



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ESTUDIOS DE GENÓMICA ESTRUCTURAL Y  
FUNCIONAL EN PECES CON INTERÉS EN  
ACUICULTURA

Memoria para optar al grado de  
Doctor en Biología presentada por:

**M<sup>a</sup> Belén Cano Roldán**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: M<sup>a</sup> Belén Cano Roldán  
D.L.: GR 2262-2014  
ISBN: 978-84-9083-323-0



D. **José Carmelo Ruíz Rejón** catedrático de la Universidad de Granada y  
Dña. **Francisca Robles Rodríguez** profesora asociada de la Universidad de  
Granada.

**HACEN CONSTAR:**

Que la presente memoria con título: **ESTUDIOS DE GENÓMICA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL EN PECES CON INTERÉS EN ACUICULTURA**. Que presenta Dña **Mª Belén Cano Roldán** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado por el doctorando bajo su dirección. Y considerando que representa el trabajo de Tesis Doctoral, autorizan su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, expiden y firman la presente autorización en Granada 26 de junio de 2013.

**Dr. Jose Carmelo Ruiz Rejón**

**Dra. Francisca Robles Rodríguez**

**Maria Belén Cano Roldán**



Parte de los resultados que se presentan en esta memoria han sido publicados: “Determining the specific status of the Iberian sturgeons by means analyses of old specimens”. Robles F, Cano-Roldán B, Ruiz Rejón C, Martínez-González LJ; Lorente JA, Riquelme Cantal JA, Carrasco Rus J, Ruiz Rejón M. *Advances in Bioscience and Biotechnology*.2010. vol 1.pp. 171-179.

Asimismo, parte de los resultados han sido presentados en los siguientes congresos:

- “Implicaciones de los análisis genéticos para la conservación de los esturiones”. Robles F, De la Herrán R, Cano-Roldán B, Ruiz Rejón C and Ruiz Rejón M. II Jornadas de Conservación de la Diversidad Biológica. 2009. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña.
- “Determining the specific status of the Iberian sturgeons by means genetic analyses of old specimens”. Robles F, Cano-Roldán B, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M and De la Herrán R. 6th International Symposium on Sturgeon. 2009. Wuhan, China.
- “Análisis filogenético de los peces planos utilizando ADN repetido”. Robles F, Cano-Roldán B, Navajas-Pérez R, Ruiz Rejón C, De la Herrán R. XVIII Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución. 2010. Guitiriz, Lugo
- “Análisis citogenético-molecular de una secuencia repetida conservada en Teleósteos”. Robles F, Cano-Roldán B, Navajas-Pérez R, Molina MJ, De la Herrán R, Ruiz-Rejón C. 2010. VI Seminario de Citogenética. Córdoba
- “Estudio de ESTs aisladas a partir de gónadas de esturión (*Acipenser naccarii*) mediante hibridación substractiva”. Robles F, Cano B, Molina-Luzón MJ, Navajas-Pérez R, de la Herrán R, Ruiz Rejón C. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética. 2011. Murcia.



Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto del Ministerio de Ciencia e Investigación (AGL2009-11872), por Proyecto PLEUROGENE (Pleurogene-Flatfish Genomics: Enhancing Commercial Culture Of Atlantic Halibut and Senegal Solea) a través de Fundación GENOMA-ESPAÑA (Ministerio de Economía y Competitividad; Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; Ministerio de Industria, Energía y Turismo; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y la Junta de Andalucía) y por el Proyecto de Investigación de Excelencia en Equipos de Investigación: “Implicaciones y aplicaciones de la genética molecular en los esturiones (Familia Acipenseridae). Junta de Andalucía.





# AGRADECIMIENTOS

Sin duda este apartado es uno de los últimos y más difíciles de escribir debido al entramado de personas que colaboran de forma directa e indirecta en una tesis. Comenzaré por mis directores: La Dra. Francisca y el Cat. Carmelo porque han creído en mí, sin este primer paso, nunca hubiera podido realizar esta tesis.

Gracias a Carmelo, por resolver muchas dudas sobre peces planos, satélites, filogenias, secuencias consenso, esturiones y colegios, y por infundir tranquilidad en los momentos en los que se ve todo negro. A Paqui, por ser más que una directora una compañera de laboratorio, compartiendo todos sus conocimientos, apoyando y ayudando en todo lo que está a su alcance.

Al Dr. Roberto, por haber confiado también en mí, por el gran interés, preocupación, apoyo y ayuda mostrados en todo momento. Al Dr. Rafa, por su disposición y apoyo.

Al profesor Dr. Manuel Ruiz, a quien le debo el pertenecer a este gran grupo, por su sabiduría e inestimable ayuda a lo largo de estos años, ha sido un lujo haber podido trabajar con él.

A mis compañeros de fatigas: A Chuchi, por estar ahí para escuchar historias de hijos, padres y peces. A Jose y Alejandra, por sus albóndigas y espaguetis. A Gema y a Paola unas excelentes alumnas internas y mejores personas. A Pedro, por sus charlas y programas informáticos. Con ellos, esto se ha hecho más ameno.

A mi familia, sobretodo a mis padres, José y Milagros, por todo el amor que me han dado. A mi hermana Africa y a mis hermanos Miguel y Jose.

A Jorge, por ser mi compañero, mi amigo, y por compartir sus alelos conmigo. Por ser la persona que ha sufrido en la sombra todo este proceso, y a pesar de eso, nunca ha faltado su apoyo. A Juanita, por quedarse con los niños para que esto saliera adelante.

A mis hijos, porque a pesar de no haberles dado toda la atención que necesitan, me miran como si fuera la mejor madre del mundo.



## RESUMEN

El Orden Pleuronectiformes está formado por un gran número de especies de peces planos que tienen un gran interés, por un lado, desde el punto de vista evolutivo, ya que presentan genomas muy pequeños y variables, y por otro, desde el punto de vista económico, pues algunas especies como el lenguado, el fletan o el rodaballo son utilizadas en Acuicultura. De hecho, existen varios proyectos para analizar sus genomas y utilizar los datos obtenidos para la mejora en su cultivo. En este sentido, sería muy interesante tener identificados los ADNs repetidos existentes en sus genomas. De hecho, hasta hoy, sólo se ha caracterizado un ADN satélite en una especie de pez plano endémica de Brasil (*Achirus linneatus*) y otro en una especie endémica del sur de España, la acedía (*Dicologlossa cuneata*). En esta Tesis se han caracterizado dos ADN satélite centromérico, uno (familia Sacl) en el fletan (*Hippoglossus hippoglossus*) en y otro (familia PvuII) en tres especies del Género Solea. Discutimos su localización, características moleculares y modo de evolución.

Además, hemos estudiado una secuencia repetida, que hemos denominado ACA72, que se ha caracterizado en un extenso grupo de peces planos, y que hemos utilizado como marcador para clarificar las relaciones filogenéticas dentro del Orden Pleuronectiformes. Además, hemos puesto de manifiesto la presencia de dicha secuencia en otros grupos de peces, del Orden Perciformes y, analizando las bases de datos, hemos constatado su existencia en otros Ordenes de peces, tales como Gasterosteiformes, Tetraodontiformes y Cypriniformes, lo que nos ha permitido establecer relaciones filogenéticas entre todos estos grupos de peces.

Con respecto a los esturiones, algunas de las especies de este Orden Acipenseriforme, se han venido explotando para la producción de caviar y de carne, por lo que son también de gran interés desde el punto de vista económico. Adicionalmente hay que resaltar que muchas poblaciones de esturiones se encuentran en franco retroceso, estando muchas especies en peligro de extinción. Todo ello, hace que su cultivo sea prioritario y se impone tener un conocimiento científico adecuado de tales organismos que ayuden a

ello. Uno de los principales objetivos es el conocimiento de la determinación y diferenciación sexual ya que los esturiones son unos peces que tardan en madurar sexualmente de 8 a 10 años, sin que, hasta el final, se pueda diferenciar morfológicamente entre sexos. La identificación precoz del sexo en los esturiones para poder identificar a las hembras (para la producción de caviar) en los primeros estadios es, por lo tanto, de gran interés. En esta Memoria, se ha realizado una hibridación sustractiva con tejido gonadal de machos y hembras de la especie *A. naccarii*, obteniéndose una genoteca de hembras y una genoteca de machos. Posteriormente, hemos analizado estas genotecas, y hemos profundizado en el análisis de los genes que hemos considerado podían tener interés en el desarrollo gonadal. Para ello, se ha realizado un estudio de expresión diferencial entre sexos por medio de PCR cuantitativa, con algunos de los genes seleccionados, tales como ZP3.2, ZP3.3, Proteína de unión al calcio y Ferritina, ayudando a dilucidar en cierto modo, la importancia de dichos genes en la diferenciación sexual de estos animales.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
1.1. Estudios de Genómica Estructural: El ADN repetido.....	31
1.1.1. Características. ....	31
1.1.2. Localización del ADN satélite. ....	31
1.1.3. Función del ADN satélite. ....	32
1.1.4. Evolución del ADN satélite. ....	33
1.1.5. Uso del ADN satélite par la realización de filogenias. ....	37
1.1.6. Los peces planos. ....	38
1.1.7. Taxonomía de peces planos. ....	38
1.2. Estudios de genómica funcional.....	42
1.2.1. Determinación y diferenciación sexual en peces.....	42
1.2.2. Determinación sexual monogénica: los cromosomas sexuales .....	43
1.2.3. Genes para la determinación sexual .....	44
1.2.4. Familia Acipenseridae (Esturiones).....	46
1.3. Estudios de determinación y diferenciación sexual en esturiones.....	48
1.3.1. Estudios citogenéticos.....	48
1.3.2. Técnicas de manipulación cromosómica.....	48
1.3.3. Técnicas físicas y fisiológicas para el estudio de la diferenciación sexual. .....	49
1.3.4. Estudios moleculares para la determinación del sexo en esturiones .....	50
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1. Material empleado y Procedencia. ....	61
3.1.1. Peces planos (Orden Pleuronectiformes).....	61
3.1.2. Esturiones (Orden Acipenseriformes).....	62
3.2. Métodos utilizados.....	64
3.2.1. Extracción de ADN. ....	64
3.2.2. Extracción y purificación de ARN. ....	65
3.2.3. Síntesis de ADNc. Reacción de Retrotranscripción. ....	70
3.2.4. Aislamiento de ADN repetido. ....	70
3.2.5. Aislamiento de secuencias con expresión diferencial: Hibridación sustractiva. ....	74
3.2.6. Hibridación tipo southern-blot.....	77
3.2.7. Hibridación <i>in situ</i> . ....	78
3.2.8. Clonación de secuencias aisladas. ....	79
3.2.9. Análisis de los plásmidos recombinantes. ....	80
3.2.10. Secuenciación. ....	81
3.2.11. Análisis de las secuencias repetidas.....	82
3.2.12. Análisis filogenético.....	82
3.2.13. Análisis de homologías en bases de datos. ....	83
3.2.14. PCR cuantitativa. (PCRq).....	83

## **4. RESULTADOS .....87**

4.1. Aislamiento y caracterización de ADN's repetidos en peces planos. ....	89
4.1.1. Familia de ADN satélite Sacl en el Fletan atlántico ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> ). ....	89
4.1.2. Familia de ADN satélite Pvull en el Lenguado senegalés ( <i>Solea senegalensis</i> ). ....	93
4.1.3. Familia de ADN repetido ACA72 en peces planos. ....	104
4.1.4. Análisis del ADN repetido ACA72 en otros grupos de peces. ....	113
4.2. Estudios de genómica funcional en esturiones. ....	122
4.2.1. Realización de hibridación sustractiva por supresión (SSH). ....	122
4.2.2. Caracterización y expresión de genes de interés. ....	133

## **5. DISCUSIÓN ..... 157**

5.1. Estudios de Genómica estructural: ADN repetido en peces planos. ....	159
5.1.1. ADN satélite centromérico. ....	159
5.1.2. Secuencia de ADN repetido ACA 72. ....	166
5.2. Estudios de genómica funcional: hibridación sustractiva en esturiones ..	173
5.2.1. Hibridación sustractiva en <i>A. naccarii</i> ..	174

## **6. CONCLUSIONES ..... 183**

## **7. ANEXOS ..... 189**

7.1. Anexo I .....	191
7.2. Anexo II .....	192
7.3. Anexo III .....	206
7.4. Anexo IV .....	207
7.5. Anexo V .....	208
7.6. Anexo VI .....	209
7.7. Anexo VII .....	212

## **8. BIBLIOGRAFÍA .....217**

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> Resumen de las muestras utilizadas para la caracterización y análisis del ADN repetido en los genomas de peces planos. También se han incluido otras especies de peces del Orden Pleuronectiformes, que se han analizado en relación con este objetivo.....	61
<b>TABLA 2:</b> Secuencia de los primers diseñados partir del alineamiento de las secuencias del satélite aislado Pvull de <i>Solea senegalensis</i> , para amplificar dicho satélite en otras especies de la misma familia. (FIGURA 12 de Resultados). .....	72
<b>TABLA 3:</b> Temperatura annealing de la Familia Soleidae para el amplificado del satélite Pvull con los primers diseñados. ....	73
<b>TABLA 4:</b> Secuencia de los primers diseñados partir del alineamiento de las secuencias del clon ACA72 y de la unidad de repetición del ADN satélite BG16 de <i>Lepomis</i> , para amplificar dicha secuencia repetida en otras especies de peces, del mismo y de diferentes Órdenes. ....	74
<b>TABLA 5:</b> Condiciones de temperatura annealing de los primers ACA-72 para cada especie en la que se amplificó esta secuencia del Orden Pleuronectiformes y del Orden Perciformes. ....	74
<b>TABLA 6:</b> Secuencia de los primers para la amplificación de los genes seleccionados en la hibridación sustractiva para obtener una secuencia más grande. ....	77
<b>TABLA 7:</b> En la tabla se muestran los primers diseñados para la cuantificación diferencial entre machos y hembras, junto con las condiciones de temperatura de unión de cada uno y el tamaño esperado de amplificado. ....	85
<b>TABLA 8:</b> Valores de identidad entre los clones correspondiente a diferentes unidades monoméricas de la familia de ADN satélite centromérico Sacl del fletan atlántico ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> ). ....	91
<b>TABLA 9:</b> Valores de identidad entre los monómeros obtenidos de la familia del ADN satélite centromérico Pvull en el lenguado senegalés, con una homología media del 92,6%. ....	96
<b>TABLA 10:</b> Tabla que presenta las homologías entre las distintas secuencias de los monómeros analizados para Pvull en <i>S. lascaris</i> , siendo la homología media de 90,1%. ....	100
<b>TABLA 11:</b> Tabla de homologías del satélite Pvull, en la especie <i>S. solea</i> , en la que se muestran las distintas homologías entre los clones secuenciados. Entre todos, presentan una homología media del 85,7%. ....	101
<b>TABLA 12:</b> Tabla que muestra la homología interespecífica utilizando la secuencia consenso de las distintas especies que conforman el género <i>Solea</i> .....	103
<b>TABLA 13:</b> Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 del lenguado senegalés. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 91,1%. ....	106



