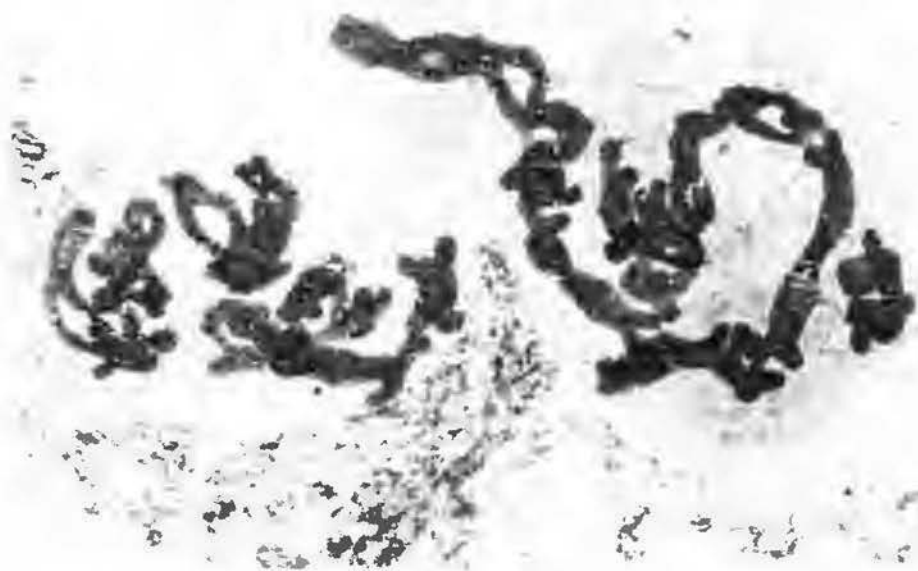


Fig. 4. Cromosomas meióticos en diplotene, obtenidos por macerado de testículos de *B. subpalmata*. Se observa que las regiones heterocromáticas reveladas por el bandeo C, se encuentran a nivel de los centrómeros.

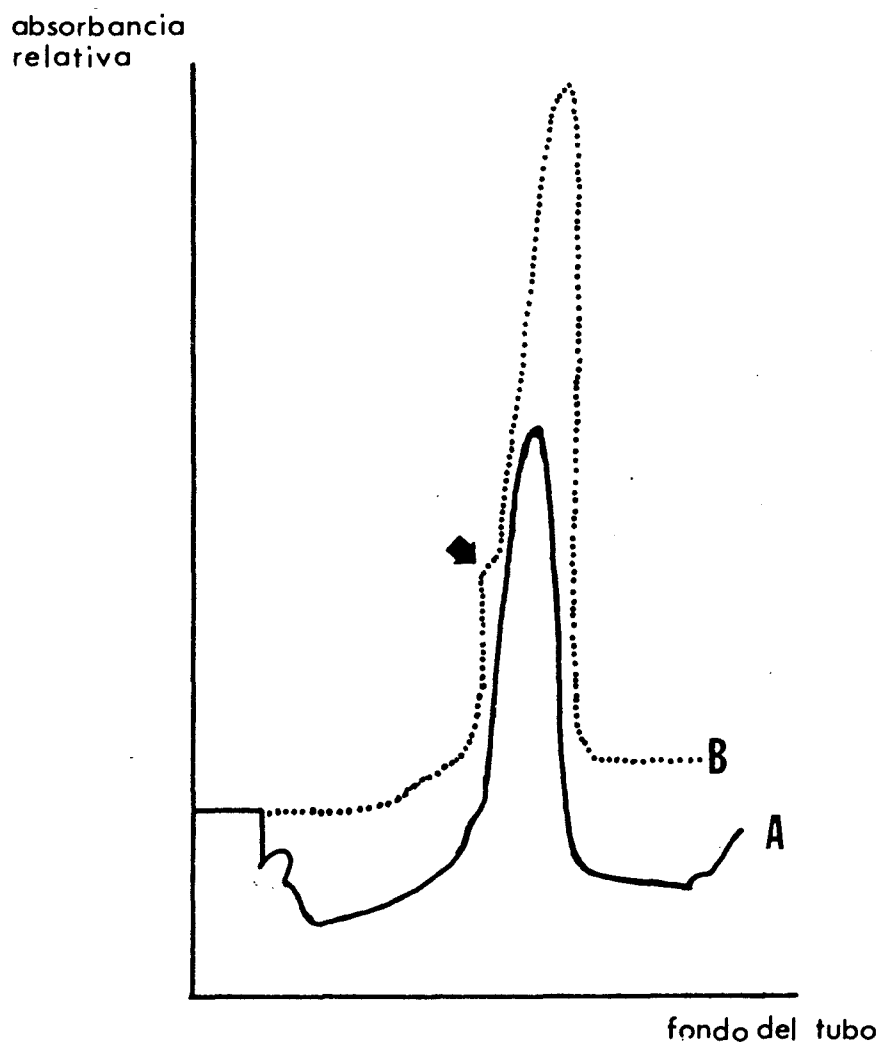


Fig. 5. Trazado del UA-5 LKB de los gradientes de CsCl con actinomicina D (A) y sin actinomicina D (B). No se observan satélites separados claramente de la banda principal. En el hombro izquierdo de la banda principal del trazado en (B) hay indicación de un satélite ligero, señalado con una flecha.

*Pst*I, *Sa*I, *Sau*3AI y *Xho*I (cortes de puntas pegajosas) (Fig 6), produjo en todos los casos disminución del tamaño del ADN. En la mayoría de los casos no se notó la formación de bandas. Sin embargo, se observó que con *Hae*III (carril 7) y *A*7uI (carriles 8 y 14) hubo mayor digestión de los ADNs (Fig 7).

Análisis posteriores del ADN de B. subpalmata extensamente digerido con *A*7uI, produjeron 4 bandas las cuales se observan en el gel de la Fig 8, en los carriles del 1 al 4. Dos digestiones que se hicieron con *Hae*III permiten la visualización de por lo menos dos bandas, la última de las cuales se encuentra al mismo nivel que la última banda generada con *A*7uI.

Se escogió la endonucleasa *A*7uI para caracterizar la familia repetitiva que ella genera en el ADN de B. subpalmata. Al digerir ADN de 9 hembras y de 9 machos con esa enzima, se obtuvo un patrón de 4 bandas visibles y similares en los dos grupos sexuales, cuyas medidas, corresponden a pesos moleculares aproximados de 1) 1160 pb, 2) 960 pb, 3) 710 pb y 4) 440 pb. (Fig 9). Se cortaron del gel en 2 grupos (hembras y machos), todas las bandas que se observan a la misma distancia del origen y de un peso aproximado de 440 pb. Las bandas se guardaron a  $-20^{\circ}$  C. hasta que se eluyeron por aplastamiento. Para comprobar que la banda había sido separada adecuadamente, se tomó una fotografía



Fig. 6. Esquema de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción tipo II usadas en esta investigación. El esquema presenta el nombre de la endonucleasa, la secuencia de nucleótidos que reconoce y el nombre científico del microorganismo del cual se purifica la enzima. Las tres enzimas de la primera fila producen cortes de puntas romas, las restantes lo hacen de puntas pegajosas.

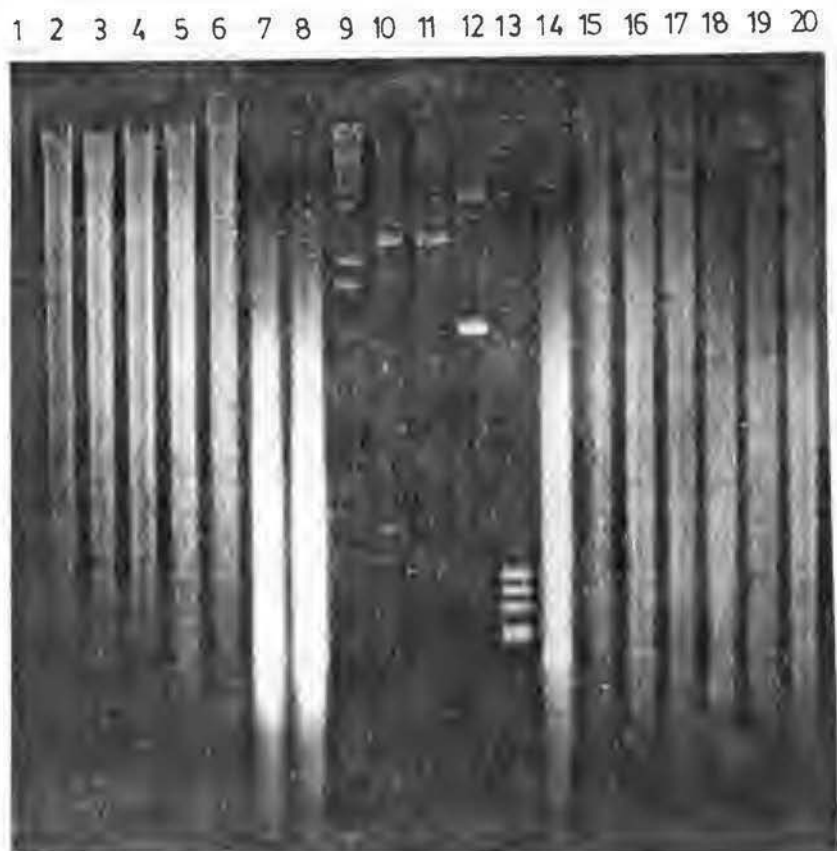


Fig. 7. Gel de electroforesis en agarosa al 1.2 %, con digestiones de ADN de *B. subpalmata* usando enzimas de restricción de cortes de puntas pegajosas (carriles del 2 al 6 y del 16 al 20) y de cortes de puntas romas (carriles 7, 8, 14 y 15). Los marcadores de peso molecular se encuentran en los carriles del 9 al 13. Se observa que las digestiones con *Hae*III (carril 7) y con *A*luI (carriles 8 y 14) producen fragmentos más pequeños. El ADN de *B. subpalmata* sin digerir (carril 1), queda en la parte superior del gel.