<b>TABLA 14:</b> En la tabla se muestran las distintas especies de peces planos en las que se ha amplificado la secuencia repetida ACA 72, junto con el tamaño de cada secuencia y su homología media correspondiente.....	110
<b>TABLA 15:</b> Especies del Orden Perciformes analizadas con la secuencia repetida ACA-72, el tamaño que presentan para dicha secuencia y el grado de homología entre sus secuencias.....	114
<b>TABLA 16:</b> Tabla en la que se muestran las divergencias interespecíficas, con las trece especies analizadas de peces planos y las tres de Perciformes, utilizando el valor de divergencia intraespecífica de * <i>L. macrochirus</i> calculada a partir de los AN suministrados por la base de datos BlastN: AB095091/ AF214109/ AB095090/ AB095088/ AB095089/ AB095087.....	119
<b>TABLA 17:</b> Concentración del ARN extraído y medido con la estación de electroforesis virtual Experion con el parámetro de calidad 28S/18S.....	122
<b>TABLA 18:</b> Datos sobre la calidad y concentración del ADNc retrotranscrito, obtenidos a partir del Biofotómetro.....	123
<b>TABLA 19:</b> Resumen de todas las secuencias con significado encontradas en la genoteca de hembra al ser enviadas a la base de datos BlastX. Se indica el número de genes totales y de secuencias para esa homología.....	125
<b>TABLA 20:</b> En la tabla se especifica el Término GO, para cada homología encontrada en la base de datos BlastX, el número de secuencias que dieron esa homología, el número de genes y el porcentaje con respecto al total de secuencias con significado.....	127
<b>TABLA 21:</b> Resumen de todas las secuencias con significado encontradas en la genoteca de hembra al ser enviadas a la base de datos BlastX. Se indica el número de genes totales y de secuencias para esa homología.....	129
<b>TABLA 22:</b> Gráfica y tabla que recogen la información sobre los términos GO en la genoteca de hembras, con respecto al proceso biológico. En la gráfica se ilustra el número de genes para ese término, junto al número de secuencias que le corresponden. En la tabla se especifica el Término GO para cada homología encontrada en la base de datos BlastX, el número de secuencias que dieron esa homología, junto con el número de genes y el porcentaje con respecto al total de secuencias. ....	131
<b>TABLA 23:</b> Tabla en la que se comparan las distintas homologías encontradas para machos y para hembras, utilizando los Términos GO relacionados con procesos biológicos para realizar esta comparativa.....	133
<b>TABLA 24:</b> Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en la que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación estándar para el gen ZP3.2, junto los valores para la $\beta$ -actina .....	143
<b>TABLA 25:</b> Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en la que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación estándar para el gen ZP3.3, junto los valores para la $\beta$ -actina. ....	143
<b>TABLA 26:</b> El asterisco (*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.....	146

<b>TABLA 27:</b> El asterisco (*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.....	146
<b>TABLA 28:</b> Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen de la ferritina, junto los valores para la $\beta$ -actina .....	150
<b>TABLA 29:</b> El asterisco (*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que la expresión del gen de la ferritina son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado. ....	152
<b>TABLA 30:</b> Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen S100 calcium-binding, junto los valores para la $\beta$ -actina.....	154
<b>TABLA 31:</b> El asterisco (*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión del gen calcium binding entre machos y hembras son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado. ....	156

## INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** **A.** Imagen de las gónadas de una de las hembras de *A. naccarii*, de las que se tomaron muestras para realizar este estudio. **B.** Detalle de la gónada en la que se observan los grumos, que se convertirán en caviar..... 63
- FIGURA 2:** **A.** Imagen de las gónadas de un macho de *A. naccarii*, de las que se tomaron muestras para realizar este estudio. **B.** Imagen ampliada de la gónada en la que se observa que es lisa, pero que se encuentra estriada en la zona inferior..... 63
- FIGURA 3:** Chip de carga de Experion™ Automated Electrophoresis Station” de Bio-Rad ..... 67
- FIGURA 4:** Electroforesis virtual obtenida con la estación de electroforesis automatizada Experion de Bio-Rad, de ARN extraído de gónadas de 3 hembras y de 3 machos de esturión. Las bandas más intensas y de menor tamaño corresponden al ARNr 18S y la banda más intensa y de mayor tamaño corresponde a ARNr 28S ..... 68
- FIGURA 5:** Electroferograma. Gráfica que proporciona el programa tras realizar la electroforesis virtual. En ella se observa fundamentalmente, la relación que existe entre los fragmentos 28S y 18S en un lapso de tiempo determinado y dependiendo de la fluorescencia que han emitido. .... 69
- FIGURA 6:** Esquema de la hibridación sustractiva por supresión, modificada del protocolo de “Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit”..... 75
- FIGURA 7:** Electroforesis correspondiente a la digestión del ADN genómico del fletan con una batería de enzimas de restricción. En la figura se señalan mediante flechas blancas, las bandas correspondientes a las enzimas SmaI, RsaI y PvuII visibles de un tamaño alrededor de los 350 pares de bases. .... 89
- FIGURA 8:** Secuencias de varias unidades monoméricas correspondientes a la familia de ADN SmaI del genoma del fletan. Como en el resto de tablas SECCONS: secuencia consenso y (-) corresponde con ausencia de nucleótido. Sobre el alineamiento se ha señalado mediante cajas las dianas que presentan para RsaI (en verde) y para PvuII (en azul). .... 90
- FIGURA 9:** Secuencia consenso de la unidad monomérica del ADN satélite SmaI en la que se señalan los motivos repetidos de forma directa (flechas) y los tramos ricos en A y T consecutivas (sombreado). En las cajas se resaltan los motivos centroméricos encontrados. Este tipo de motivo también se ha encontrado en una familia de ADN satélite de otra especie de pez plano como la acedía (De la Herrán et al., 2008). .... 91
- FIGURA 10:** Hibridación in situ sobre cromosomas metafásicos de *H. hippoglossus* usando como sonda la unidad monomérica del clon SmaI-32. La señal de hibridación aparece en el centrómero de la mayoría de los cromosomas, indicándose con flechas los cromosomas que carecen de ella. 92
- FIGURA 11:** Esquema de regiones de homologías entre la unidad de repetición del ADN satélite y las secuencias de ESTs del fletan, con números de acceso EB034238 y EB034087. .... 93

- FIGURA 12:** Electroforesis del producto obtenido mediante la técnica de Self-priming (auto-amplificación y posterior digestión) a partir del ADN genómico de *S. senegalensis*. Se observa una banda más intensa de un tamaño aproximado de 200 pares de bases correspondiente a la enzima PvuII (Flecha blanca). ... 94
- FIGURA 13:** Hibridación tipo Southern-blot utilizando como sonda los fragmentos de la banda de 200 pares de bases (unidad monomérica de la familia PvuII de ADN satélite de *S. senegalensis*) sobre ADN genómico del propio lenguado digerido con una batería de enzimas de restricción. En la calle correspondiente al enzima PvuII, se observa el típico patrón en escalera de un ADN satélite, señalado mediante flechas. .... 95
- FIGURA 14:** Secuencia de seis unidades monoméricas y la secuencia consenso correspondiente a la familia PvuII en el genoma del lenguado senegalés. Sobre la que se han señalado las dianas que presentan para AluI (en azul) y para HinfI (en verde)..... 96
- FIGURA 15:** Secuencia consenso de la unidad monomérica del ADN satélite PvuII del lenguado senegalés en la que se señalan los motivos repetidos de forma directa (flechas) y los tramos ricos en A y T consecutivas (sombreado). En las cajas se resaltan los motivos centroméricos encontrados..... 97
- FIGURA 16:** Hibridación in situ sobre cromosomas de *S. senegalensis* teñidos con DAPI y la sonda (banda cortada y purificada) marcada con biotina. Las flechas señalan cromosomas en los cuales no aparecen señales de hibridación. .... 97
- FIGURA 17:** Hibridación tipo Southern-blot de la banda cortada, purificada y marcada (unidad monomérica de la familia PvuII de ADN satélite de lenguado senegalés) sobre ADN genómico digerido con PvuII (II) y RsaI (I) de diferentes especies de peces planos (*S. senegalensis*, *D. cuneata*, *S. lusitanica*, *S. solea*, *S. lascaris*, *A. laterna*, *A. thori*, *M. azevíá*, *C. linguatula*, *S. maximus*) se observan señales de hibridación en las calles correspondientes a las especies *S. solea*, *S. lascaris* y el propio *S. senegalensis* usado como control positivo .. 98
- FIGURA 18:** En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del monómero del satélite PvuII de *S. senegalensis* sobre la que se han diseñado los primers de PvuII. Y debajo, la pareja de primers diseñados para la amplificación de esta secuencia en otras peces. .... 99
- FIGURA 19:** : Alineamiento de la secuencia del satélite PvuII en varios clones junto la secuencia consenso, obtenidos como resultado de la amplificación del satélite utilizando los primers en la especie *S. lascaris*, escisión purificación, clonación y secuenciación de dicho amplificado. .... 100
- FIGURA 20:** Alineamiento de las secuencias del satélite PvuII junto la secuencia consenso, de la especie *S. solea*, que presenta un tamaño de 176pb. .... 101
- FIGURA 21:** Árbol filogenético realizado en el género *Solea*, utilizando el satélite PvuII como marcador, que permitió realizar un análisis filogenético mediante los métodos del vecino más próximo (Neighbor-Joining) y el UPGMA. En el árbol se observa como las diferentes muestras se separan y se agrupan según la especie a la que pertenecen..... 102

- FIGURA 22:** Alineamiento de las secuencias consenso de las distintas especies del género *Solea*, entre todas presentan una homología media interespecífica del 81,5%. ..... 103
- FIGURA 24:** Electroforesis de la amplificación realizada en el genoma de *S. senegalensis* (tras analizar la homología entre ACA72 del lenguado senegalés y el satélite BamHI de *Lepomis*) con los primers diseñados con genoma de dicha especie. Se puede observar el patrón en escalera típico de un ADN satélite, señalado mediante flechas con un tamaño alrededor de 200pb, 450pb y 600pb. .... 105
- FIGURA 23:** Fragmento de la zona que se encuentra más conservada en el alineamiento entre la unidad de repetición del ADN satélite BamHI de *Lepomis* y la región homóloga en el clon 72 de lenguado, en dicho alineamiento se señala la zona donde se diseñaron los primers. Debajo, se muestra la secuencia de los primers utilizados para amplificar ACA72 en el lenguado y en las otras especies analizadas en esta Memoria ..... 105
- FIGURA 25:** Secuencias de varias unidades correspondientes a la familia ACA72 aislada del genoma del lenguado senegalés junto con la secuencia consenso generada a partir de sus alineamientos. .... 106
- FIGURA 26:** Hibridación in situ en cromosomas de *S. senegalensis* en individuos diferentes. En la figura A están teñidos con Ioduro de propidio y la sonda marcada con digoxigenina. En la figura B están teñidos con DAPI y la sonda marcada con biotina. .... 107
- FIGURA 27:** Hibridación tipo Southern-blot de la unidad monomérica de la familia ACA72 de ADN satélite de lenguado senegalés sobre ADN genómico de diferentes especies de peces planos (*S. senegalensis*, *B. profundicola*, *M. azevia*, *S. solea*, *A. imperialis*, *L. boschii* y *D. cuneata*). Previamente digerido con dos enzimas, EcoRI(I) y BamHI(HI). .... 108
- FIGURA 28:** Amplificados obtenidos en las trece especies de peces planos que se han analizado en esta Memoria, utilizando los primers diseñados en la secuencia ACA72 de lenguado. .... 109
- FIGURA 29:** **A.** Secuencia consenso de *S. senegalensis*, en la que se muestra el esquema general de la secuencia repetida ACA-72 del grupo de peces planos. En este esquema se observan las distintas cajas en la que la hemos dividido la secuencia repetida ACA-72: caja A, caja B y caja C, y la combinación de estas para conformar la unidad de dicha secuencia. Las flechas negras indican el fragmento de secuencia palindrómica. **B.** Alineamiento del palíndromo (Geneious.4.8.4) que forma el inicio y el final de la secuencia ACA-72, que muestra una homología del 74,6%. **C.** Alineamiento que explica la estructura palindrómica de la caja C, formada por la unión de las cajas A y B, Este alineamiento presenta una homología del 57,5%. .... 112
- FIGURA 30:** Electroforesis en la que se muestra los amplificadores obtenidos en dos especies de perciformes: *S. aurata* y *T. trachurus*, utilizando los primers diseñados en la secuencia repetida ACA72 de lenguado. .... 113
- FIGURA 31:** Comparación de las unidades de repetición de ACA72 entre peces planos (secuencia consenso), y dos especies de perciformes como el jurel y la dorada. Las cajas nominadas como A, B y C, marcan regiones conservadas

dentro de ACA72 entre estas especies. Y en algunos casos, estas regiones pueden estar duplicadas en la unidad de repetición. ....	115
<b>FIGURA 32:</b> Homología de ACA72 con las secuencias depositadas en las bases de datos. Junto con la organización de las unidades de repetición en <i>Lepomis</i> y Lubina. ....	116
<b>FIGURA 33:</b> Distribución de las distintas unidades de repetición en las diferentes especies modelo encontradas en bases de datos. ....	117
<b>FIGURA 34:</b> En la zona superior de la figura se puede observar el árbol filogenético realizado que relaciona al grupo de los peces planos con el de los perciformes. ....	120
<b>FIGURA 35:</b> En la parte superior de la figura, se muestra el árbol filogenético de diferentes grupos de peces basado en las distancias genéticas de la secuencia repetida ACA-72. En la parte inferior de la figura se muestra el esquema de la unidad de repetición utilizado para realizar el árbol filogenético. ....	121
<b>FIGURA 36:</b> Grafica en la que se observa el tipo de genes encontrados en la hibridación sustractiva para la genoteca de machos, relacionados con el número de secuencias en las que se han encontrado. ....	124
<b>FIGURA 37:</b> Porcentajes de las anotaciones encontradas para las diferentes homologías procedentes de la hibridación sustractiva usando como tester al macho. En la gráfica se pone de manifiesto como las proteínas ribosomales con un porcentaje del 77,36%, predominan sobre los otros genes encontrados seguidas por las inmunoglobulinas y la proteína interferón con un 5,03% respectivamente, y encontramos proteínas del tipo citocromo con un porcentaje del 6,94%, ubiquitina con un 3,75% y con el menor porcentaje la proteína de unión al zinc con un 1,89%. ....	126
<b>FIGURA 38:</b> En la gráfica se ilustra el número de genes para cada término GO encontrado junto al número de secuencias. ....	126
<b>FIGURA 39:</b> Relación entre número y clases de genes encontrados en la hibridación sustractiva para la genoteca de hembras con el número de secuencias. ....	128
<b>FIGURA 40:</b> Resumen de las anotaciones encontradas para los diferentes clones procedentes de la hibridación sustractiva usando como tester a la hembra, en la que se observa la predominancia de proteínas relacionadas con la envoltura del huevo, seguidas por un grupo de proteínas muy variado en el que se pueden encontrar proteínas estructurales y funcionales. ....	129
<b>FIGURA 41:</b> Gráfica que representa la clasificación de los distintos genes encontrados en la genoteca de hembras, teniendo en cuenta los términos GO ....	130
<b>FIGURA 42:</b> Gráfica en la que se compara las homologías encontradas en la genoteca de machos y en la genoteca de hembras, para ello, se ha tenido en cuenta la homología y el término GO. ....	132
<b>FIGURA 43:</b> Figura realizada por el programa informático Genious que representa el alineamiento de las 26 secuencias obtenidas de la hibridación	

sustractiva que tenían homología con ZP3.2 de *A. sinensis*, y forman un contig con un tamaño de 596pb..... 135