Fig. 8. Gel de electroforesis en agarosa al 0.8 %, con ADN de B. subpalmata digerido con *A7uI* y *HaeIII*. Se observa la presencia de 4 bandas (señaladas por flechas), en la digestión con *A7uI* (carriles del 1 al 4) y de al menos 2 bandas en la digestión con *HaeIII*. Se nota que la banda inferior generada por *HaeIII* se encuentra al mismo nivel que la banda inferior producida por *A7uI*.

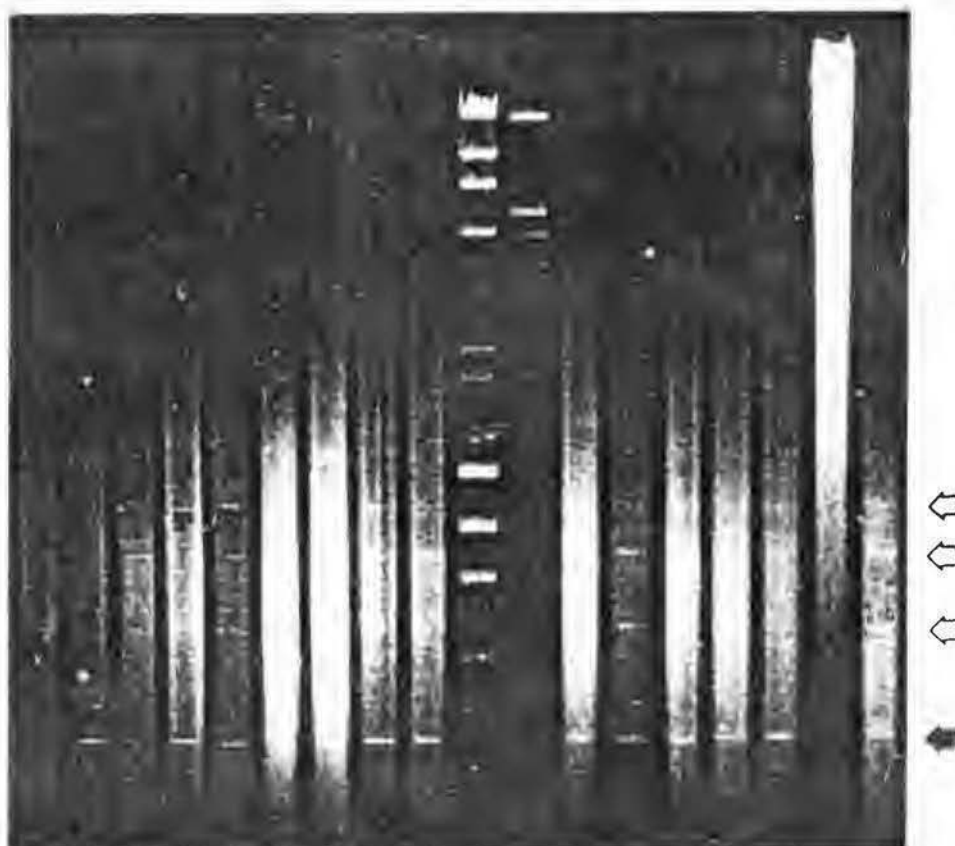


Fig. 9. Digestión de ADNs de *B. subpalmata* con *A7uI*, separada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. En los carriles del 1 - 9 el ADN se obtuvo de hembras, del 12 - 18 se obtuvo de machos. El carril 10 contiene marcadores de peso molecular conocido (Drigest III, Pharmacia). El carril 11 contiene ADN de *lambda* cortado con *EcoRI* y *HindIII*. La digestión del ADN en los grupos de hembras y de machos es similar, a excepción del carril 17 en el cual la digestión del ADN fue incompleta. El ADN de *B. subpalmata* presenta 4 bandas tenues de pesos moleculares de 1) 1160 pb, 2) 960 pb, 3) 710 pb y 4) 440 pb. Las bandas del DRigest III observadas tienen pesos moleculares de 1) 9416 pb, 2) 6557 pb, 3) 4361 pb, 4) 2322 pb, 5) 2027 pb, 6) 1353 pb, 7) 1078 pb, 8) 872 pb y 9) 603 pb.

posterior del gel (Fig 10), en la cual se demuestra que la separación fue apropiada.

De acuerdo al gráfico (Fig. 11), construido con los estándares DRigest III (Pharmacia), con pesos moleculares conocidos, se estimó que las bandas de *A7uI* de B. subpalmata tienen tamaños de 1160 pb, 960 pb, 710 pb y 440 pb.

### 3.- ANALISIS DE LA FAMILIA REPETITIVA *A7uI*:

A pesar de que la última banda generada por la enzima de restricción *A7uI* en el ADN de B. subpalmata tenía un peso molecular pequeño, con aproximadamente 440 pb, se escogió para ser clonada, debido a que era más constante, visible y persistente que las otras bandas, aún en digestiones prolongadas.

#### 3.1.- CLONAJE DE LA FAMILIA *A7uI* EN pUC13:

De los cuatro métodos de elución utilizados para liberar las bandas de ADN de la agarosa, el que dió mejores resultados fue el de congelamiento y aplastamiento "freeze-squeeze", debido a que se recuperaba fácilmente el ADN. El ADN así recuperado y separado por centrifugación de la agarosa contaminante, se utilizó directamente para ligarlo al vector pUC13 *SmaI*/BAP.

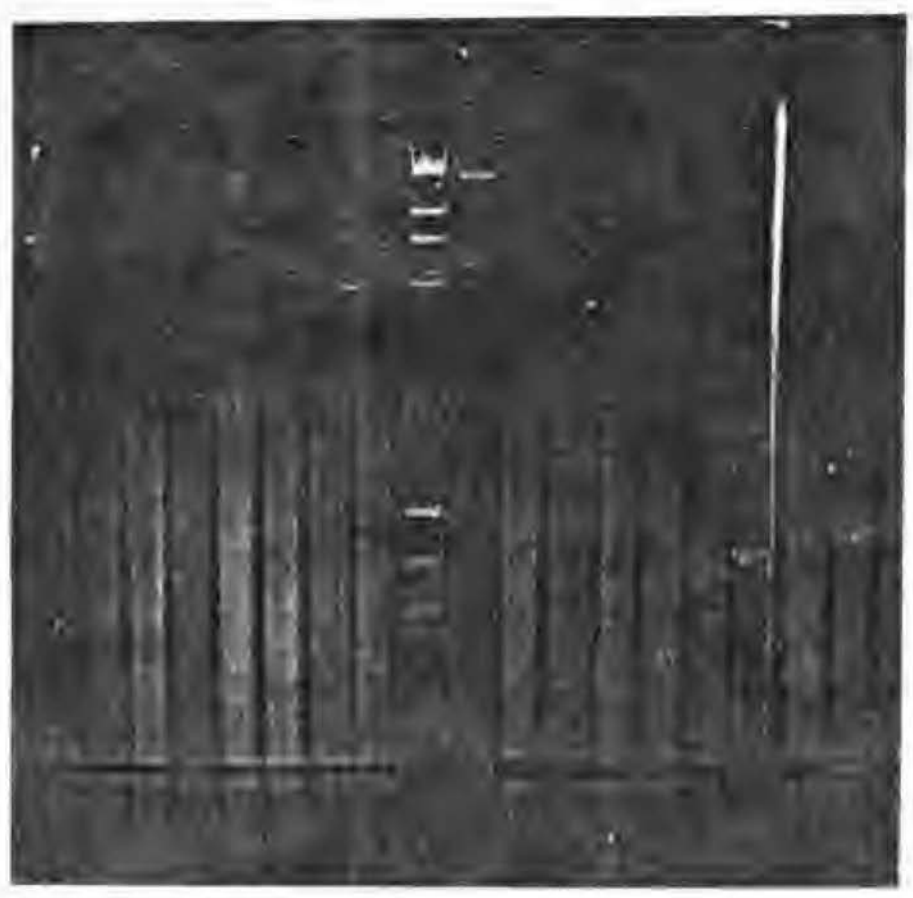


Fig. 10 Separación del gel de agarosa al 0.8 % de la banda más conspicua y consistente, 440 pb, producida por A70I en ADN de *B. subpalmata*.