**FIGURA 44:** En la que se muestra el alineamiento realizado entre el contig de 596pb de ZP3.2 de *A. naccarii* y la secuencia de *A. sinensis*. Con una homología del 97,8%..... 135

**FIGURA 45:** Contig 1 , con un tamaño de 246 nucleótidos, formado por la agrupación de 7 secuencias que dieron homología con la proteína ZP3.3, utilizando el programa Geneious..... 136

**FIGURA 46:** Ordenamiento de los distintos contigs y el singleton, utilizando como molde la secuencia de nucleótidos de la proteína ZP3.3 de *A. sinensis*. ..... 136

**FIGURA 47:** *Homo sapiens* (HsZP3, AAA61336); *Rattus norvegicus* (RnZP3, NP\_446214); *Gallus gallus* (GgZP3, NP\_989720); *Xenopus laevis* (XIZP3.1, NP\_001081657); *Xenopus tropicalis* (AAI58454); *Cyprinus carpio* (CcZP3, CAA88836); *Carassius gibelio* (CgZP3, AAD53947); *Danio rerio* (DrZP3, NP\_571406); *A. sinensis* (AsZP3.-1, ACO54852; AsZP3.2, ACO54853; AsZP3.3, ADH93592)..... 138

**FIGURA 48:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *A. naccarii*, sobre las que se han señalado: en cursiva la secuencia de los primers para obtener la secuencia completa; subrayados se muestran los 20aa correspondientes al péptido señal y la letra en color negro indica el primer aa del péptido maduro; en azul el residuo Asn (en posición 241) un putative N-linked glycosylation site, también se señalan las 8 cisteínas que ocupan las posiciones 8, 37, 56, 93, 166, 189, 229 y 247 respectivamente en color rojo y los aa conservados de un parche hidrofóbico interno (posiciones 116, 119 y 121) en color verde. En amarillo se muestra la secuencia de los primers que se han utilizado para la cuantificación..... 139

**FIGURA 49:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *A. naccarii*, sobre las que se han señalado: en cursiva las secuencias de los primers que se han usado para amplificar la secuencia completa. Los aa subrayados indican el péptido señal, el aa marcado en color negro indica el inicio de la secuencia del péptido maduro. Un putative N-linked glycosylation en el residuo Asn (posición 68) está marcado en azul y los seis sitios O-linked glycosylation están marcados en rojo. En verde se muestra la secuencia de los primers que se han utilizado para la cuantificación..... 141

**FIGURA 50: A.** Foto que corresponde al amplificado de ZP3.2 de ambos sexos, con un tamaño de 221pb en *A. naccarii* utilizando los primers que cita la bibliografía. **B.** Amplificado de Zp3.3 utilizando los primers de la bibliografía sobre el ADN de *A. naccarii* de hembra y de macho..... 142

**FIGURA 51:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen ZP3.2, entre machos y hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación standar para ambos genes. . 144

**FIGURA 52:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen ZP3.3, entre machos y

hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación standar para ambos genes. . 145

**FIGURA 53:** Alineamiento realizado con el programa Geneious, en el que se observa como las tres secuencias con homología para la ferritina, se solapan generando un único conting de 408pb. .... 147

**FIGURA 54:** Alineamiento realizado con el programa Geneious en el que se detalla el alineamiento obtenido entre nuestro conting con la secuencia de la ferritina de *A. sinensis*, ambas secuencias se alinean, con una homología del 97,3%. .... 147

**FIGURA 55:** Electroforesis en gel de agarosa resultado de la PCR convencional. La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular ladder, las calles 3, 4 corresponde a cDNA de hembra y la 5 y 6 a cDNA de macho. La calle 2 indica el control negativo de la PCR. La punta de flecha muestra el fragmento de aproximadamente 600pb correspondiente a la proteína ferritina en *A. naccarii*. .... 148

**FIGURA 56:** Secuencia de nucleótidos y aa de la proteína ferritina en *A. naccarii*. Los nucleótidos en cursiva indican las posiciones de los primers y los aminoácidos subrayados señalan las hélices A, B, C, D y E (11-39; 46-73; 93-121; 124-155; 161-171) respectivamente. .... 149

**FIGURA 57:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión del gen de la ferritina, entre machos y hembras, observando que en ambos sexos este gen tiene la misma expresión, al igual que el gen usado como referencia, el gen de la  $\beta$ -actina. En la gráfica también se observa la desviación standar para ambos genes. .... 151

**FIGURA 58:** Figura realizada por el programa informático Geneious que representa el alineamiento de las 3 secuencias obtenidas de la hibridación sustractiva que tenían homología con S100 calcium binding protein A1 de *A. sinensis*, y forman un conting con un tamaño de 271pb ..... 153

**FIGURA 59:** La figura muestra los dos bucles de unión al calcio se han señalado en el alineamiento de secuencias de diferentes especies de peces donde hemos incluido la de *A. naccarii*. .... 153

**FIGURA 60:** Electroforesis de la PCR realizada con los primers diseñados para Calcium Binding, en cDNA se observa que mientras que en hembras hay amplificación de un tamaño de 200pb, en machos no existe amplificado. .... 154

**FIGURA 61:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen Calcium binding, entre machos y hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación standar para ambos genes. .... 155





# ABREVIATURAS

<b>A:</b>	Adenina
<b>aa:</b>	Aminoácido
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc:</b>	Ácido desoxirribonucleico Complementario
<b>ADNr</b>	ADN ribosómico
<b>AFLPs:</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
<b>AN:</b>	Accession number
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>C:</b>	Citosina
<b>cm:</b>	Centímetros
<b>dNTP:</b>	Desoxi-nucleósidos-trifosfato
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EDTA:</b>	Ácido etilen diamino tetraacético
<b>EMBL:</b>	European Molecular Biology Laboratory
<b>ETS:</b>	Espaciador Transcrito Externo
<b>FISH:</b>	Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia
<b>G:</b>	Guanina
<b>g:</b>	Gramo
<b>GO:</b>	Gene Ontology
<b>HWE:</b>	Equilibrio Hardy-Weinberg
<b>IFAPA:</b>	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
<b>IPTG:</b>	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
<b>ITS:</b>	Espaciador transcrito interno
<b>K:</b>	Kilo
<b>Kb:</b>	Kilo bases
<b>M:</b>	Mol/L
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>min:</b>	Minuto
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>mM:</b>	Milimolar ( $10^{-3}$ molar)
<b>mM:</b>	Milimolar
<b>N<sub>2</sub>:</b>	Nitrógeno
<b>ng:</b>	Nanogramos
<b>nt:</b>	Nucleótidos
<b>°C:</b>	Grados centígrados
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>pb:</b>	Pares de bases

<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PCRq:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR:</b>	Transcripción inversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>s:</b>	Segundo
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SNPs:</b>	Polimorfismos de Nucleótidos Simples
<b>SSC:</b>	Citrato sódico salino
<b>T:</b>	Timina
<b>TBE:</b>	Disolución tampón formada por Tris, Borato y EDTA
<b>TBE:</b>	Tris-borato-EDTA
<b>Tris:</b>	Trihidroximetil-aminometano
<b>U:</b>	Uracilo
<b>X-gal:</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido
<b>ZP:</b>	Zona Pelúcida
<b>Π:</b>	Diversidad nucleotídica
<b>μg:</b>	Microgramo
<b>μl:</b>	Microlitro
<b>2n:</b>	Número cromosómico diploide
<b>4n:</b>	Número cromosómico tetraploide
<b>8n:</b>	Número cromosómico octoploide

## **1. INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### **ESTUDIOS GENÓMICOS EN ESPECIES CON INTERÉS EN ACUICULTURA.**

Los grandes avances que, en las dos últimas décadas, ha experimentado la Acuicultura se han visto propiciados en gran parte por el impacto que han tenido en el manejo y cultivo de especies acuícolas las investigaciones genéticas, genómicas y biotecnológicas.

La aparición y el desarrollo de la genómica se ha basado en avances tecnológicos importantes (secuenciadores, termocicladores, robotización...) que permiten el análisis complejo de las secuencias presentes en los genomas. Igualmente, ha sido decisivo el desarrollo de herramientas bioinformáticas que han permitido procesar y analizar cientos de miles de datos de forma rápida y ordenada, limitando la proporción de errores y automatizando numerosas tareas, antes realizadas manualmente. Estos avances han incrementado los conocimientos sobre aspectos tales como la estructura, organización, función y evolución de los genomas en gran número de especies vegetales y animales, incluido el hombre.

En relación con los peces, son cada vez más abundantes los estudios genómicos que profundizan en algunos de los aspectos antes señalados y que abren nuevas perspectivas e implicaciones en la mejora de los cultivos acuícolas, permitiendo además, ampliar el número de especies potenciales para tales cultivos en un futuro próximo.

Uno de los aspectos más importantes en el análisis genómico de las especies cultivadas es la obtención de secuencias que puedan servir como marcadores moleculares, así como la localización de estas en cromosomas concretos del cariotipo y su organización dentro del genoma, lo que permite, entre otros, análisis de sintenia y estudios evolutivos.

Por otro lado, también en los últimos años, se viene incrementando en especies acuícolas con interés comercial, estudios de genómica funcional, sobre todo enfocados en el análisis de la expresión de genes implicados en

procesos fisiológicos relacionados con el cultivo, tales como resistencia a infecciones, a situaciones de estrés o en la determinación sexual.

En este sentido, y como alternativa a los cultivos tradicionales de peces como la dorada o la lubina, el grupo de especies de peces planos, encabezados por especies como lenguado (*Solea senegalensis*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) o platija (*Platichthys flesus*), se están postulando como alternativa para la producción a gran escala. Este hecho está motivando importantes avances en el conocimiento de sus características genéticas. En concreto, y en España, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes proyectos multidisciplinares en los que se ha profundizado en este tipo de estudios en peces planos como por ejemplo Pleurogene, Aquageomics...

En programas más consolidados, debido a su actual importancia económica a nivel mundial, se han venido realizando análisis genómicos en especies de agua dulce como en el grupo de los salmónidos. Pero en los últimos años, se está produciendo un gran interés en el cultivo de especies de otro grupo de peces de agua dulce, como son los esturiones, debido, principalmente, a su aprovechamiento como productores de carne y caviar. Esto, justifica la necesidad de profundizar en análisis genéticos y genómicos en este grupo de peces.

Es en este contexto en el que se ha realizado el presente trabajo de investigación. Por un lado, se ha realizado un análisis genómico de secuencias de ADN repetido, aislado inicialmente en los genomas de peces planos y posteriormente ampliando su estudio a otras especies de peces. Estas secuencias se han caracterizado citogenética y molecularmente y comprobado tanto *in vitro* como *in silico* la conservación de este tipo de secuencias en los genomas de peces.

Por otro lado, hemos comparado mediante hibridación sustractiva y PCR cuantitativa los patrones de expresión genética en tejido gonadal de machos y hembras de la especie de esturión *Acipenser naccarii*, una de las principales especies cultivadas en Europa Occidental debido a su alto rendimiento económico, para tratar de elucidar qué genes presentan una expresión diferencial entre ambos sexos.

## **1.1. Estudios de Genómica Estructural: El ADN repetido.**

### **1.1.1. Características.**

El genoma de los eucariotas está compuesto por diversos tipos de componentes que van desde genes de copia única, hasta una gran cantidad de secuencias repetidas. En este último caso, el ADN repetido se suele clasificar, independientemente de su función, organización y localización, según el número de repeticiones que presente. Así, encontramos ADN moderadamente repetido cuyas repeticiones suelen ir desde dos copias a una docena de veces, como pueden ser los genes de diversas familias multigénicas tales como los de las histonas o las tubulinas. Una segunda fracción es la compuesta por ADN medianamente repetido con un número de copias que puede oscilar entre varios cientos hasta miles, como es el caso de los genes ribosómicos. Por último, nos encontramos con el componente repetido del genoma más abundante, como es el ADN altamente repetido, como el ADN satélite y elementos transponibles, cuyo número varía desde cientos de miles a millones de copias. Estas repeticiones, como el caso de los ADN satélite, pueden llegar a suponer desde el 1% hasta más del 50% del genoma nuclear de una especie o llegar hasta el 85% en el caso de los elementos móviles.

Al contrario que los elementos móviles, cuya localización generalmente es dispersa, el ADN satélite forma grandes clusters constituidos por secuencias cortas, llamadas monómeros, que se repiten en tándem (Singer., 1982) y localizadas en regiones concretas de los cromosomas. Aunque el tamaño de las unidades de repetición de diferentes familias de ADN satélite es muy variable, éstas suelen tener un tamaño medio entre 100 y 300 pares de bases. En cuanto a su composición, se han caracterizado ADNs satélites muy ricos tanto en AT como en GC. El margen se puede encontrar entre un 1% de GC en el cangrejo *Cancer gracillis*, hasta un 73% en un tripanosoma *Leishmania infantum* (Graur y Li., 1999).

### **1.1.2. Localización del ADN satélite.**

Dentro de los cromosomas eucariotas, los ADNs se acumulan en posiciones concretas formando parte de la heterocromatina constitutiva. Así, y mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), se ha demostrado



que podemos encontrarlos en las regiones centroméricas de todos los cromosomas, como es el caso de la familia de ADN satélite EcoRI presente en los Espáridos (Familia Sparidae) (Garrido-Ramos et al., 1994), o sólo en los centrómeros de algunos cromosomas, como el ADN satélite HindIII de los esturiones (Familia Acipenseridae) (Robles et al., 2004, 2005). Por otro lado, también suelen localizarse en regiones teloméricas y subteloméricas como es el caso del ADN satélite Dral de los Espáridos (Garrido-Ramos et al., 1998); (De la Herrán et al., 2001) o incluso, encontrarse a nivel intersticial de los cromosomas, en una sola pareja como por ejemplo, en la planta de la Familia de las liliáceas, *Muscari comosum*. En esta especie, el ADN satélite Sacl supone un 2,5% de su genoma y se localiza exclusivamente en la heterocromatina intercalar del primer par cromosómico (De la Herrán et al., 2001)

### **1.1.3. Función del ADN satélite.**

La presencia del ADN satélite en todos los organismos eucariotas y la tendencia a concentrarse en determinadas zonas cromosómicas, contrasta con el hecho de que no se conoce una función definida. Así, y debido a que, como veremos más adelante, los ADNs presentan una gran variabilidad y en principio no codifican para ningún producto, se les supone una función relacionada con procesos de organización y comportamiento cromosómico a lo largo del ciclo celular (Choo., 1997; Csink y Henikoff., 1998). Así, los ADN satélite centroméricos pueden interactuar con proteínas específicas de unión al ADN durante la mitosis controlando, en cierta forma, los movimientos de los cromosomas durante este proceso (Plohl et al., 2008). Los ADNs satélites subteloméricos, estarían implicados por ejemplo, en facilitar el apareamiento de los cromosomas durante la meiosis (Loidl., 1990), y en la protección de los extremos cromosómicos (Kipling., 1995). En este sentido, los telómeros de la mayoría de eucariotas están formados por una repetición telomérica o repetición terminal, que constituye el extremo de la cadena de ADN del cromosoma, mediante la repetición en tándem de un oligonucleótido corto. Generalmente esta secuencia telomérica es más rica en G en una de las hebras la que forma el extremo 3', que sobresale unos 12-16 nucleótidos sobre la hebra que aporta el extremo 5'. Ese extremo saliente es reconocido por

proteínas específicas del telómero (TBP, telomere binding proteins), que actúan a modo de caperuza protectora de dicho ADN terminal. Tras estas repeticiones teloméricas, en muchos casos, se han encontrado familias de ADN satélite formado una región denominada TAS (secuencias asociadas al telómero). Entre ambas regiones, podemos encontrar una zona de transición en donde las unidades monoméricas del ADN satélite se intercalan con las repeticiones del hexanucleótido TTAGGG característico del telómero. Este es el caso de la familia de ADN satélite subtelo mérico Dral descrito en los espáridos (De la Herrán et al., 2001).

Sin embargo, en los últimos años, se han encontrado familias de ADN satélite que pueden ser transcritas a pequeños ARNs (Pezer y Ugarkovi ., 2008; Carone D.M. et al., 2009). Esta característica abre las puertas a otros tipos de funciones a nivel de regulación, por lo que quizás es interesante buscarlo en genotecas de ESTs, ya que un porcentaje de estos ARNs suele estar poliadenilado (Pezer y Ugarkovi ., 2008).

#### **1.1.4. Evolución del ADN satélite.**

Como ya se ha comentado, una de las principales características del ADN satélite es que presenta una gran variabilidad. Esta variabilidad es debida en primer lugar, a las diferencias en longitud de las unidades de repetición que forman parte de las distintas familias de ADN satélite (monómeros), así como a la variabilidad en el número de copias de éstos. Pero, además, existen diferencias a nivel de secuencias entre las unidades de repetición. Y es que, los monómeros que forman un ADN satélite, aunque son muy parecidos entre sí, no llegan a ser idénticos en secuencia.

Esta característica se pone de manifiesto cuando se digiere una familia de ADN satélite con enzimas de restricción que tienen dianas dentro de la unidad monomérica y, posteriormente, se someten dichas digestiones a una electroforesis en gel de agarosa. El patrón que se origina, en forma de escalera, refleja que no todas las unidades tienen diana para la enzima, generándose una acumulación de repeticiones monoméricas, diméricas, triméricas, etc.

Según Singer (1982) el porcentaje de variación entre secuencias de una familia de ADN satélite de una especie es como mucho del 15%. Pero se han descrito porcentajes de variabilidad mayores, como es el caso de la familia de ADN satélite del centromérico humano, donde son superiores al 30%. En algunos casos, el grado de variabilidad intraespecífica es tan alto entre las secuencias monoméricas de una familia de ADN satélite que dentro de esa familia se pueden definir distintas subfamilias. Un ejemplo claro se observa dentro de la familia  $\alpha$  de ADN humano (Alexandrov et al., 1988). En otros casos, lo que ocurre es que dentro de una familia de ADN satélite se pueden definir distintas subfamilias cuando cada una de ellas se encuentra caracterizada por monómeros que presentan zonas que son diferentes de unos con respecto a otros, a pesar de ser muy parecidos en secuencia. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, en los Espáridos con el ADN satélite EcoRI (Garrido-Ramos et al., 1994)

Estas variaciones observadas hacen que el ADN satélite presente un ritmo de cambio mucho mayor que cualquier otro ADN del genoma (Singer., 1982). Esto provoca incluso que puedan aparecer y desaparecer familias de ADN satélite en tiempos evolutivos relativamente cortos (Miklos., 1985). Así, una familia de ADN satélite puede ser exclusiva de una sola especie, como ocurre con los ADNs satélites CgoA y CgoB del primate *Callimico goeldii* (Fanning et al., 1989) o estar restringida a unas pocas especies relacionadas entre sí, como por ejemplo en el caso de los Espáridos que se pueden separar en dos linajes distintos en función de la presencia o ausencia de la familia de ADN satélite Dral (Garrido-Ramos et al., 1998; 1999; De la Herrán et al., 2001). Sin embargo, la conservación de un ADN satélite puede ser mayor y estar presente en conjuntos amplios de especies relacionadas como ocurre con otro ADN satélite presente en la Familia Sparidae, con el satélite EcoRI que se encuentra en todas las especies de esta Familia de peces (Garrido-Ramos et al., 1998, De la Herrán., 2001). Esta conservación puede ser incluso mayor, llegando a estar presente en todo un suborden e incluso en todo un Orden, como es el caso del satélite PstI de los esturiones, presente en todo el Orden Acipenseriforme (Robles et al., 2003). Cuando una familia de ADN satélite está restringida a un grupo reducido de especies, puede indicar que esa familia de

ADN repetido puede tener un origen relativamente reciente (Singer., 1982). Pero si lo que ocurre es que la familia de ADN satélite se encuentra en un grupo taxonómico muy amplio, lo que indicaría sería un origen más antiguo de esta familia, presentando un mayor grado de conservación y estando presente, por lo tanto, en todas o en la mayoría de las especies del grupo.

Las variaciones que presentan los ADNs satélites y su alto grado de cambio son explicadas por su peculiar forma de evolución. Y es que, las secuencias repetidas, por lo general, siguen un patrón evolutivo conocido como evolución concertada (Dover., 1986).

Este modo de evolución concertada significa que las unidades de repetición no evolucionan de forma independiente, sino que se van produciendo intercambios de información de tal forma que se va manteniendo un alto grado de homogeneidad intrafamiliar. A través de las interacciones génicas entre los miembros de una familia de secuencias repetidas, una familia multigénica, evoluciona como una unidad, es decir, de forma concertada. El resultado de la evolución concertada es un conjunto de secuencias homogeneizadas. Pero la evolución concertada, además de depender de la transferencia horizontal de las mutaciones entre los miembros de la familia (homogenización) requiere de la expansión de ese cambio a todos los individuos de la población, a este proceso se le denomina fijación.

Por otro lado, la alta tasa de cambio de un ADN repetido como es el ADN satélite, es debida a que, al tratarse de secuencias no codificadoras, las mutaciones que se producen no están sujetas a la acción de la selección natural. A su vez, la tasa a la que se produce la homogeneización intraespecífica es mayor que la tasa a la que aparecen las mutaciones y, a la vez, menor que la tasa de fijación.

La evolución concertada, por tanto, conlleva no solo la homogeneización intraespecífica sino también la divergencia interespecífica a una velocidad mayor que otras partes del genoma.

La tasa de homogeneización y de fijación de las secuencias repetidas depende de sus características. Así, se han propuestos diferentes causas que influyen es estos procesos de homogenización y fijación como son el número y

disposición de las repeticiones, la estructura de la unidad repetida, el requerimiento funcional y la propia estructura genética de las poblaciones (Graur y Li., 1999).

Con respecto a los mecanismos moleculares de cambio que intervienen en el proceso de homogeneización, se han propuesto varios como son la transposición, el deslizamiento de la hebra durante la replicación, la transferencia a través de intermediarios de ARN o a través de elementos circulares extracromosómicos (Dover., 1986). Pero, de todos los mecanismos, los que se han considerado principales responsables de llevar a cabo la homogenización de las variantes en el proceso de evolución concertada son el entrecruzamiento desigual y la conversión génica (Smith., 1976).

Por lo tanto, el proceso básico de aparición de cualquier familia de secuencias repetidas es la amplificación por duplicación de esa secuencia. Una vez duplicada, mecanismos como el entrecruzamiento desigual, facilitan una amplificación aun mayor. El entrecruzamiento desigual es un mecanismo basado en el intercambio desigual entre dos unidades cromosómicas (entre las dos cromátidas hermanas del cromosoma durante la mitosis en células germinales, o entre dos cromosomas homólogos en la meiosis). Es un proceso de recombinación no recíproca que crea una duplicación de la repetición en una secuencia y la delección correspondiente a esa repetición en la otra, alterándose, por tanto, el número de copias. La acción del entrecruzamiento desigual puede producir tanto la amplificación como la reducción del número de copias de una familia de secuencias, así como la homogeneización de las mismas. En las grandes familias de secuencias repetidas, el entrecruzamiento desigual es el proceso más rápido en llevar a cabo la evolución concertada, ya que el número de repeticiones que se pueden cambiar entre las secuencias puede ser muy grande.

Otra característica de los ADNs satélite es la presencia en su secuencia de repeticiones inversas y regiones palindrómicas. Las repeticiones inversas parece que están relacionadas con distintos procesos de amplificación del ADN (Ohshima et al., 1992) y las regiones palindrómicas parecen estar relacionadas con procesos de recombinación (Higgins et al., 1988).

### **1.1.5. Uso del ADN satélite por la realización de filogenias.**

Debido a la rápida tasa de evolución, el ADN satélite constituye una excelente herramienta para poder establecer las relaciones filogénicas entre especies emparentadas (Arnason., 1990; Bachmann et al., 1993). Así, un ADN satélite conservado en diferentes especies con un origen monofilético constituye un preciso marcador filogenético pudiendo ser utilizado en taxonomía y sistemática. Como se ha comentado, un ADN satélite, debido a su forma de evolución, puede ser exclusivo de una especie o de un grupo de especies, por lo que en un simple estudio de presencia/ausencia se puede establecer relaciones entre estas. Por otro lado, el análisis de las secuencias de las unidades de repetición de un ADN satélite compartido por un grupo de especies, mediante la comparación de la variación intra- e interespecífica, revela la divergencia estimada entre estas especies. En estudios filogenéticos utilizando ADN satélite es necesario el uso de secuencias consenso obtenidas a partir de la comparación de diferentes monómeros. Además, hay que determinar que el grado de evolución concertada de las repeticiones dentro de la misma especie es mayor que entre las especies relacionadas (Hillis y Davis., 1988). Es decir, que la variabilidad intraespecífica de las secuencias debe ser menor que la variación interespecífica, y que a mayor diversidad entre las secuencias consensos de dos especies, más alejadas filogenéticamente se encuentran. Las filogenias realizadas con ADN satélite han sido a menudo coincidentes con otras filogenias realizadas con otro tipo de secuencias. Este es el caso de la Familia Sparidae, cuya clasificación, basada fundamentalmente en la dentición, agrupa a las especies de este grupo de peces en cuatro subfamilias (Boopsinae, Denticinae, Pagellinae y Sparinae). Mediante el análisis de los ADNs satélites EcoRI y DraI presentes en sus genomas, trabajos de Garrido-Ramos et al., 1995 y De la Herrán et al., 2001, contradicen esta clasificación morfológica. Así, estos autores, pusieron de manifiesto la existencia de dos clados en los cuales se agrupaban especies que, en la clasificación morfológica, estaban separadas o viceversa.

Con posterioridad, y mediante el análisis de otro marcador molecular como es el ADN mitocondrial 16S, Orrell y Carpenter en 2004 confirmaron las

relaciones filogenéticas y la existencia de dos linajes en los Espáridos, previamente propuestos mediante el uso del ADN satélite.

### **1.1.6. Los peces planos.**

Uno de los grupos de peces más interesantes desde el punto de vista básico y aplicado es el formado por los peces planos, que se engloban dentro del Orden Pleuronectiformes (del griego pleura –lado- y nektos –nadar-). Esta forma de nadar es debida a que se trata del único orden de vertebrados cuyos individuos presentan una simetría bilateral alterada (peces planos), viviendo tendidos sobre fondos arenosos que utilizan para pasar desapercibidos ante sus predadores. Las especies pertenecientes a este orden presentan una amplia distribución mundial, siendo la mayoría marinas, con unas pocas de agua dulce.

Son estas características, y su éxito evolutivo (por cuanto existen un gran número de especies) y anatomía con asimetría externa (cuyo origen y evolución es enigmático) las que hacen que este grupo de peces tenga una gran importancia desde el punto de vista evolutivo. De hecho, y en este mismo sentido, esta asimetría y la ausencia en el registro fósil de clases intermedias ha sido una de las cuestiones más debatidas en estudios evolutivos, enfrentado por ejemplo inicialmente a Mivart y Darwin en cuanto a la acción de la selección natural en el origen de esta morfología (Mivart., 1871) y posteriormente, con intentos de explicación mediante el saltacionismo por parte de Goldschmidt o más recientemente con el descubrimiento de dos fósiles con una incompleta migración orbital que pondrían de manifiesto una evolución gradual de esta característica (Friedman., 2008).