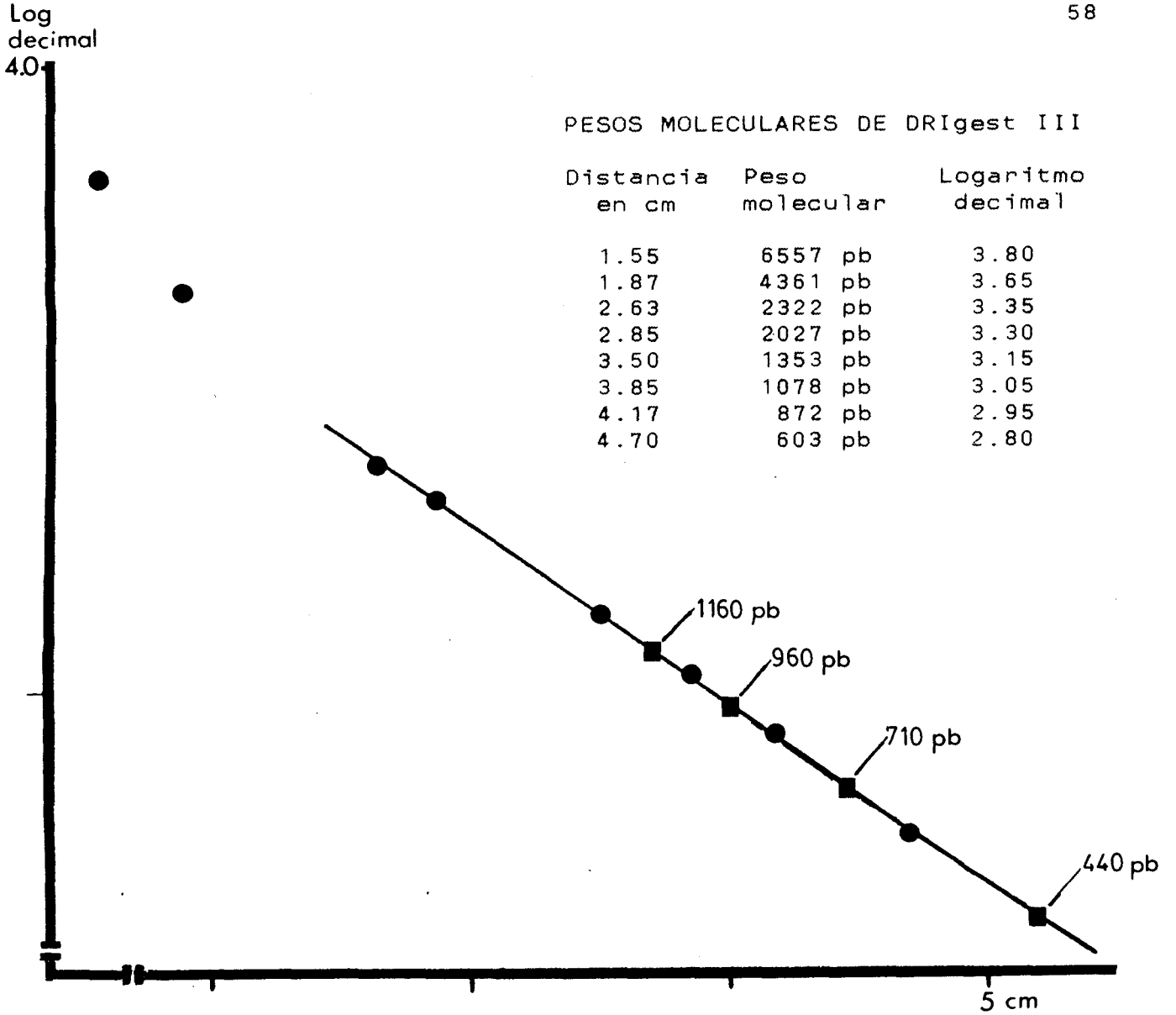


Fig. 11. Determinación de los pesos moleculares de las bandas producidas por la digestión de ADN de *B. subpalmata* con *A7uI*. A los valores en cm de las bandas de DRIGest III (datos para el eje de la Y), les corresponde un peso molecular dado, a los cuales se les sacó el logaritmo decimal (datos para el eje de la X). Con esos valores se construyó el gráfico (una línea recta) en el que se ubicaron los valores en cm de las bandas de *B. subpalmata* para obtener los logaritmos correspondientes. A los valores encontrados se les sacó su antilogaritmo y se obtuvo un valor aproximado del número de pb que posee cada una de las bandas.

La viabilidad de las células *E. coli* JM103 fue de  $6.2 \times 10^7$ , la cual fue adecuada para la transformación, ya que se encontraba dentro del rango de lo esperado, que para muchas cepas de *E. coli* es de  $4 - 8 \times 10^7$  colonias/mL. Las transformaciones de *E. coli* JM103 con los pUC13 *Sma*I/BAP y los ADN de *B. subpalmata*, con los insertos de ADN de machos, ADN de hembras y la combinación de ADN de machos y hembras, fue respectivamente de  $2.0 \times 10^4$ ,  $1.7 \times 10^4$ ,  $2.3 \times 10^4$  colonias/mL. Este rendimiento está dentro de lo esperado para transformaciones efectuadas con un vector pUC13, que son de orden de  $10^5$  colonias/mL. Las transformaciones del pUC13 cerrado (control negativo) fueron de  $2.5 \times 10^3$  colonias/mL y las del pUC8 cerrado (control positivo) de  $7.7 \times 10^5$  colonias/mL, también dentro de lo normal para esta cepa.

Al repicar las colonias transformables en placas de agar LB-SA con IPTG y X-gal con los diferentes insertos de ADN de *B. subpalmata*, se obtuvieron cientos de colonias blancas (color que indicaba que la célula tenía un inserto), como también algunas azules.

Del análisis electroforético (Fig 12), realizado a 78 clonas blancas, se seleccionaron por el tamaño del inserto 9 de ellas, todas originadas de las ligaciones con ADN de machos. Estas se denominaron: pBsA6, pBsA9, pBsA10, pBsA11, pBsA12, pBsA17, pBsA19, pBsA20 y pBsA23. La simbología de letras y números corresponde a: (p) = plásmido,

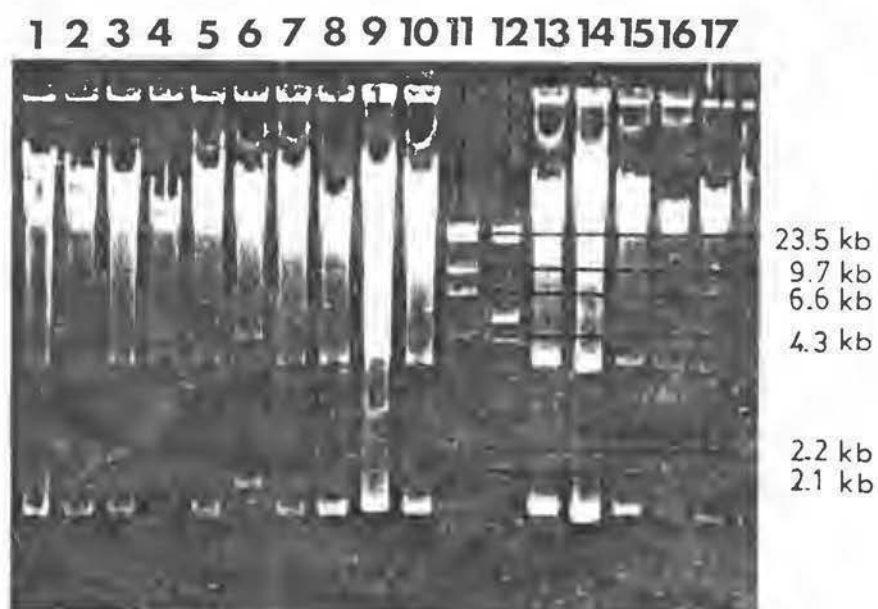


Fig. 12. Gel analítico de agarosa al 0.8 %, con las clonas pBsA1 y pBsA15 en el que se comparan los tamaños de los insertos. Se seleccionaron las clonas pBsA6, pBsA9, pBsA10, pBsA11 y pBsA12 por tener insertos mayores que el de las otras clonas. Se nota que el inserto de pBsA6 (carril 5) es más grande que los otros. Las líneas negras horizontales señalan los diferentes pesos moleculares de *lambda* cortado con *EcoRI* y *HindIII*.

(Bs) = Bolitoglossa subpalmata, (A) = fragmento de restricción generado por *A1uI* y (#) = al número de la colonia de la que fueron obtenidas.

### 3.2- MAPA FISICO DE LAS CLONAS pBsA6 y pBsA23:

De acuerdo con el mapa de restricción del múltiple sitio de clonación del pUC13 (Fig 13), la digestión doble con *BamHI* y *EcoRI* debe liberar del pUC 13 el inserto del ADN de B. subpalmata, en las diferentes clonas seleccionadas. La separación electroforética en geles de 6 % de poliacrilamida, teñidos con plata, de digestiones dobles con *BamHI* y *EcoRI*, demostró que, efectivamente, todos los insertos son liberados (Fig 14). Además, se mostró que los insertos de mayor tamaño son los de las clonas pBsA6 y pBsA23, que fueron seleccionados para análisis más completos.

El mapa de restricción de los dos plásmidos recombinantes pBsA6 y pBsA23, se obtuvo digiriendo con enzimas de restricción el fragmento liberado por *BamHI/EcoRI* (figs 15, 16 y 17), como también por digestiones dobles y triples del plásmido entero. Ambos insertos son digeridos internamente por las enzimas *HaeII* y *HaeIII*, pero no por *EcoRI*, *Sa7I*, *A1uI* y *PstI*. Adicionalmente, el plásmido pBsA6 aparentemente presenta un sitio interno para la enzima *BamHI*, no así el plásmido pBsA23. Los resultados de estas



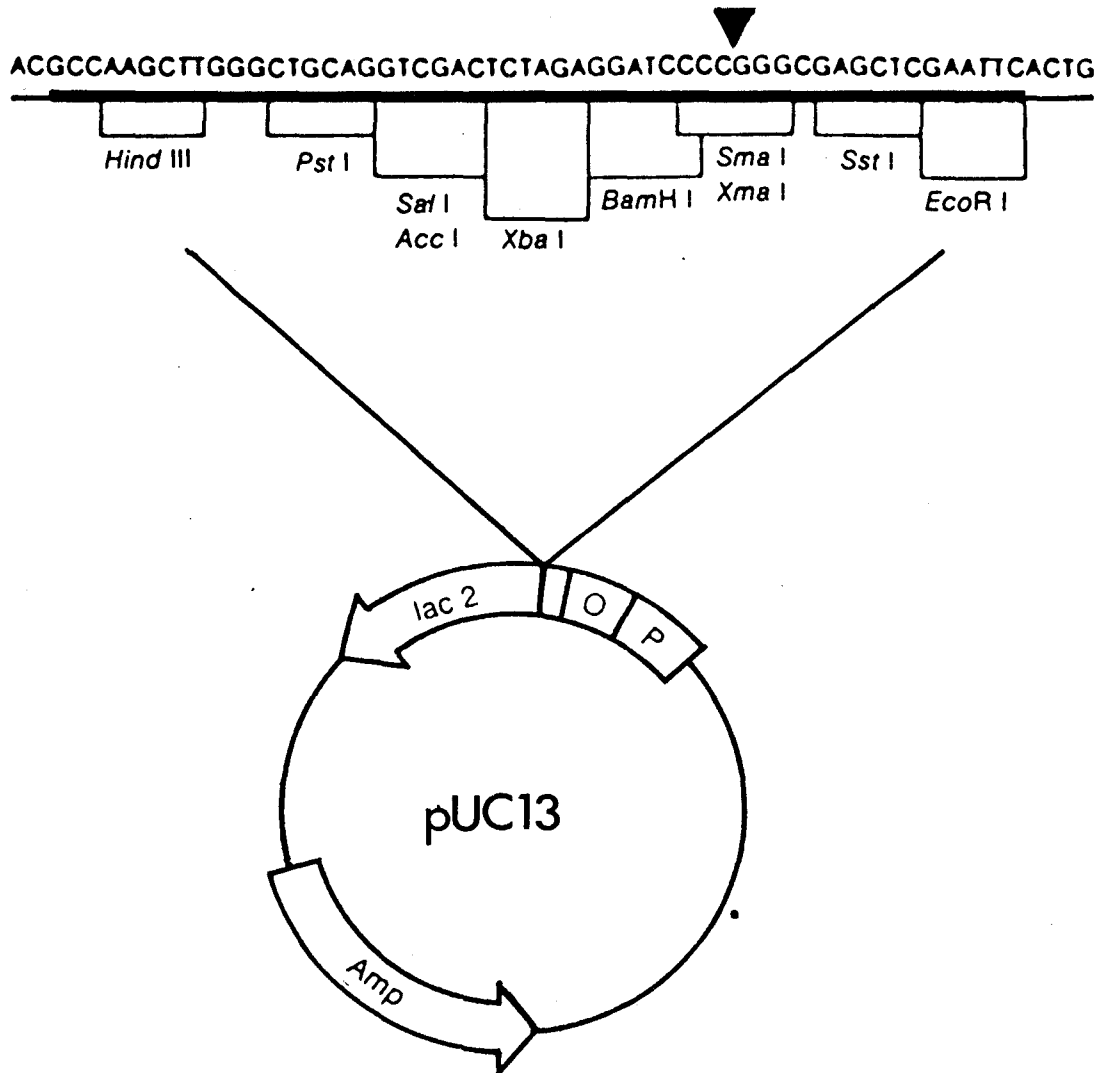


Fig. 13. Esquema del pUC13 en el que se muestra el sitio de clonación múltiple y las diferentes enzimas que lo cortan. El triángulo muestra el sitio exacto donde *Sma*I corta y linealiza el plásmido y que fue el sitio de clonamiento usado en este trabajo. Flanqueando esa secuencia de corte se encuentran los sitios de restricción de *Bam*HI y de *Eco*RI, por lo que la digestión doble con estas enzimas, libera el fragmento clonado.

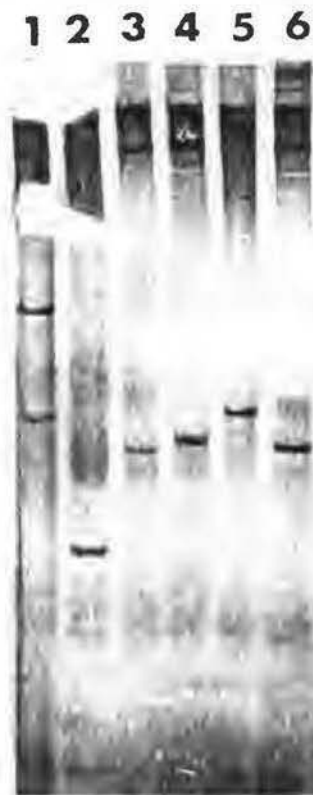


Fig. 14. Gel analítico de 6 % de poliacrilamida con 6 de las 9 clonas de pBsA digeridas con *Ban*HI y *Eco*RI. Carriles: 1) pBsA6, 2) pBsA17, 3) pBsA19, 4) pBsA20, 5) pBsA23 y 6) pBsA66. Los insertos de las clonas pBsA6 y pBsA23 que fueron analizados más a fondo, son los de mayor tamaño.

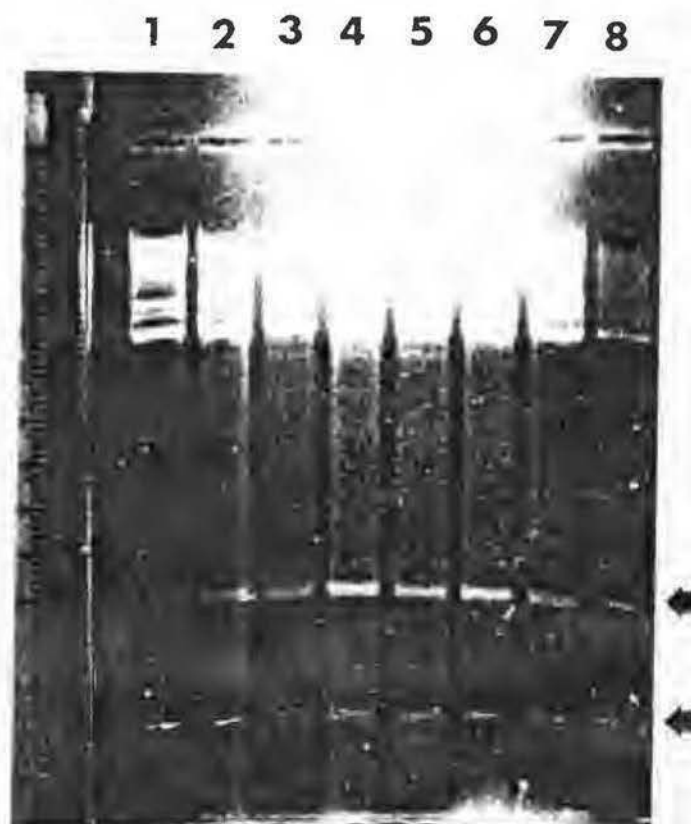


Fig. 15. Digestión del ADN de la clona pBsA6 con *Bam*HI y *Eco*RI en gel de agarosa al 1.2 %. Esta doble digestión libera dos fragmentos (los dos inferiores), que pertenecen al inserto de ADN de *B. subpalmata*. En los carriles del 1 al 7 se nota que la digestión de la clona no fue total, debido a que formó tres bandas propias de ella. Las dos superiores corresponden respectivamente a ADN cortado en un sólo sitio, mientras que la siguiente banda es la del ADN linealizado, del que se liberó el inserto. En el carril 8 se observa una digestión completa, con las tres bandas esperadas: una del plásmido linealizado sin el inserto y dos que corresponden al inserto y que aparentemente presenta un sitio *Bam*HI interno.

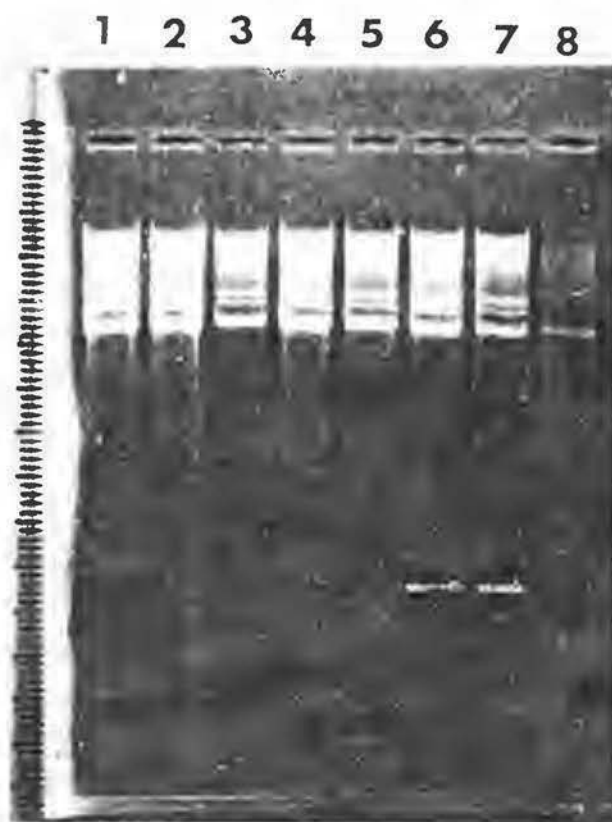


Fig. 16. Aislamiento de las bandas producidas por la doble digestión con *Ban*HI y *Eco*RI, que corresponden al inserto de ADN de *B. subpalmata* en la clona pBsA6. Foto del mismo gel en la Fig. 15, después de haber cortado las bandas. Estas bandas se congelaron a  $-20^{\circ}$  C para luego aislar el fragmento (f*B*HI*E*RI pBsA6). Las bandas señaladas con la flecha, de los carriles del 6 al 8 no fueron cortadas adecuadamente, ya que aún se nota en la fotografía, la fluorescencia que las hace visibles a la luz UV.