Por otro lado, hay que recordar que dentro de este grupo nos encontramos especies como rodaballo, platijas, gallos y lenguados, con gran importancia desde el punto de vista económico, tanto en el sector de la pesca como en la industria acuícola, siendo sus cultivos uno de los más productivos dentro de los peces (rodaballo en Europa, fletan en América y platija en Asia).

### **1.1.7. Taxonomía de peces planos.**

El grupo de los pleuronectiformes engloba a un grupo de peces muy especializado y con una antigüedad todavía por establecer. Este grupo está

formado por unas 600 especies y, aproximadamente, 115 géneros (Norman., 1934; Hubbs., 1945; Amaoka., 1969).

Su clasificación, más aceptada se detalla a continuación:

REINO: ANIMALIA

FIUM: CHORDATA

SUBFILUM: VERTEBRATA.

INTRAFILUM: GNATHOSTOMATA

CLASE: OSTEICHTHYES

SUBCLASE: ACTINOPTERYGII

ORDEN PLEURONECTIFORMES:

Suborden Pleuronectoidei:

- Familia Achirosettidae
- Familia Bothidae *Arnoglossus imperialis*, *Arnoglossus thori*.
- Familia Citharidae
- Familia Paralichthyidae
- Familia Pleuronectidae *Pleuronectes platesa*, *Hippoglossus hippoglossus*, *P. flesus*.
- Familia Scopthalmidae. *Scopthalmus rhombus*, *S. maximus*

Suborden Psettodoidei:

- Familia Psettodidae. *Psetta maxima*

Suborden Soleoidei:

- Familia Achiridae
- Familia Cynoglossidae
- Familia Soleidae. *Microchirus azevíá*, *Dicologlossa cuneata*, *Solea lascaris*, *S. senegalensis*, *Solea solea*, *Bathysolea profundícola*, *Synaptura lusitanica*.

Sin embargo, la posición de este grupo en relación con otros grupos, y las relaciones filogenéticas dentro del propio Orden, se encuentran en la actualidad en discusión. Esto, en parte, es debido a que es un grupo en el que,



hasta hace muy poco tiempo, no se habían realizado suficientes estudios genéticos tanto a nivel cromosómico como molecular. En general, todas sus especies presentan un reducido tamaño de genoma (Hinegardner., 1968), en comparación con otros grupos de peces e incluso con otros grupos de vertebrados, con valores C entre 1,04 pg y 0,73 pg (entre 1000 millones de pares de bases y 780 millones de pares de bases) dentro de la familia Soleidae (Hardie y Hebert., 2004). Así, sus genomas son solo un 20% respecto al genoma de mamíferos (Ohno y Atkin., 1966; Ohno., 1970). Con respecto a los rangos en el número cromosómico, se encuentran dentro de los valores modales de Teleósteos (Ohno., 1970; Sola et al., 1981). El cariotipo de algunas especies oscila en un rango de número diploide  $2n=28$  a  $2n=48$  (Azevedo et al., 2007). En cuanto a las especies de peces planos que hemos analizado en esta Memoria, *S. senegalensis* presenta un cariotipo de 21 pares cromosómicos y 48 brazos cromosómicos (Vega et al., 2002) al igual que el fletan (*H. hippoglossus*) y la solla (*Pleuronectes platessa*), mientras que acedía (*Dicologlossa cuneata*), lenguado común (*Solea solea*) y lenguadina (*Solea lascaris*) presentan  $2n=42$ .

Basándose en estos datos cariotípicos y en otros rasgos de tipo morfológico, se ha destacado una hipótesis evolutiva para este grupo de peces, aceptada por un amplio grupo de autores (Kikuno et al., 1986; Fan y Fox., 1991; Vitturi et al., 1993), y que propondría una tendencia a la disminución del número de cromosomas con igual o mayor número de brazos cromosómicos a partir de un cariotipo primitivo constituido por 48 cromosomas acrocéntricos. Los dos mecanismos responsables de este cambio cromosómico serían reordenaciones tales como fusiones céntricas e inversiones pericéntricas. Según ésta hipótesis, dentro del Orden Pleuronectiformes, la familia Pleuronectidae englobaría a las especies más primitivas, mientras que la familia Paralichthyidae representaría a las más recientes.

En cuanto al pariente vivo más próximo del grupo de los peces planos, todavía no se ha propuesto ningún candidato, pero según algunos datos moleculares, (Miya et al., 2003) han propuesto que debería buscarse entre la familia de los Carángidos (caballas y jureles). Aunque también se han postulado varios candidatos como la familia de los Serránidos (como meros,

cabrillas y maragotas) que debido a sus hábitos conductuales (estos peces tienden a echarse sobre un lado con la mitad del cuerpo cubierto por el fondo arenoso) el origen de la asimetría se derivaría de un comportamiento peculiar. Así se puede señalar que dicha asimetría podría depender tanto de factores genéticos como ambientales.

Si nos centramos en el grupo, las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de peces planos son muy debatidas. Concretamente, se han realizado filogenias utilizando diferentes marcadores como isoenzimas, ADN mitocondrial o ADN ribosómico (Infante et al., 2006, Pardo et al., 2005) siendo contradictorios los resultados, y a su vez, no coincidiendo con las clasificaciones morfológicas (Hensley y Ahlstrom., 1984, Chapleau., 1993)

En este sentido, y con el fin de contribuir a aclarar las relaciones entre estas especies así como con otras especies de peces, parte de los trabajos de esta tesis se centraron en la búsqueda de marcadores que pudieran ser utilizados en estudios filogenéticos y taxonómicos. Por lo ya comentado en el apartado E, nuestro principal objetivo fue la búsqueda de secuencias repetidas en los genomas de estas especies con el fin de utilizarlas como marcadores nucleares, que han demostrado un gran poder de resolución para establecer relaciones filogenéticas dentro de los peces (Garrido-Ramos et al., 1999; De la Herrán et al., 2000; Robles et al., 2004). En una revisión bibliográfica, determinamos que solo se ha caracterizado una familia de ADN satélite en una especie de pez plano tropical (*Achirus lineatus*) perteneciente a la familia Soleidae. Este ADN satélite (Al-HindIII) se encuentra en la región centromérica de todos los cromosomas del cariotipo (Fagundes et al., 2005). Adicionalmente, otro ADN satélite centromérico (Dral) se ha caracterizado en la acedía (*D. cuneata*), también perteneciente a la familia Soleidae, cuya secuencia consenso consta de 171 pares de bases de longitud (De la Herrán et al., 2008). Pero es interesante destacar que, aunque ambas familias se localizan a nivel centromérico, y ambas especies pertenecen a la misma familia (Soleidae), no se ha encontrado ninguna relación entre ambos ADNs satélites, siendo su secuencias monoméricas muy diferentes.

### **1.2. Estudios de genómica funcional.**

Uno de los principales estudios llevados a cabo dentro de este campo es el análisis de la expresión génica diferencial. En ellos se establecen patrones de expresión especio-temporal en relación con diferentes procesos biológicos tales como desarrollo ontogénico, situaciones de estrés (causadas por infecciones, adaptación a cambios ambientales, etc.) o desarrollo y maduración sexual. En este sentido, los genes de la determinación y diferenciación sexual en peces, son muy variados existiendo gran cantidad de mecanismos de determinación, pudiendo influir en ellos tanto factores genéticos como ambientales (Devlin y Nagahama.,, 2002).

#### **1.2.1. Determinación y diferenciación sexual en peces**

Los peces presentan los tres tipos de reproducción conocidos en vertebrados: gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad (Price., 1984). La determinación del sexo fenotípico en este grupo de vertebrados es muy versátil y se debe a un mecanismo dual que controla la expresión de los genes relacionados con el desarrollo gonadal. En primer lugar se produce un proceso de determinación sexual que define el sexo genético seguido de la diferenciación gonadal que define el sexo fisiológico (revisado en Piferrer y Guiguen., 2008).

La determinación sexual es un proceso por el que se establece el género masculino o femenino de un individuo (Bull., 1983). Si bien normalmente esta determinación es genotípica, e implica la presencia de cromosomas sexuales con uno o varios factores principales, o varios factores menores distribuidos en los autosomas, en algunas especies, como algunos peces, la determinación del sexo puede ser ambiental y responder a variables tales como la temperatura (Devlin y Nagahama., 2002).

Por otro lado, el proceso de diferenciación sexual puede venir propiciado por varios genes, principalmente responsables de que la gónada se acabe convirtiendo en ovario o testículo y puede/n estar localizado/s en un par cromosómico concreto, el par sexual, o distribuidos en distintos lugares de genoma.

Así, el sexo fisiológico se desarrolla después del sexo genético, durante la ontogénesis, a través de procesos bioquímicos bajo control genético, pero también puede estar influenciado por factores ambientales. Tales factores como la temperatura, hormonas o comportamientos sociales pueden, por tanto, modificar la ruta de desarrollo gonadal (Baroiller y D'Cotta., 2001; Piferrer y Guiguen., 2008).

### **1.2.2. Determinación sexual monogénica: los cromosomas sexuales**

Como ya se ha comentado, en la determinación monogénica, el sexo está determinado por un gen localizado en los cromosomas sexuales y/u otros genes con efecto menor localizados en otros cromosomas (Devlin y Nagahama., 2002).

En lo que concierne a los cromosomas sexuales, de forma general, los peces exhiben una evolución cromosómica primitiva (Wolf., 2005) no presentando la mayoría de las especies ningún dimorfismo cromosómico sexual. De hecho, sólo alrededor el 10% de las especies presentan cromosomas sexuales distintivos, puestos de manifiesto por técnicas citogenéticas y de hibridación in situ fluorescente (FISH) (Devlin y Nagahama., 2002), siendo por tanto la mayoría, especies sin cromosomas sexuales heteromórficos (Bouza et al., 1994, Carrasco et al., 1999).

Entre las excepciones, nos encontramos algunos ejemplos como *Aulopus japonicus* (Ota et al., 2003), especies del género *Liobagrus* (*L. marginatus* y *L. styani*) (Chen et al., 2008) y especies del género *Gasterosteidae* tales como *Gasterosteus wheatlandi* (Chen y Reisman., 1970) y *Apeltes quadracus*, (Peichel et al., 2004).

Entre estas especies con cromosomas sexuales se producen dos tipos de mecanismo: especies con machos heterogaméticos (XY) tales como medaka (*Oryzias latipes*, Yamamoto., 1969; Scharl., 2004), trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*, Thorgaard., 1977) y tilapia (*Oreochromis niloticus*, Baroiller et al., 1999) y especies con las hembras heterogaméticas (ZW), tales como *Oreochromis aureus* (Mair et al., 1991) y las pertenecientes a los géneros *Xiphophorus* y *Gambusia* (Volf y Scharl., 2001)

### 1.2.3. Genes para la determinación sexual

En diferentes estudios llevados a cabo en peces, se ha intentado caracterizar genes candidatos (o maestros) para la determinación sexual tal como el gen SRY previamente identificados en mamíferos (sex determining region of the Y chromosome) (Ezaz et al., 2006). Hasta hoy el único gen determinante del sexo aislado en peces es el gen *DMY/dmrt1bY* en *Oryzias latipes* (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002; Schartl., 2004), habiéndose demostrado que en esta especie desempeña un papel clave en la determinación del sexo (Matsuda et el., 2007). Su función parece estar relacionada con la inhibición de la proliferación celular de las células germinales (Herpin et al., 2007). En estudios posteriores se determinó que otras especies del mismo género no poseían este gen (Wolf et al., 2003) de lo que se puede deducir que los peces pueden presentar diferentes líneas evolutivas para la determinación sexual.

Por el contrario, en peces, sí se han encontrado muchos de los genes que en otras especies de vertebrados, intervienen en procesos de diferenciación gonadal, lo que sugiere la conservación de tales mecanismos.

Entre estos genes podemos señalar el gen *Wt1* que en mamíferos codifica un factor de transcripción que interviene en procesos de diferenciación del sistema urogenital y que se ha encontrado en medaka y pez cebra (Perner et al., 2007 y Kluver et al., 2009).

El gen *Sox 9*, que es un factor de transcripción que contiene la caja HMG de unión al ADN que es uno de los principales genes relacionados con la diferenciación sexual en vertebrados (Kent al., 1996; Morais da Silva et al., 1996) interviniendo en la diferenciación testicular (Wagner et al., 1994; Vidal et al., 2001) se ha identificado en varias especies tales como trucha arco-iris (Takamatsu et al., 1997; Vizziano et al., 2007), tilapias (Ijiri et al., 2008), pez cebra (Chiang et al., 2001; Von Hofsten y Olson., 2005), guppy (Shen et al., 2007) entre otras.

*Amh (MIS)* o gen de la hormona antimulleriana, una glicoproteína que en mamíferos interviene en la diferenciación testicular y que se ha caracterizado

en varias especies de peces, como puede ser el pejerrey (*Odontesthes hatcheri*, Hattori et al., 2012).

**Cyp**, gen que codifica para la enzima citocromo P450 aromatasa que es un enzima clave en la conversión de andrógenos en estrógenos, cuya proporción es importante para la diferenciación sexual, y que, en peces, se conoce la existencia de dos variantes génicas, *Cyp19a1* y *Cyp19a2* en especies como tilapia (*Oreochromis niloticus*, Kown et al., 2001) o la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*, Liu et al., 2001).

**Fox12** que pertenece a una familia de factores de transcripción denominada Forkhead (Füherer., 2002) con expresión específica en hembras de vertebrados con función de diferenciación en la diferenciación de ovarios. Su acción posiblemente es la de regulación de la transcripción del gen *Cyp19* (Loffler et al., 2003; Liu et al., 2001).

**Dax1** que codifica para un receptor nuclear de hormonas ligado al cromosoma X en mamíferos (Zanaria et al., 1994). En peces, *Dax1* se ha aislado y caracterizado en varias especies tales como tilapia, trucha arco-iris, medaka y *Dicentrarchus labrax* miembros de la familia Moronidae (Wang et al., 2002; Baron et al., 2005; Martins et al., 2007; Nakamoto et al., 2005) aunque no está claro el papel que en este grupo de animales desempeña durante la diferenciación sexual.