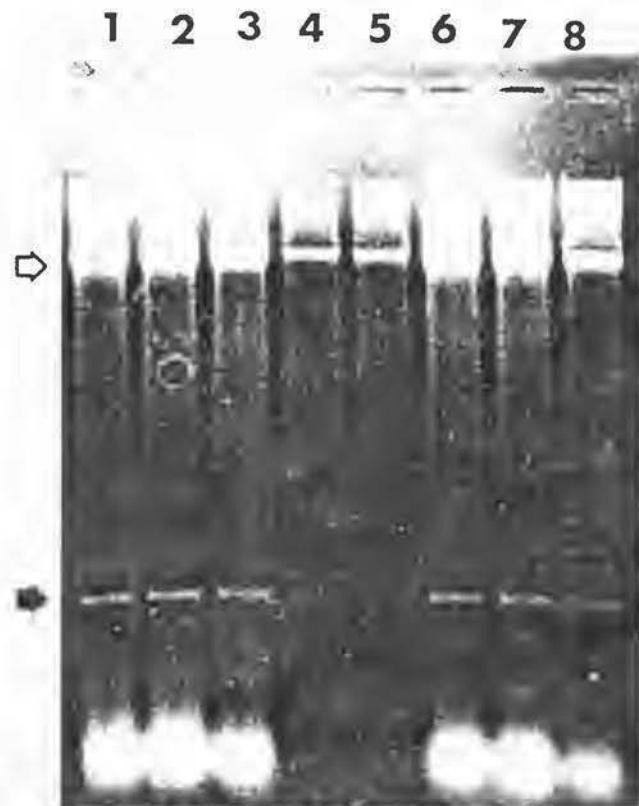


Fig. 17. Doble digestión del ADN de la clona pBsA23 con *Bam*HI y *Eco*RI en gel de agarosa al 1.2 %. La doble digestión libera dos fragmentos, el superior que corresponde al pUC13 sin el inserto y el inferior que es el inserto de ADN de *B. subpalmata*.

digestiones se presentan en las figuras 18 y 19, y se resumen en los mapas de restricción (Figs 20 y 21).

### 3.3.- ANALISIS DE LA TRANSFERENCIA DE SOUTHERN:

Las dos clonas, marcadas con UTP-biotinilado, se usaron como sondas de hibridación sobre transferencias de ADN homólogo y heterólogo, que se obtuvieron de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % (Fig 22). El plásmido pUC13 sin digerir se usó como un control positivo, en tanto que el ADN del sapo Bufo marinus sirve de control negativo. Ambas sondas hibridaron solamente en la región que corresponde a la banda de 440 pb (Fig 23).



Fig. 18. Gel analítico de 6 % de poliacrilamida, de la clona pBsA6 digerida con diferentes enzimas. Carriles: 1) *HaeIII*, 2) *EcoRI* y *HaeIII*, 3) *BamHI* y *HaeIII*, 4) *BamHI*, *EcoRI* y *HaeIII*. Digestiones realizadas a pUC13 están en los carriles: 6) *BamHI*, 7) *HaeII* y 8) *HaeIII*. Carril 9) *lambda* digerido con *EcoRI* y *HindIII* y en el carril 10) pBR322 digerido con *HaeIII*, ambos usados como marcadores de peso molecular. Los datos de este gel se utilizaron para construir el mapa de restricción de la clona pBsA6 (Fig 20).

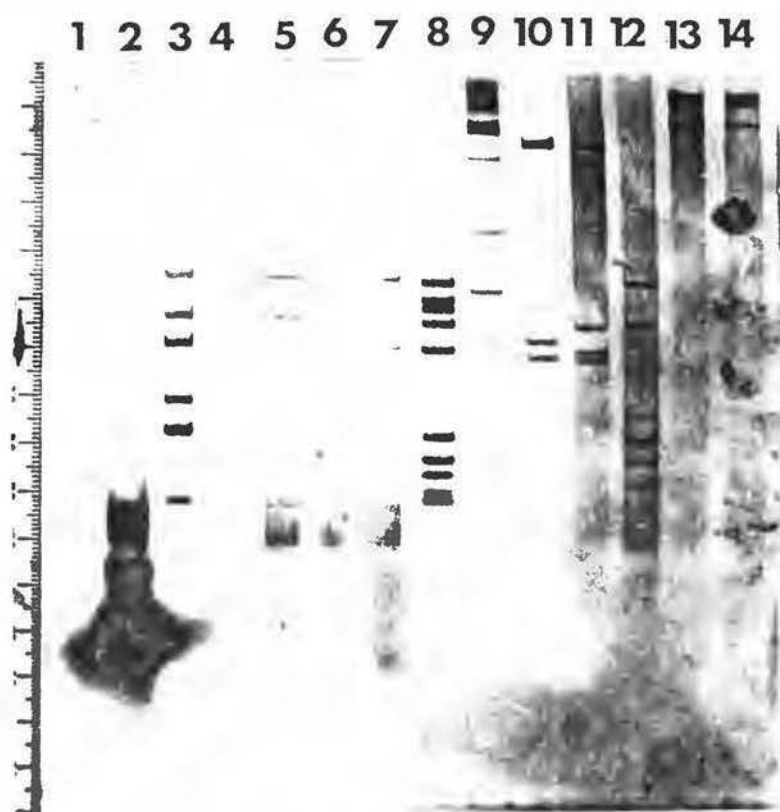


Fig. 19. Gel analítico de 6 % de poliacrilamida, de la clona pBsA23 digerida con diferentes enzimas de restricción. Carriles: 1) *Bam*HI y *Eco*RI, 4) *Hae*III, 5) *Bam*HI y *Hae*III, 6) *Eco*RI y *Hae*III, 7) *Bam*HI, *Eco*RI y *Hae*III, 11) *Hae*III, 12) *Hae*II y *Hae*III, 13) *Eco*RI con baja concentración de sal, 14) *Eco*RI y 15) *Eco*RI y *Sa*II. Carril 2) fragmento (fBHI-ERI pBsA23) digerido con *Hae*III. Las digestiones de pUC13 están en los carriles 3) *Hae*III y 10) *Hae*II. En el carril 8) pBR322 digerido con *Hae*III y en el carril 9) *lambda* digerido con *Eco*RI y *Hind*III como marcadores de peso molecular. Los datos de este gel se utilizaron para construir el mapa de restricción de la clona pBsA23 (Fig 21).



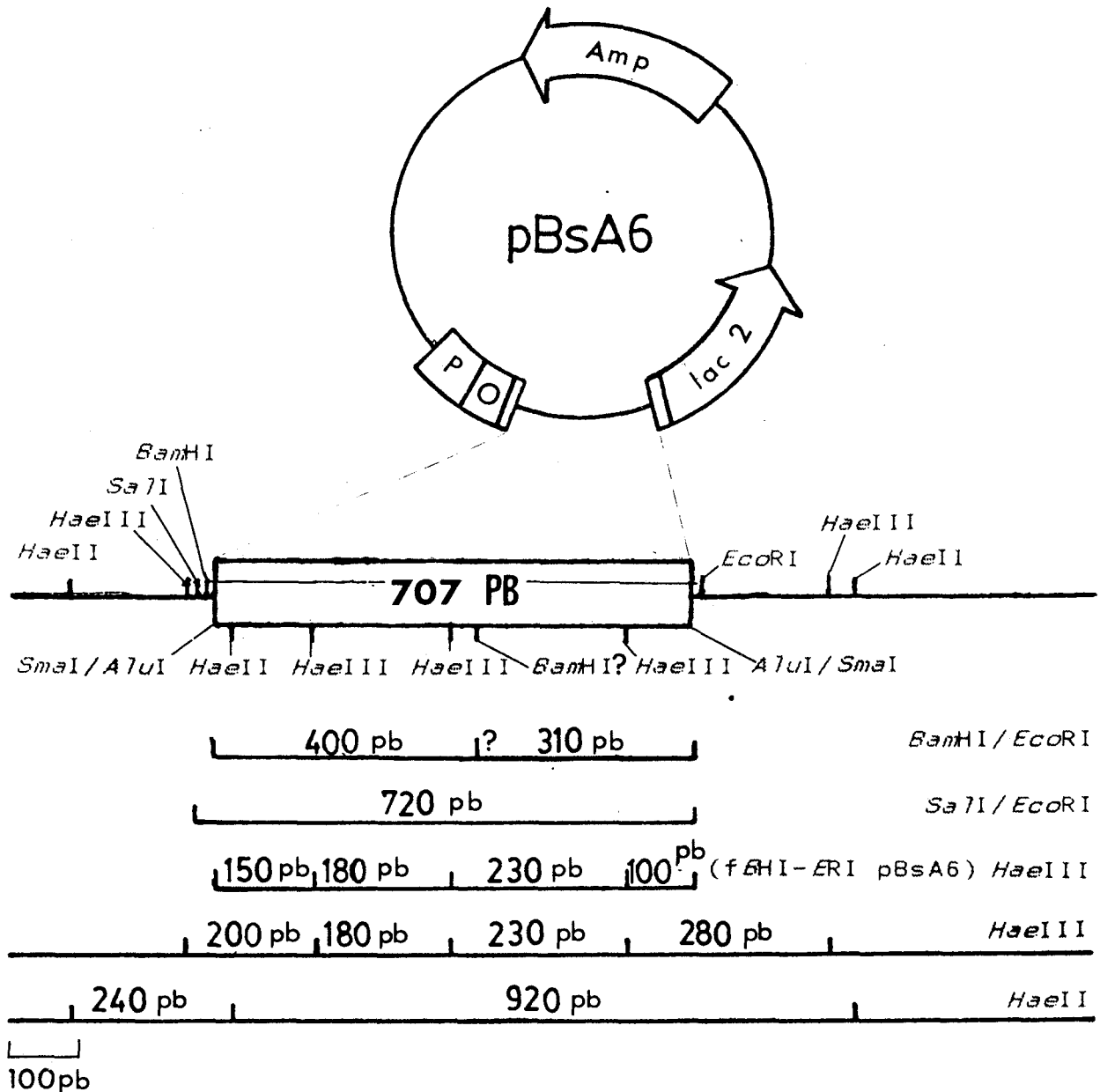


Fig. 20. Mapa de restricción del plásmido pBsA6. Elaborado usando los fragmentos de restricción (*f*<sub>BamHI-ERI</sub> pBsA6) generados por la doble digestión de *Bam*HI y *Eco*RI, los cuales a su vez fueron digeridos por las endonucleasas *Hae*II y *Hae*III y vueltos a correr en un gel analítico al 6 % de poliacrilamida. También se analizó el ADN del plásmido digerido directamente en digestiones dobles con *Bam*HI/*Eco*RI y *Eco*RI/*Sa*TI y digestiones sencillas con *Hae*II y *Hae*III.