De lo expuesto anteriormente, se puede deducir que los estudios genéticos y genómicos que se vienen realizando en los últimos años, han permitido un mejor conocimiento de los genes determinantes del sexo en peces. Esto contribuye a que se comiencen a localizar y caracterizar las regiones en donde se localizan tales genes, así como otros ligadas al sexo sobre todo en especies modelo de peces cuyos genomas han sido ya secuenciados: *Xiphophorus maculatus* (Froschauer et al., 2002) *Gasterosteus aculeatus* (Peichel et al., 2004), *Takifugu rubripes* (Cui et al., 2006; Kikuchi et al., 2007) poner más *Danio rerio*..... Mediante estudios de sintenia, estas regiones también están siendo analizadas en especies con interés acuícola como *Oncorhynchus mykiss* (Felip et al., 2005) o *S. maximus* (PAULIANO)

### **1.2.4. Familia Acipenseridae (Esturiones)**

Los esturiones son peces óseos pertenecientes al Orden Acipenseriformes del que se conocen unas 25 especies.

Se consideran fósiles vivientes con 200 millones de años de antigüedad (Gardiner., 1984) que aparecieron en el Jurásico y aún continúan formando parte de la fauna actual.

Presentan un cuerpo alargado y estrecho (escualiforme) su piel carece de escamas y en su lugar hay cinco hileras longitudinales de placas romboides y puntiagudas (escudetes). La cabeza está cubierta de placas óseas anchas subcutáneas. El lóbulo superior de su cola es mucho más grande que el inferior (heterocerca). La boca es protráctil, de posición ventral y sin dientes. Se alimentan por succión de plantas y pequeños animales detectados por cuatro apéndices o barbillas situadas en la parte anterior del hocico, que van barriendo el fondo

Su distribución se restringe al hemisferio norte donde las diferentes especies de este grupo se encuentran repartidas en los grandes sistemas fluviales, lagos, aguas costeras y mares internos. Si bien los esturiones se distribuyen en 4 grandes áreas biogeográficas (Choudhury y Dick., 1998), tanto en el pasado, como en la actualidad, se han encontrado ejemplares de especies en localizaciones geográficas que no le correspondían (Ludwig et al., 2002, De La Herrán et al., 2004)

La mayoría de los esturiones son anfibióticos, tienen sus puestas en fondos de grava o de cantos rodados de los ríos. Tras un periodo larvario corto, los alevines de uno a tres años migran al mar, a zonas próximas a la costa, donde continúan su crecimiento y alcanzan la madurez. En este sentido, hay que señalar que los esturiones son gonocóricos, y alcanzan la madurez sexual tardíamente, entre los 5-16 años, según la especie, en los machos y entre los 6-20 años, según la especie, en las hembras (Hochleithner y Gessner., 2001). Los esturiones sexualmente maduros regresan a los ríos de origen para realizar las puestas.

Los esturiones son uno de los recursos naturales más valiosos del planeta. Estos peces proporcionan productos muy apreciados ya que de ellos

se puede aprovechar tanto su carne, piel, cartílago y, por supuesto, el caviar, es decir, las huevas no fecundadas de esturión, consideradas como un manjar exquisito. Para los países de su área de distribución, se trata de una importante fuente de ingresos y de empleo ya que, aunque tienen un crecimiento lento, producen altos rendimientos económicos con el comercio internacional de sus huevas. Su producción e industria se desarrollaron principalmente en la antigua Unión Soviética y en países de Oriente próximo. Sin embargo, en España, también existió una explotación del caviar desde tiempos muy antiguos, habiendo existido desde el siglo XV una importante industria de producción de caviar en Coria del Río, a partir de esturiones capturados en el río Guadalquivir.

En la actualidad las poblaciones existentes de estos peces se encuentran en continua regresión hasta el punto de ser consideradas especies en peligro de extinción. En este sentido, la mayoría de las especies están recogidas en la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y desde hace más de diez años, es preciso contar con permisos y certificados CITES (Convención sobre el comercio Internacional de Especies Amenazadas y Fauna y Flora Silvestre) para proceder al comercio internacional de todos los esturiones y las partes y derivados de los mismos (por ejemplo, caviar, carne, piel, etc.).

La desaparición de las poblaciones de esturión se debe principalmente a factores tales como la sobrepesca y capturas ilegales, las dificultades que constituyen las presas para las migraciones reproductivas y la contaminación de sus hábitats.

El cultivo del esturión en cautividad está tratando de paliar este retroceso. Se potencia la producción de semillas para la repoblación de stock naturales y la producción de peces para el mercado. Pero los costes de producción del esturión son muy elevados y esto se ve reflejado en la comercialización del producto. Y es que, además de los inconvenientes propios del cultivo en cautividad, hay que tener en cuenta que, como ya se ha comentado, los esturiones maduran a los 8-12 años de edad (de media).

Una forma eficiente de reducir costes sería separar prematuramente los machos y las hembras, de manera que se pueda comercializar la carne de los primeros manteniendo a las hembras exclusivamente para la producción de



caviar. Sin embargo, la ausencia de dimorfismo sexual externo en los esturiones (Holčík., 1986) hace imposible distinguir los machos de las hembras en los estadíos larvarios, juveniles e incluso adultos, lo que provoca la necesidad de mantener en cultivo a todos los ejemplares de ambos sexos. La identificación precoz del sexo es por tanto, de gran interés para el cultivo de estos peces, cuando lo que se pretende es producir caviar.

### **1.3. Estudios de determinación y diferenciación sexual en esturiones.**

El interés de los esturiones desde los dos puntos de vista comentados anteriormente (conservacionista y comercial) han llevado en los últimos años al desarrollo de técnicas para la mejora de su cultivo y a la realización de estudios de reproducción en estas especies. Así, se han venido realizando diferentes estudios que han intentado conocer el mecanismo de determinación y diferenciación sexual en esturiones. Estos estudios se han realizado mediante varias aproximaciones tales como análisis a) citogenéticos, b) manipulación cromosómica (ginogenéticos) para el estudio de proporción de sexos, c) estudios fisiológicos y, d) estudios moleculares (revisado en Keyvanshokooch y Gharaei., 2010).

#### **1.3.1. Estudios citogenéticos**

Así, en lo que se refiere a estudios citogenéticos, podemos señalar que los cariotipos de los esturiones se caracterizan por una gran cantidad de cromosomas de los que alrededor de la mitad son minicromosomas. Las especies se puede dividir en dos grupos, el primero de ellos compuesto por aquellas cuyo número cromosómico es alrededor de 120 cromosomas y con un tamaño de genoma (1C) de 1.6-2.5 pg, y el segundo, compuesto por las especies cuyo número cromosómico varía entre 240 y 250 y el tamaño del genoma entre 4.0 y 4.8 pg (Birstein., 1993 Blackligde y Bidwell., 1993). En ninguno de los análisis citogenéticos analizados en las distintas especies de esturiones se han identificado cromosomas sexuales (Fontana y Colombo., 1974; Holcik., 1986, Van Eenennaam., 1997).

#### **1.3.2. Técnicas de manipulación cromosómica.**

Como se ha comentado, los esturiones son gonocoristas y en ausencia de cromosomas sexuales diferenciados se han realizado otro tipo de

aproximaciones para intentar dilucidar su determinación cromosómica sexual. Así, en estos estudios de ginogénesis realizados en tres especies, *Acipenser transmontanus* (Van Eenennaam et al., 1997), *Huso huso* (Omoto et al., 2005) y *A. brevirostrum* (Flynn et al., 2007) se encuentran una gran desviación en la proporción de descendencia femenina (desde un 65% un 82% según la especie). Estos datos aportan una evidencia en el sentido de que la hembra no es el sexo homogamético, al no alcanzar la progenie el 100% de hembras. También señalarían que pueden existir otros factores implicados en la determinación sexual, al ser la descendencia femenina claramente superior al 50% en todos los casos. Dado que en los esturiones se han producido duplicaciones genómicas en su historia evolutiva (Ludwig et al., 2001) es posible que el sexo esté controlado por varios cromosomas con varios loci implicados (Flynn et al., 2007).

### **1.3.3. Técnicas físicas y fisiológicas para el estudio de la diferenciación sexual.**

La ausencia de cromosomas sexuales y de caracteres morfológicos externos diferenciales entre sexos, han propiciado el desarrollo de diferentes técnicas para tratar de diferenciar machos y hembras de esturiones. Así, se han realizado intentos mediante técnicas físicas y fisiológicas, tales como un examen interno de la gónada: con una biopsia de la gónada sexualmente diferenciada (Conte et al., 1988), endoscopia (Hurvitz et al., 2007) y de forma menos traumática mediante el empleo de un boroscopio a través del tracto urogenital (Kynard y Kieffer., 2002) o mediante ecografía (Moghim et al., 2002). También se han llevado a cabo estudios de los niveles de esteroides sexuales en sangre, considerados como una alternativa a la inspección de la gónada, estando esta técnica bien establecida en peces (McMaster et al., 1992). En el caso de los esturiones, los niveles de esteroides sexuales son bastante bajos hasta el inicio del desarrollo gonadal (Doroshov, Moberg y Van Eenennaam., 1997). Este procedimiento se podría usar para determinar el sexo, pero resulta poco fiable en esturiones, ya que estos valores están influenciados por la edad, las condiciones de cría y la temperatura del agua (Feist et al., 2004), por lo que se ha optado por el desarrollo de técnicas moleculares.

### **1.3.4. Estudios moleculares para la determinación del sexo en esturiones**

Es evidente que una forma efectiva, rápida, relativamente poco traumática y precoz, sería poder disponer de un marcador de ADN que diferenciara sin ningún género de duda los individuos machos y hembras de esturiones.

La investigación en este apartado, se ha venido planteado desde tres enfoques diferentes:

1) mediante marcadores moleculares anónimos (RAPD, AFLP, etc.), 2) mediante la caracterización y análisis de genes candidatos para el determinismo sexual que hayan sido previamente estudiados en otras especies, 3) mediante técnicas de sustracción para intentar encontrar secuencias diferentes entre los genomas de machos y hembras.

#### **1.3.4.1. Búsqueda de marcadores diferenciales entre sexos**

En general, los intentos de caracterizar algún marcador molecular asociado al sexo en los esturiones han resultado infructuosos. Así, Wuertz et al (2006) se centraron en la identificación de marcadores RAPDs, ISSR y AFLPs en cuatro especies de esturión (*A. baerij*, *A. naccarij*, *A. gueldenstaedtii* y *A. ruthenus*), no detectando en ninguno de los casos bandas específica para alguno de los sexos. Idéntico resultado, en estos casos, utilizando RAPDs, encontraron tanto McCormick et al. (2008) para la especie *A. fulvescens* y Keyvanshokoo et al. (2007) para la especie *Huso huso*. Recientemente, Yarmohammadi et al. (2011), tanto en *A. persicus* como en *H. huso* llevaron a cabo un análisis de AFLPs llegando a la conclusión que o bien los cromosomas sexuales en esturiones no están perfectamente diferenciados o bien las técnicas usadas hasta ahora no son lo suficientemente sensibles para llegar a diferenciarlos.

#### **1.3.4.2. Genes implicados en el determinismo y diferenciación sexual.**

En la búsqueda de genes clave en los mecanismos de diferenciación sexual de los esturiones, se ha sugerido la existencia de un gen maestro para la determinación sexual en algunas especies de esturiones (Eenennaam.,

1999; Hett y Ludwig., 2005). Siguiendo este enfoque, se han tratado de encontrar en el genoma de los esturiones, genes, implicados en estos procesos de determinación y diferenciación sexual, que ya han sido caracterizados en otras especies de peces.

De esta forma, y mediante el uso de cebadores degenerados diseñados en regiones conservadas entre especies de peces, se ha puesto de manifiesto la presencia de distintos genes implicados en estos mecanismos. Entre ellos, podemos destacar, los genes de la familia Sox (Sox2, Sox3, Sox4, Sox9, Sox11, Sox17, Sox19 y Sox21) en los genomas de las especies *A. sturio* (Hett y Ludwig., 2005; Hett et al., 2005) y *A. fulvencens* (McCormick et al., 2008). Estos genes están implicados en numerosos procesos del desarrollo y determinación sexual en vertebrados y codifican factores de transcripción relacionados con el Sry de mamíferos ligado al proceso de formación de testículos (Koopman et al., 1991; Wright et al., 1993; Russel et al., 1996).

Recientemente, (Berbejillo et al., 2012), utilizando también cebadores degenerados y diseñados en las regiones conservadas de los genes, se ha realizado un análisis de expresión diferencial de algunos de estos genes implicados en el desarrollo del testículo. Así, se ha comprobado la presencia en el genoma del esturión *A. baerij*, de los genes *Dmrt1* y *Sox9* (factores transcripción en células de Sertolli), *Cyp17a1*, y *star*, (factores de la células de Leydig en producción de androgenos), *ar* (receptor de andrógenos), *igf1* (factor de crecimiento controlando el desarrollo testicular) y *LH* (hormona gonadotropínica). Estos autores han encontrado un claro dimorfismo sexual en la expresión de estos genes (sobre-expresados en testículos) en ejemplares juveniles de tres años.

Sin embargo, y utilizando esta misma técnica usando cebadores específicos, no se han podido amplificar estos genes en otras especies de esturiones, como *A. naccarii* (Lopez-Flores et al., 2005) o *A. fulvencens* (De Woody et al., 2010)

Otros genes, relacionados con el desarrollo gonadal, y que han sido analizados en esturión, en este caso en *A. sinensis*, son los denominados genes ZP (proteína de la zona pelúcida). Estos genes ZP codifican proteínas con un dominio ZP característico que contiene ocho cisteínas y un grupo

interno hidrofóbico muy conservado que juega un papel importante en su estructura secundaria y terciaria (Bork y Sander., 1992). Su papel fisiológico es el de formar parte de la matriz extracelular del folículo ovárico la denominada zona pelúcida. Se han caracterizado numerosas subfamilias de genes ZP pudiendo variar su número desde tres a cuatro en mamíferos hasta siete en peces habiéndose encontrado en el caso de algunas especies de peces tales como en *O. latipes* y *D. rerio* que en concreto el gen ZPC está duplicado (Goudet et al., 2008).

En la especie *A sinensis*, (Li et al., 2011) analizaron tres genes AsZP3.1 AsZP3.2 y AsZP.3.3. Estos dos últimos presentan una gran homología entre sí (alrededor del 82%) y sólo se expresan en gónadas pero muestran poca homología con AsZP3.1 que, por el contrario, presenta una gran amplitud de expresión tisular. Ninguno de los genes presenta expresión en estadios tempranos de desarrollo incluyendo etapas entre uno y dos años. Es a partir de los tres años cuando se observa su expresión en testículos de machos y en los ovarios de las hembras.

### **1.3.4.3. Técnicas de hibridación sustractiva para el estudio de la diferenciación.**

En tercer tipo de abordaje en el estudio de la determinación sexual implica el uso de técnicas sustractivas para encontrar secuencias que son diferentes entre los genomas de machos y de hembras (y sin tener conocimientos previos de su secuencia o identidad). El sexo heterogamético contiene las mismas secuencias que el homogamético excepto aquellos loci determinantes del sexo. Esta técnica de hibridación sustractiva por supresión (HSS) se ha utilizado con éxito en peces tales como el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*, Devlin et al., 1991), en la boga (*Leporinus elongatus*, Nakayama et al., 1994) y en la carpa común (*Cyprinus carpio*, Chen et al., 2010), siendo ampliamente utilizada para el estudio de diversos aspectos de la fisiología de peces (Larkin et al., 2003). Si bien se ha aplicado esta técnica utilizando ADN genómico total en varias especies de esturión, como *A. transmontanus* y *A. fulvescens* (Van Eenennaam., 1997 y McCormick et al., 2008, respectivamente), en ningún caso se han encontrado secuencias específicas de sexo. Adicionalmente, los análisis proteómicos realizados en *A.*

persicus, han puesto de manifiesto patrones proteicos similares en gónadas maduras de machos y hembras en esta especie (Keyvanshokood y Vazari., 2008; Keyvanshokood et al., 2009)

Sin embargo, la estrategia basada en la expresión diferencial, utilizando la sustracción, podrían dar algún resultado concluyente, y por tanto ser de mayor utilidad en esturiones, si partimos de sus transcriptomas (tanto de machos como de hembra) y no de su ADN genómico o proteínas, llevado a cabo hasta hoy en día y sin mucho éxito.



## **2. OBJETIVOS**





En esta Memoria nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Aislar y caracterizar desde el punto de vista citogenético y molecular secuencias repetidas presentes en el genoma de algunas especies de interés de peces planos (Orden Pleuronectiformes).
2. Comprobar el grado de conservación, tanto in vitro como in silico de los ADN repetidos caracterizados previamente en peces planos en otros grupos de peces.
3. Llevar a cabo un estudio evolutivo mediante la comparación de las secuencias de las unidades de repetición en las diferentes especies analizadas.
4. Comprobar la utilidad de estas familias de ADN repetido como marcador taxonómico y filogenético para poder inferir relaciones existentes entre las diferentes especies de peces.
5. Detectar genes con expresión diferencial entre machos y hembras del esturión *Acipenser naccarii* mediante construcción de genotecas procedente de hibridación sustractiva a partir de ARNm de gónadas.
6. Análisis de las genotecas obtenidas para la selección de genes candidatos que puedan estar involucrados en el desarrollo gonadal.
7. Estudiar comparativamente la expresión génica de estos genes en machos y hembras mediante PCR cuantitativa.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. Material empleado y Procedencia.

#### 3.1.1. Peces planos (Orden Pleuronectiformes)

Para llevar a cabo los objetivos planteados en esta Memoria en relación con los peces planos, se han utilizado ejemplares pertenecientes a 15 especies de peces distintas. En la **TABLA 1** se recoge la información de dichas muestras, su clasificación taxonómica y el material de partida con el que se ha trabajado.

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	ORDEN	NOMBRE COMÚN	TIPO DE MATERIAL
<i>Solea senegalensis</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Lenguado senegalés	Larvas/ músculo
<i>Solea solea</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Lenguado común	Músculo
<i>Solea lascaris</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Lenguadina o pegusa	Músculo
<i>Dicologlossa cuneata</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Acedía	Músculo
<i>Bathysolea profundicola</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Lenguado de fondo	Músculo
<i>Buglossidium luteum</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Acedía o tambor	Músculo
<i>Microchirus azevia</i>	Soleidae	Pleuronectiformes	Lenguado negro	Músculo
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Pleuronectidae	Pleuronectiformes	Fletan o Halibut	Músculo
<i>Pleuronectes platessa</i>	Pleuronectidae	Pleuronectiformes	Solla	Músculo
<i>Arnoglossus imperialis</i>	Bothidae	Pleuronectiformes	Peluda imperial	Músculo
<i>Arnoglossus thori</i>	Bothidae	Pleuronectiformes	Peluda	Músculo
<i>Lepidorhombus boscii</i>	Scophthalmidae	Pleuronectiformes	Gallo	Músculo
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	Scophthalmidae	Pleuronectiformes	Gallo del Norte	Músculo
<i>Sparus aurata</i>	Sparidae	Perciformes	Dorada	Músculo
<i>Trachurus trachurus</i>	Carangidae	Perciformes	Jurel	Músculo

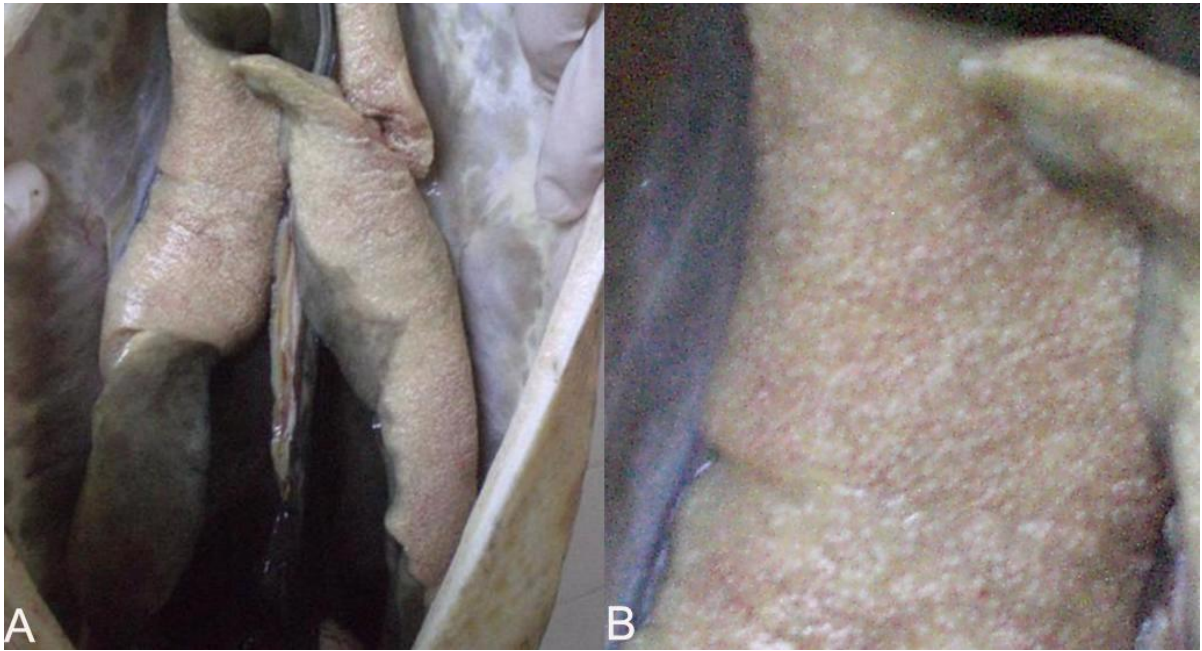
**TABLA 1:** Resumen de las muestras utilizadas para la caracterización y análisis del ADN repetido en los genomas de peces planos. También se han incluido otras especies de peces del Orden Pleuronectiformes, que se han analizado en relación con este objetivo

El material utilizado de la especie *S. senegalensis* consiste en larvas (para la obtención de cromosomas) y ejemplares juveniles (para la extracción de ADN).

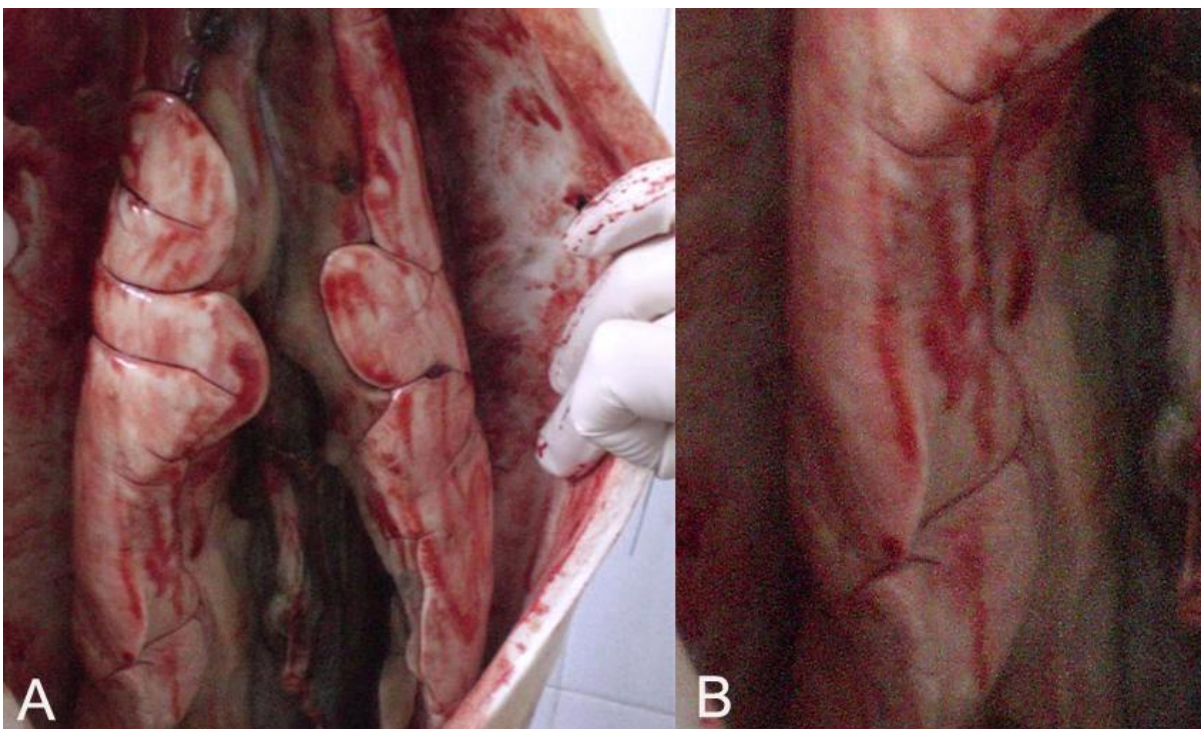
Estos ejemplares han sido obtenidos de las instalaciones del Centro IFAPA “Agua del Pino” en Cartaya (Huelva), organismo dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Por otro lado, el material usado de la especie *H. hippoglossus* (ADN y cromosomas) fue obtenido gracias al Dr. Reith del National Research Council-Institute for Marine Biology en Halifax (Canadá). Las muestras utilizadas de las otras especies de peces planos *S. lascaris*, *M. azevíá*, *P. platessa*, *D. cuneata*, *S. lusitanica*, *C. linguatula*, *A. thori*, *A. laterna*, *S. maximus*, *S. rhombus*, *L. whiffiagonis* y *L. boscii* fueron cedidas por el grupo del Dr. Martínez Portela del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela. Por último, el material de *S. aurata* y *T. trachurus* proviene de ejemplares comerciales.

#### **3.1.2. Esturiones (Orden Acipenseriformes).**

En esta Memoria se han analizado individuos juveniles pertenecientes a la especie de esturiones *Acipenser naccarii*, de los que se tomaron muestras de gónada e hígado. Estas gónadas se encontraban morfológicamente diferenciadas, pudiendo conocer el sexo de cada ejemplar. Así, se tomó material de las gónadas y el hígado de 5 hembras y 5 machos en los que visualmente, se podían diferenciar las gónadas femeninas de las masculinas. En la **FIGURA 1**, se observan las gónadas de una hembra, en la que se distingue la textura grumosa del tejido, que en el futuro será el caviar. En la **FIGURA 2**, se pueden observar las gónadas de macho, que no tienen la estructura grumosa, pero se puede observar una zona estriada característica de las gónadas de macho. Todos los ejemplares fueron proporcionados por el Dr. Alberto Domezain, de la Piscifactoría Sierra Nevada, Riofrío, Granada.



**FIGURA 1:** **A.** Imagen de las gónadas de una de las hembras de *A. naccarii*, de las que se tomaron muestras para realizar este estudio. **B.** Detalle de la gónada en la que se observan los grumos, que se convertirán en caviar



**FIGURA 2:** **A.** Imagen de las gónadas de un macho de *A. naccarii*, de las que se tomaron muestras para realizar este estudio. **B.** Imagen ampliada de la gónada en la que se observa que es lisa, pero que se encuentra estriada en la zona inferior.



#### 3.2. Métodos utilizados.

##### 3.2.1. Extracción de ADN.

La obtención de ADN genómico total a partir de tejido sólido (hígado, músculo y/o gónadas) de todas las especies analizadas, se llevó a cabo siguiendo el método descrito en Sambrook y Rusell., 2001. El protocolo es el siguiente:

1. Maceramos 1g de tejido durante 5 horas en un tubo de polipropileno con bolas de vidrio al que se añaden 900µl de tampón de extracción compuesto por 10mM de Tris-ClH, pH 8; 100mM de EDTA, pH 8; 10 µg/ml de Proteinasa K y 200 µl de SDS al 0,5%. Mantenemos a 56°C en un baño con agitación suave.
2. Añadimos 20 ng/ml de ribonucleasa A (ARNasa) y se mantiene a 37°C durante 1 hora en un baño con agitación.
3. Purificamos el ADN mediante varias extracciones con 1 volumen de fenol y una última extracción con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando durante 10 min a 10.000 rpm.
4. Pasamos el sobrenadante a un tubo limpio y el ADN se precipita con 1/10 del volumen de acetato sódico y 1 volumen de Isopropanol.
5. Mezclamos con cuidado, para no degradar el ADN y centrifugamos durante 10 min a 10.000 rpm.
6. Decantamos el sobrenadante eliminando los restos de Isopropanol con una pipeta.
7. Lavamos el *pellet* obtenido con 1 volumen de etanol al 70%, centrifugando nuevamente a 10.000 rpm durante 5 min.
8. Eliminamos completamente los restos de etanol con una pipeta y dejamos secar a temperatura ambiente.
9. Resuspendemos el *pellet* añadiendo agua ultrapura.