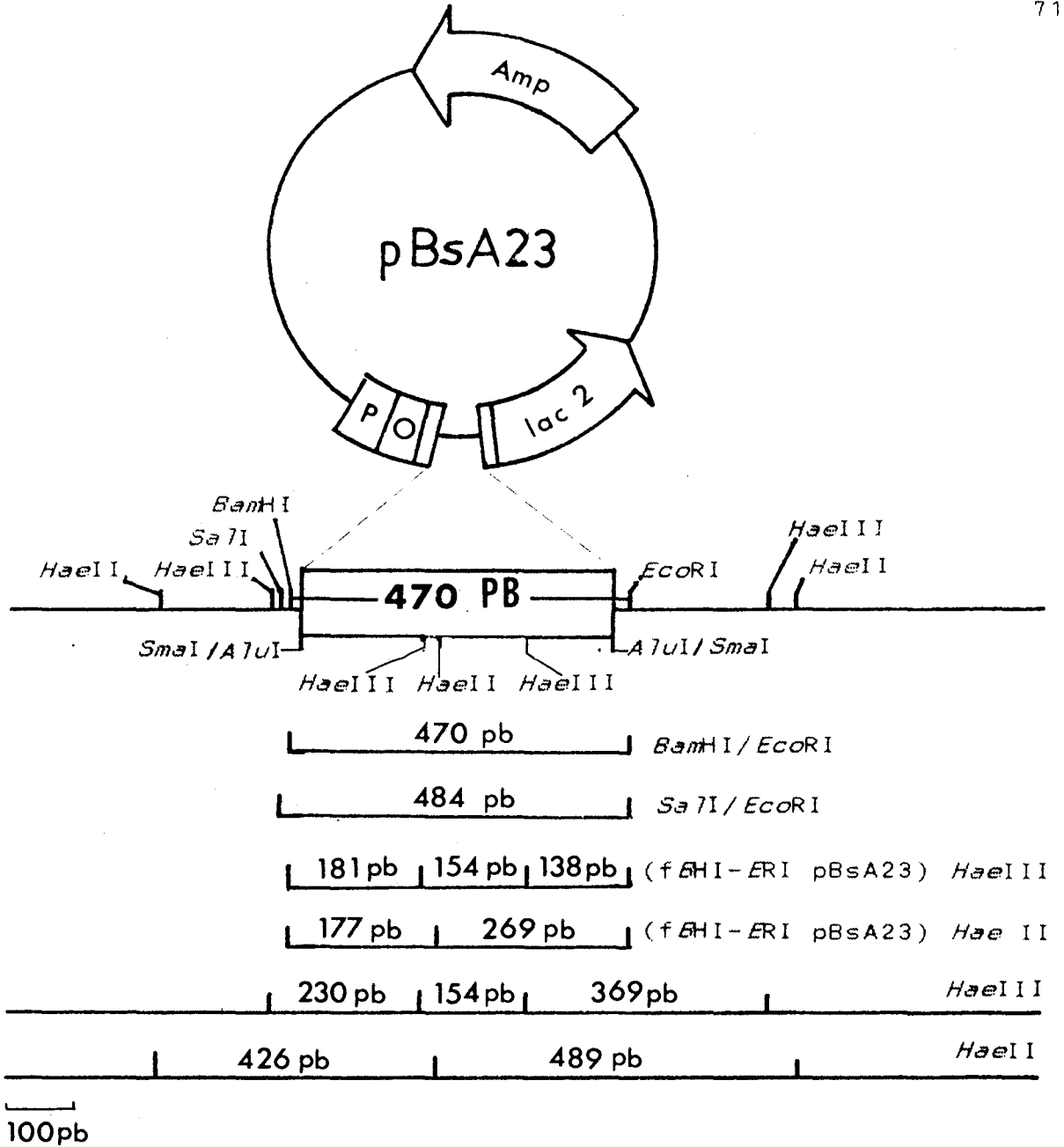


Fig. 21. Mapa de restricción del plásmido pBsA23. Elaborado usando los fragmentos de restricción (fBHI-ERI pBsA23) generados por la doble digestión de *Bam*HI/*Eco*RI, los cuales a su vez fueron digeridos por las endonucleasas *Hae*II y *Hae*III y vueltos a correr en un gel analítico al 6 % de poliacrilamida. También se analizó el ADN del plásmido digerido directamente en digestiones dobles con *Bam*HI/*Eco*RI, *Eco*RI/*Sal*I y en digestiones sencillas con *Hae*II y *Hae*III.



Fig. 22. Gel de agarosa al 0.8 % con una serie de tres diferentes muestras de ADN. De izquierda a derecha ADN de pUC13 sin digerir, ADN de *B. subpalmata* digerido con *A1uI* y ADN de *Bufo marinus* digerido con *EcoRI*. En el carril 10, *lambda* digerido con *EcoRI* y *HindIII*. Las bandas en pUC13 corresponden de arriba hacia abajo a: ADN discontinuo, ADN linearizado y ADN super helicoidal. La digestión del ADN de *B. subpalmata* fue completa, la de *Bufo marinus* fue incompleta. Las bandas de ADN de *lambda* aparecen difusas.



Fig. 23. Transferencias de Southern a papel de nitrocelulosa, del gel de la Fig 22. Las tres muestras de ADN fueron hibridadas con las sondas biotiniladas pBsA6 y pBsA23. Ambas sondas hibridaron fuertemente con el ADN del pUC13 (control positivo) y con el ADN de *B. subpalmata* en la región de la banda de 440 pb. Las sondas no hibridaron con el ADN de *Bufo marinus*.

## DISCUSION

En el genoma de las células eucariónicas, las secuencias repetidas han sido separadas en tres categorías principales: 1) las secuencias altamente repetidas que pueden ser detectadas por el bandeo C como heterocromatina, que a veces forman "satélites" en gradientes de densidad de flotación y que se organizan en tandem, 2) las secuencias repetidas de corta intercalación (SINES) que separan secuencias únicas a intervalos cortos y 3) las secuencias repetidas de larga intercalación (LINES) que también separan secuencias únicas, pero a intervalos largos. Por consiguiente, es válido preguntarse a cuál de todas esas categorías pertenece la secuencia *A7UI* de *B. subpalmata* que se ha clonado y analizado en este trabajo.

Singer (1982) ha estimado que las familias repetitivas del ADN que son visibles después de digerir el ADN con enzimas de restricción, representan al menos un 0.5 % del genoma. Como el valor C de *B. subpalmata* es de 58 pg (Macgregor, 1982), se puede calcular fácilmente que la familia *A7UI* representa 2.9 pg del ADN total, por lo que la secuencia de 440 pb debe estar presente en el genoma en, al menos, unas 6 millones de copias ( $1 \text{ pg} = 10^6 \text{ Kb}$ ). Por consiguiente, la secuencia clonada es de una familia altamente repetida. Una observación que refuerza este

criterio, es la de que la hibridación con una sonda biotinilada detectó la presencia de secuencias repetitivas, ya que las secuencias únicas no son detectadas con ese sistema.

En gradientes de cesio, el ADN de B. subpalmata no da origen a satélites; por consiguiente, esta familia debe localizarse dentro de la banda principal. En experimentos posteriores, usando la sonda biotinilada se podría determinar si el "hombro" liviano en los gradientes, corresponde a esta familia repetitiva. También se podría determinar si la familia A7uI tiene una localización centromérica en las bandas C que fueron observadas en esta tesis.

Probablemente las copias de esta familia se encuentran organizadas en tandem, ya que en una digestión parcial, separada electroforéticamente (Alegria & León, datos no publicados), se produjo una "escalera" de bandas, lo cual sugiere que este es el tipo de organización genómica. Así mismo, en una separación electroforética preliminar, se observó que ADN de otra especie de Bolitoglossa (B. striatula), también genera bandas del mismo tamaño después de digerir con A7uI. Esto sugiere que la familia A7uI, de estas salamandras, ha sido conservada durante la evolución.

En resumen, es pertinente proponer que las secuencias clonadas pertenecen a una familia de secuencias altamente repetitivas del tipo de las que pueden dar origen a

satélites en gradientes de densidad, y que se asocia con regiones de heterocromatina. Esta conclusión preliminar puede ser sometida a prueba, a través de varios experimentos apropiados.

Se hace notar que las secuencias *A7UI* también son cortadas por *HaeII* y *HaeIII*. La enzima *HaeIII* también produce fragmentos similares en digestiones de ADN total de *B. subpalmata*. Esta observación también concuerda con la supuesta organización en tandem de esta familia. Es evidente que la designación de la familia como *A7UI* es arbitraria, pues igualmente se podría referir a ella como la familia *HaeII* o *HaeIII*.

La función de estas familias repetitivas sigue siendo un enigma (Singer, 1982). Su alta tasa de divergencia en otras especies sugiere que no juegan un papel codificante, al igual que la virtual ausencia de los transcritos codificados por ellas. Sin embargo, la producción de plásmidos recombinantes con estas secuencias clonadas permitirá plantear una serie de preguntas sobre el papel de estas secuencias repetidas en el genoma de las salamandras *Plethodontidae*.

La organización de la heterocromatina centromérica en *B. subpalmata* corresponde en el modelo de Sessions & Macgregor (1986), a un cariotipo que inicia una ola de formación de heterocromatina. Según este modelo las especies

más derivadas, como supuestamente lo serían los otros miembros de la tribu Bolitoglossini, deberían presentar bloques dispersos de heterocromatina centromérica. Estudios de bandedo con otros géneros de la tribu, permitirán corroborar esta predicción.

El aumento en el contenido de ADN en los géneros más derivados de esta familia, como también en otras salamandras, es un patrón bien aceptado por citogenetistas y taxónomos, que han estudiado este orden de los anfibios (Morescalchi, 1975). Sería de gran interés determinar en las especies con mayor contenido de ADN, si este aumento se logra por la amplificación de una familia de secuencias, o se logra con la aparición de muchas familias nuevas.

Es interesante hacer constar que para realizar esta tesis, se usaron muchas de las técnicas básicas que aplican en lo que comunmente se conoce como "Ingeniería Genética", la cual es parte de las metodologías que se emplean en los procesos biotecnológicos.

Costa Rica, al igual que muchos países en vías de desarrollo, basa su economía en la exportación de sus productos agrícolas, lo cual contribuye al bienestar social de su pueblo. La importación de esos productos por los países desarrollados, puede ser afectada por la posibilidad de producción de compuestos químicos de alto valor económico (hasta ahora extraídos de plantas) en procesos industriales



de fermentación. Fragancias y sabores exquisitos pueden ahora ser producidos a bajo costo en cultivo de tejidos (Doel & Junne, 1986).

Actualmente los países desarrollados han comenzado a obtener por procesos biotecnológicos, los compuestos más caros producidos por plantas, esto podría llevar a la sustitución de un rango de plantas que actualmente se cosechan, se secan y son exportadas por muchos países. Ejemplo de lo anterior son las piretrinas usadas en la producción de insecticidas y cultivadas en Africa del Este, "thaumantin" (un edulcorante) y muchas otras plantas medicinales. En esta gran expansión de la biotecnología, aún algunas de las bebidas estimulantes (café, té, cacao) podrían llegar a ser sustituidas completamente por sabores producidos industrialmente (Doel & Junne, 1986).

Todo lo anterior implica que nuestras sociedades deben preparar desde ahora, sus cuadros de investigación básica, para implementar la estructura que permita enfrentar el momento en que nuestros productos de exportación sean sustituidos por la biotecnología.

## LITERATURA CITADA

- ADAMS, J. W., R. E. KAUFMAN, P. J. KRETSCHMER, M. HARRISON & A. W. NIENHUIS. 1980. A family of long reiterated DNA sequences, one copy of which is next to the human beta globin gene. *Nucleic Acids Res.* 8: 6113-6128.
- ARRIGHI, F. E. & T. C. HSU. 1970. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
- BALDWIN, L. & H. C. MACGREGOR. 1985. Centromeric satellite DNA in the newt *Triturus cristatus karelinii* and related species: Its distribution and transcription lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 92: 100-107.
- BARSACHI-PILONE, G., R. BATISTONI, F. ANDRONICO, L. VITELLI & I. NARDI. 1986. Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela). I. A satellite DNA component of the pericentric C-bands. *Chromosoma* 93: 435-446.
- BENNETT, K. L. & N. D. HASTIE. 1984. Looking for relationships between the most repeated dispersed DNA sequences in the mouse: small R elements are found associated consistently with long MIF repeats. *EMBO J.* 3: 467-472.
- BENNETT, K. L., R. E. HILL, D. F. PIETRAS, M. W. GUTAI, C. KANE-HAAS, J. M. HOUSTON, J. K. HEATH & N. D. HASTIE. 1984. Most highly repeated dispersed DNA families in the mouse genome. *Mol. Cell Biol.* 4: 1561-1571.
- BERNARDI, G., B. OLOFSSON, J. FILIPSKI, M. ZERIAL, J. SALINAS, G. CUNY, M. MEUNIER-ROTIVAL & F. RODIER. 1985. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228: 953-957.
- BERNARDI, G. & G. BERNARDI. 1986. Compositional constraints and genome evolution. *J. Mol. Evol.* 24: 1-11.
- BOUCHARD, R. A. 1982. Moderately repetitive DNA in evolution. *Int. Rev. Cytol.* 76: 113-193.
- BROWN, D. D., P. C. WENSINK & E. JORDAN. 1971. Purification and some characteristics of 5S DNA from *Xenopus laevis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68 (12): 3175-3179.

- CAVALIER-SMITH, T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell, growth rate, and the solution of the DNA C-Value paradox. *J. Cell. Sci.* 34: 247-278.
- CAVALIER-SMITH, T. 1980. How selfish is DNA?. *Nature* 285: 617-618.
- CHENG, S. M. & C. L. SCHILDKRAUT. 1980. A family of moderately repetitive sequences in mouse DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4075-4090.
- COMINGS, D. E. 1978. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *AM. J. Hum. Genet.* 20: 550-560.
- CONGER, A. D. & L. M. FAIRCHILD. 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.
- COOPER, G. M., G. GOUBIN, A. DIAMOND & P. NEIMAN. 1986. Relationship of Blym genes to repeated sequences. *Nature* 320: 579-580.
- CROUSE, J. & D. AMORESE. 1986. Stability of restriction endonucleases during extended digestions. *Focus* 8 (3): 1-2.
- CUNY, G., P. SORIANO, G. MACAYA & G. BERNARDI. 1981. The major components of the mouse and human genomes. 1. Preparation, basic properties and compositional heterogeneity. *Eur. J. Biochem.* 115: 227-233.
- D'AMBROSIO, E., S. D. WAITZKIN, F.R. WITNEY, A.SALEMME & A. V. FURANO. 1986. Structure of the highly repeated, long interspersed DNA family (LINE or L1Rn) of the rat. *Mol. Cell Biol.* 6 (2): 411-424.
- DAVIDSON, E. H. & R. J. BRITTEN. 1979. Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences. *Science* 204: 1052-1059.
- DAVIS, L. G., M. D. DIBNER, J. F. BATTEY. 1986. *Basic Method in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co., Inc. 388 p.
- DEMERS, G. W., K. BRECH & R. C. HARDISON. 1986. Long interspersed L1 repeats in rabbit DNA are homologous to L1 repeats of rodents and primates in an open-reading-frame regions. *Mol. Biol. Evol.* 3 (3): 179-190.

- DENTE, L., M. SOLLAZZO, C. BALDARI, G. CESSARENI & R. CORTESE. 1985. The pEMBL family of single-stranded vectors, in: DNA Cloning I. A Practical Approach edited by D. M. Glover, IRL Press Limited, England, pp. 101-107.
- DIAZ, M. O., G. BARSACHI-PILONE, K. A. MAHON & J. G. GALL. 1981. Transcripts of both strands of a satellite DNA occur on lampbrush chromosome loops of the newt Notophthalmus. Cell 24: 649-659.
- DIAZ, M. O. & J. G. GALL. 1985. Giant readthrough transcription units at the histone loci on lampbrush chromosomes of the newt Notophthalmus. Chromosoma 92 (4): 243-253.
- DEININGER, P. L. & G. R. DANIELS. 1986. The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. Trends in genetics 2 (3): 76-80.
- DOOLITTLE, W. F. & C. SAPIENZA. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284: 601-603.
- DOEL, K. v. d. & G. JUNNE. 1986. Product substitution through biotechnology: impact on the third world. TIBTECH 4 (4): 88-90.
- DOVER, G. 1980. Ignorant DNA?. Nature 285: 618-620.
- FANNING, T. G. 1983. Size and structure of the highly repetitive *Bam*HI element in mice. Nucleic Acids Res. 11: 5073-5091.
- FILIPSKI, J. 1987. Correlation between molecular clock ticking, codon usage, fidelity of DNA repair, chromosome banding and chromatin compactness in germline cells. FEB 217 (2): 184-186.
- FILIPSKI, J., J. SALINAS & F. RODIER. 1987. Two distinct compositional classes of vertebrate gene-bearing DNA stretches, their structures and possible evolutionary origin. DNA 6 (2): 109-118.
- FOCUS. 1986. BRL pUC Host: E coli DH5 component cells. Focus 8 (2): 9.
- GABOR M., G. L. 1982. Sequencing and manipulating highly repeated DNA, in: Genome Evolution edited by G. A. Dover and R. B. Flavell, Systematics Association, vol. 20, Academic Press, London, pp. 41-67.

- GOLDMAN, M. A., G. P. HOLMQUIST, M. C. GRAY, L.A. CASTON & A. NAG. 1984. Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science* 224: 686-692.
- GRIMALDI, G. & M. F. SINGER. 1983. Members of the *KpnI* family of long interspersed repeated sequences join and interrupt alfa-satellite in the monkey genome. *Nucleic Acids Res.* 11: 321-328.
- GRIMALDI, G., J. SKOWRONSKI & M. F. SINGER. 1984. Defining the beginning and end of *KpnI* family segments. *EMBO J.* 3: 1753-1759.
- GUENET, J. 1986. La localización de los genes en los cromosomas de mamíferos. *Interferón y Biotecnología* 3 (1): 53-59.
- HANAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, in: *DNA Cloning I. A Practical Approach* edited by D. M. Glover, IRL Press Limited, England, pp. 109-135.
- IGLOI, G. L. 1983. A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.* 134: 184-188.
- JAMRICH, M. R. WARRIOR, R. STEELE & J. G. GALL. 1983. Transcription of repetitive sequences on *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1012-1016.
- JEFFREYS, A., V. WILSON & S. L. THEIN. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- JELINEK, W. R., T. P. TOOMEY, L. LEINWAND, C. H. DUNCAN, P. A. BIRO, P. V. CHOUDARY, S. M. WEISSMAN, C. M. RUBIN, C. M. HOUCK, P. L. DEININGER & C. W. SCHMID. 1980. Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 1398-1402.
- JELINEK, W. R. & C. W. SCHMID. 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 813-844.
- JOHN, B., R. APPELS & N. CONTRERAS. 1986. Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. II. Molecular characterisation of the distal C-band polymorphisms. *Chromosoma* 94: 45-58.

- KATO, S., R. A. ANDERSON & R. D. CAMERINI-OTERO. 1986. Foreign DNA introduced by calcium phosphate is integrated into repetitive DNA elements of the mouse L cell genome. *Mol. Cell. Biol.* 6 (5): 1787-1795.
- KATZIR, N., G. RECHAVI, J. B. COHEN, T. UNGER, F. SIMONI, S. SEGAL, D. COHEN & D. G. 1985. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene *c-myc* in canine transmissible venereal tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1054-1058.
- KEZER, J. & K. SESSIONS, 1979. Chromosome variation in the Plethodontid Salamander, *Aneides ferreus*. *Chromosoma* 71: 65-80.
- KING, M. 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217.
- KIT, S. 1961. Equilibrium centrifugation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Molec. Biol.* 3: 711-716.
- KUNKEL, T. A. & L. A. LOEB. 1981. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213: 765-767.
- LA MARCA, M., D. ALLISON & D. M. SKINNER. 1981. Irreversible denaturation mapping of a pyrimidine-rich segment of a complex satellite DNA. *J. Biol. Chem.* 256: 6475-6479.
- LAIMINS, L., M. HOLMGREEN-KONIG & G. KHOURY. 1986. Transcriptional "silencer" element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin 1 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 3151-3155.
- LARSON, A. 1984. Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae, in: *Evolutionary Biology*, Vol. 17 (T. Dobzhansky, M. K. Hecht and W. C. Steere, eds.), Plenum, New York, pp. 119-217.
- LEON, P. E. & J. KEZER. 1978. Localization of 5S RNA genes on chromosomes of Plethodontid salamanders. *Chromosoma* 65: 213-230.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A. A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

- MACGREGOR, H. C. & J. KEZER. 1971. The Chromosomal localization of a heavy satellite DNA in the testis of Plethodon c. cinereus. *Chromosoma* 33: 167-182.
- MACGREGOR, H.C. 1979. In situ hybridization of highly repetitive DNA to chromosomes of Triturus cristatus. *Chromosoma* 71: 57-64.
- MACGREGOR, H. C. 1982. Big chromosomes and speciation amongst Amphibia, in: *Genome Evolution* (G. A. Dover, R. B. Flavell eds.), Academic Press, New York, London, pp. 325-341.
- MACGREGOR, H. C. & S. K. SESSIONS. 1986. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus Triturus: an evolutionary perspective. *Phil. Trans. R. Soc. London B.*, 312: 243-447.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH & J. SAMBROOK. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., N. Y. 545 p.
- MANUELIDIS, L. 1980. Novel classes of mouse repeated DNAs. *Nucleic Acids Res.* 8: 3247-3258.
- MANUELIDIS, L. 1982. Nucleotide sequence definition of a major human repeated DNA, the *HindIII* 1.9 kb family. *Nucleic Acids Res.* 10: 3211-3219.
- MEUNIER-ROTIVAL, M., P. SORIANO, G. CUNY, F. STRAUSS & G. BERNARDI. 1982. Sequence organization and genomic distribution of the major family of interspersed repeats of mouse DNA. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 79: 355-359.
- MORESCALCHI, A. 1975. Chromosome evolution in the caudate amphibia, in: *Evolutionary Biology*, vol. 8 (T. Dobzhansky, M. K. Hecht and W. C. Steere, eds.) Plenum New York, pp. 339-387.
- NARDI, I., F. ANDRONICO, S. DE LUCHINI & R. BATISTONI. 1986. Cytogenetics of the European Plethodontid salamanders of the genus Hydromantes (Amphibia, Urodela). *Chromosoma* 94: 377-388.
- ORGEL, L. E. & F. H. C. CRICK. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- PERBAL, B. 1984. *A Practical Guide to Molecular Cloning*. John Wiley & Sons Inc., USA. 554 p.

- PEREZ T., S. 1986. Elución de fragmentos de ADN en geles de agarosa. *Interferón y Biotecnología* 3 (2): 148-150.
- PHILIPPSEN, P., R. A. KRAMER & R. W. DAVIS. 1978. Cloning of the yeast ribosomal DNA repeat unit in *Sst*I and *Hind*III lambda vectors using genetic and physical size selections. *J. Mol. Biol.* 123: 371-386.
- PINNA-SENN, E., I. E. DI TADA & J. A. LISANTI. 1987. Polymorphism of the micro chromosomes and the nucleolar organizer region in *Pristidactylus achalensis* (Sauria: Iguanidae). *Herpetologica* 43 (1): 120-127.
- RIGBY, P. W. J., M. DIECKMANN, C. RHODES & P. BERG. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-254.
- ROGERS, J. H. 1985. The origin and evolution of retroposons. *Int. Rev. Cytol.* 93: 187-279.
- ROGERS, J. H. 1986. Relationship of *Blym* genes to repeated sequences. *Nature* 320: 579.
- ROIZES, G. P. & M. PAGES. 1982. Conserved and divergent sequences of bovine satellite DNA, in: *Genome Evolution*, (G. A. Dover, R. B. Flavell eds.), Academic Press, New York, London, pp. 95-111.
- SALINAS, J. 1986. Compartimentalización del genoma en los vertebrados. *Investigación y Ciencia* 114: 44-45.
- SCHMID, M., J. OLERT & C. KLETT. 1979. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55.
- SENTIS, C., J. SANTOS & J. FERNANDEZ-PIQUERAS. 1986. C-heterochromatin polymorphism in *Baetica ustulata*: Intra-individual variation and fluorescence banding patterns. *Chromosoma* 94: 65-70.
- SESSIONS, S. K. & J. KEZER. 1987. Cytogenetic evolution in the plethodontid salamander genus *Aneides*. *Chromosoma* 95: 17-30.
- SHAFIT-ZAGARDO, B., F. L. BROWN, J. J. MAIO & J. W. ADAMS. 1982. *Kpn*I families of long, interspersed repetitive DNA's associated with the human beta-globin gene cluster. *Gene* 20: 397-407.



- SINGER, M. F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76: 67-112.
- SINGER, M. F. & J. SKOWRONSKI. 1985. Making sense out of LINES: long interspersed repeat sequences in mammalian genomes. *TIBS* 8: 119-122.
- SKINNER, D. M. 1977. Satellite DNAs. *BioSci.* 27: 790-796.
- SMITH, T. F. 1980. Occam's razor. *Nature* 285: 620.
- SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- SOUTHERN, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments, *Methods in Enzymology* 68: 152-176.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- SUN, L., K. E. PAULSON, C. W. SCHMID, L. KADYK & L. LEINWAND. 1984. Non-*A7u* family repeats in human DNA and their transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 12: 2669-2690.
- SUTCLIFFE, J. G. 1978. pBR 322 restriction map marked from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res.* 5: 2721-2728.
- THIERY, J. P., G. MACAYA & G. BERNARDI. 1976. An analysis of eucaryotic genomes by density gradient centrifugation. *J. Mol. Biol.* 108: 219-235.
- VARLEY, J. M., H. C. MACGREGOR, I. NARDI, C. ANDREWS & H. P. ERBA. 1980. Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex*. *Chromosoma* 80: 289-307.
- VIAL, J. L. 1966. Variation in altitudinal populations of the salamander, *Bolitoglossa subpalmata*, on the Cerro de la Muerte, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 14 (1): 111-121.
- VIAL, J. L. 1968. The ecology of the tropical salamander, *Bolitoglossa subpalmata*, in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 15 (1): 13-115.

- VOLIVA, C. F., C. L. JHAN, M. B. COMER, C. A. HUTCHISON III & M. H. EDGELL. 1983. The L1Md long interspersed repeat family in the mouse: almost all examples are truncated at one end. *Nucleic Acids Res.* 11: 8847-8859.
- WAKE, D. 1966. Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. *Mem. South. Calif Acad. Sci.* 4, 1-111.
- WAKE, D. B. & J. F. LYNCH. 1976. The distribution, ecology, and evolutionary history of Plethodontid salamanders in tropical America. *Sci. Bull. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Co.* 25: 1-65.
- WAKE, D. B., MAXSON, L. R. & G. Z. WURTZ. 1978. Genetic differentiation, albumin evolution, and their biogeographic implications in Plethodontid salamanders of California and Southern Europe. *Evolution* 32: 529-539.
- WAKE, D. B. & P. ELIAS. 1983. New genera and new species of Central American salamanders, with a review of the tropical genera (Amphibia, Caudata, Plethodontidae). *Contributions in Science. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Co.*, 345: 1-19.
- WEBB, G. C. 1976. Chromosome organization in the Australian plague locust Chortoicetes terminifera. I. Banding relationship of the normal and supernumerary chromosomes. *Chromosoma* 55: 229-246.
- WEISS, B. 1976. Endonuclease II of Escherichia coli is exonuclease III. *J. Biol. Chem.* 251: 1896-1901.
- YUNIS, J. J., L. ROLDAN, W. G. YASMINEH & J. C. LEE. 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature* 231: 532-533.
- YUNIS, J. J. 1981. Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. *Hum. genet.* 56: 293-298.
- ZUCKERKANDL, E. 1986. Polite DNA: Functional density and compatibility in genomes. *J. Mol. Evol.* 24: 12-27.