La calidad y cantidad del ADN genómico obtenido se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5X (Tris 90mM, Ácido bórico 90mM, EDTA 1mM) con el uso de marcadores de peso molecular conocido (ADN del fago Lambda digerido con HindIII de Roche) y mediante espectrofotometría con el biospectrofotómetro de Eppendorf, (Eppendorf, A. G. BioPhotometer 8,5 mm).

### 3.2.2. Extracción y purificación de ARN.

El aislamiento de ARN a partir de tejidos se realizó utilizando “Trizol” (Invitrogen™) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante:

1. Homogenizamos de 50 a 100 mg de tejido (gónada, hígado y, músculo) en 1 ml de Trizol, mediante un homogeneizador eléctrico (Micra-D1 de ART-Labortechnik), siempre manteniendo el macerado en hielo.
2. Posteriormente, incubamos el homogeneizado durante 5 min a temperatura ambiente (15-30°C).
3. Añadimos 200 µl de cloroformo y mezclamos por vórtex 15 s.
4. Incubamos durante 2-3 min a temperatura ambiente y centrifugamos a 13000 rpm durante 15 min a 4°C.
5. Pasamos la fase acuosa a un tubo limpio que contiene 500 µl de alcohol isopropílico y mezclamos por inversión.
6. Incubamos 10 min a temperatura ambiente y a continuación centrifugamos la muestra a 13000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C.
7. Eliminamos el sobrenadante y lavamos el *pellet* con 1 ml de etanol al 75% mezclando por inversión.
8. Realizamos una última centrifugación durante 5 min a 10000 rpm a una temperatura de 4°C.
9. Decantamos el sobrenadante y secamos el *pellet*.
10. Resuspendemos el *pellet* en agua libre de nucleasas, incubando durante 10 min a 55-60°C.

La purificación de ARN total se llevó a cabo con el kit “RNeasy Protect Mini Kit” Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Ajustamos la muestra a un volumen de 100 µl con agua libre de nucleasas.
2. Añadimos 350 µl de buffer de lisis RLT ( $\beta$ -Mercaptoethanol) y mezclamos por inversión.
3. Ponemos 250 µl de etanol 96-100% y mezclamos.
4. Pasamos todo el volumen de muestra a una columna colocada dentro de un tubo colector de 2 ml y se realizamos un centrifugado de 15 sg. a 10000 rpm.

### 3. Material y Métodos

---

5. Eliminamos el líquido filtrado y añadimos 500 µl de buffer de lavado RPE. Seguidamente centrifugamos 15 s. a 10000 rpm. (Repetimos el paso de centrifugación 2 min a 10000 rpm para eliminar totalmente los restos de etanol)
6. Cambiamos la columna a un tubo colector de 1,5 ml y añadimos de 30 a 50 µl de agua libre de RNAsa.
7. Centrifugamos durante 1 min a 10000 rpm.
8. El ARN purificado se mantiene a -80°C.

La cantidad y calidad del ARN extraído se realizó mediante electroforesis automatizada usando el equipo “Experion™ Automated Electrophoresis Station” de Bio-Rad. (Resultados, 4.2.1)

Para realizar dicha electroforesis se utiliza el kit “RNA StdSens (Bio-Rad) Kit” y se sigue el protocolo establecido por el fabricante y que se detalla a continuación.

#### **Preparación de muestras y reactivos.**

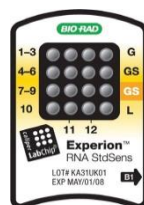
Antes de cada uso, realizamos una limpieza de electrodos para evitar cualquier tipo de contaminación. Procedemos de la siguiente forma:

1. Llenamos un chip de limpieza con 800 µl de la Solución Limpiadora de Electrodo de Experion y lo colocamos en la estación de electroforesis durante 2 min.
2. Retiramos la Solución Limpiadora de Electrodo, añadimos al chip de lavado 800µl de agua libre de nucleasas y de nuevo lo colocamos en la estación de electroforesis durante 5 min. Este lavado lo repetimos una segunda vez. Por último se dejamos abierta la tapa durante 1 min para permitir que los electrodos se sequen por completo.
3. Para preparar el gel donde se llevará a cabo la electroforesis virtual, centrifugamos 600 µl de ARN-gel, a través de una columna con filtro durante 10 min a 10000 rpm. De este preparado se cargan 9µl en el pocillo **G** del chip de análisis.
4. De la solución ya filtrada pipeteamos 65 µl en un tubo de PCR, añadimos 1µl de gel stain y mezclamos (la mezcla la protegemos de la luz y la guardamos en frío hasta su uso). De este preparado se cargan 9 µl en el pocillo denominado **GS** del chip de análisis.

5. Preparamos el patrón (Experion™ RNA Ladder de Bio-Rad) con el que compararemos el tamaño de los fragmentos correspondientes a los genes 28S, 18S y 5S en cada una de las muestras, indicativos de la calidad de las mismas. Tomamos 2 µl del marcador (ladder) y lo desnaturalizamos durante 2 min a 70°C. Inmediatamente incubamos 5 min en hielo y cargamos 1 µl del ladder en el pocillo del chip llamado **L**.
6. Realizamos el mismo procedimiento para preparar las muestras que vamos a cuantificar, dispensando 1 µl de cada una de ellas en los pocillos correspondientes a la muestra a analizar del 1 al 12 del chip de análisis.

Así, para cargar el chip, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Se cargan 9 µl de gel stain en el pocillo **GS (FIGURA 3)**. El chip se lleva al homogenizador durante 30 s con el programa 1.B.
2. A continuación se cargan 9 µl del gel filtrado en el pocillo **G (FIGURA 3)** y otros 9 µl de gel stain en el pocillo **GS**. Procurando que no se formen burbujas.
3. Se cargan 5 µl de buffer en todos los pocillos numerados del 1 al 12, y en el pocillo **L (FIGURA 3)**.
4. Se carga 1 µl de muestra en cada pocillo, y 1 µl de ladder en el pocillo **L**.
5. El chip se mete en la estación vórtex para eliminar las posibles burbujas.
6. A continuación se encaja el chip en la estación de electroforesis, se introducen los datos de las muestras y se pone en funcionamiento el programa.



**FIGURA 3:** Chip de carga de Experion™ Automated Electrophoresis Station™ de Bio-Rad

Tras realizar la carrera, los resultados aparecen de diferentes formas:

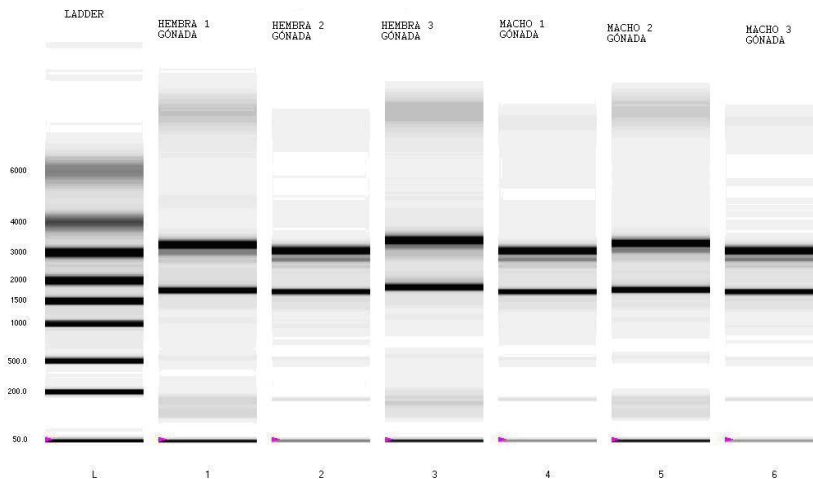
- A. Una imagen virtual de la electroforesis.

### 3. Material y Métodos

B. Un electroferograma.

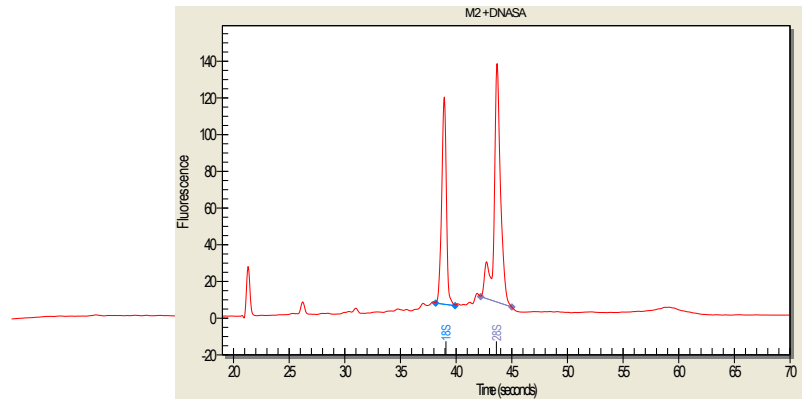
C. Una serie de datos obtenidos de cada muestra (ARN total, tiempo que ha tardado en correr el área de electroforesis, concentración, relación que existe entre 28S y 18S, e indicador de calidad de ARN).

Con la imagen virtual, **FIGURA 4**, podemos observar la electroforesis, ya que en una muestra de calidad aceptable se deben observar dos bandas oscuras bien delimitadas que pertenecen a las fracciones de los ARN ribosómicos 28S y 18S.



**FIGURA 4:** Electroforesis virtual obtenida con la estación de electroforesis automatizada Experion de Bio-Rad, de ARN extraído de gónadas de 3 hembras y de 3 machos de esturión. Las bandas más intensas y de menor tamaño corresponden al ARNr 18S y la banda más intensa y de mayor tamaño corresponde a ARNr 28S

Además, el programa suministra un electroferograma, **FIGURA 5**, que es una gráfica en la que se muestra la relación 28S:18S en un eje de coordenadas de fluorescencia emitida/tiempo. Con esta gráfica se observa la calidad de ARN, también se pueden observar pequeños picos iniciales que pertenecen a ARNm.



**FIGURA 5:** Electroferograma. Gráfica que proporciona el programa tras realizar la electroforesis virtual. En ella se observa fundamentalmente, la relación que existe entre los fragmentos 28S y 18S en un lapso de tiempo determinado y dependiendo de la fluorescencia que han emitido.

Una vez corrida la muestra, el programa suministra los datos de concentración en ng/μl, y la relación 28S: 18S. (Resultados 4.2.1)

En este estudio tenemos que asegurarnos que en la muestra no queda ningún resto de ADN genómico, por lo que, a pesar de haber extraído con un kit que se basa en columnas tratadas con DNasa, se realiza un segundo tratamiento del ARN extraído con esta enzima. Para ello, se utiliza el kit “DNaseI, Amplification Grade” de Invitrogen™ que se basa en la acción de una Deoxyribonucleasa que digiere dobles cadenas de ADN actuando sobre el extremo 5’.

Para tratar 1 μg de ARN purificado se sigue el siguiente protocolo:

1. Se añade 1 μl de DNasa (1 U/ μl), al mismo tiempo que un tampón (10X DNase I Reaction Buffer), para que las condiciones de reacción sean las óptimas, y agua de DEPC hasta un volumen de 10 μl.
2. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 15 min y a continuación, se le añade 1 μl de EDTA (25 mM EDTA pH 8.0) que inactiva la reacción, y se deja actuar durante 10 min a una temperatura de 65°C.
3. Posteriormente, se realiza una electroforesis con la estación de electroforesis automatizada Experion de Bio-Rad, ya que con este tratamiento se modifica la concentración y calidad del ARN. Datos no mostrados.

#### **3.2.3. Síntesis de ADNc. Reacción de Retrotranscripción.**

Una vez obtenido ARN de buena calidad, se procedió a la obtención, mediante retrotranscripción, del cDNA. El paso de ARN a cDNA se realizó con el “iScript™ cDNA Synthesis Kit” de Bio-Rad. Para 2 µg de muestra de ARN se utilizan 4 µl de 5X iScript reaction mix, 1 µl de enzima (iScript reverse transcriptase) y agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 20 µl.

Se mezcla y se introduce en el termociclador con el siguiente ciclo: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C, y se mantiene en frío (4°C).

La concentración y pureza del cDNA se estiman con Biofotómetro (Eppendorf, A. G. BioPhotometer) a 260 nm y 280 nm de absorbancia. (Resultados, 4.2.1)

El ADNc se guardó a -20 °C, el cual, posteriormente, fue utilizado tanto para realizar la Hibridación sustractiva (Apartado 3.2.5), como las PCRs cuantitativas de los distintos genes analizados. (Apartado 3.2.14)

#### **3.2.4. Aislamiento de ADN repetido.**

Basándose en las propiedades de las secuencias de ADN repetido, existen varias técnicas para su aislamiento. En esta investigación, hemos usado cuatro técnicas para identificar y aislar ADN repetido en las diferentes especies analizadas:

##### **3.2.4.1. Aislamiento de ADN satélite utilizando enzimas de restricción.**

Esta técnica se ha utilizado para el caso del fletan. El ADN genómico extraído se somete a digestión con una batería de enzimas de restricción (HindI, AluI, PvuII, RsaI, HaeIII, BamHI, PstI, DraI, SacI, EcoRI). Las digestiones se realizaron con 5 unidades de enzima por µg de ADN en el tampón recomendado por el fabricante (Roche) durante 16 horas a una temperatura constante de 37°C. Transcurrido este tiempo, los fragmentos generados fueron separados en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X (Tris 90 mM, Ácido bórico 90mM, EDTA 1mM) con un contenido de 0,5 µg/ml de SYBR® Green.

Tras la electroforesis, con alguno de los enzimas utilizados, se pone de manifiesto una banda más intensa sobre el rastro generado de ADN genómico total digerido, indicando la existencia de cientos de miles de fragmentos de igual tamaño,

pudiendo ser por tanto, la unidad de un ADN repetido que presenta una diana interna para ese enzima de restricción.

Se cortaron las bandas que nos interesaban con ayuda de un bisturí y se procedió a su purificación con el kit de “Applied Biosystems Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” siguiendo el protocolo del fabricante GE Healthcare.

Para determinar si estas bandas pertenecen a una o varias familias de ADN satélite, se llevó a cabo la técnica de hibridación tipo Southern-blot cuyo protocolo se describe más adelante en el apartado 3.2.6.

El ADN correspondiente a unidades de repetición de un ADN satélite fue clonado siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.8.2 y secuenciado (Apartado 3.2.10).

#### **3.2.4.2. Aislamiento de ADN satélite mediante la técnica de self priming PCR.**

Esta técnica, que se ha utilizado en el caso del lenguado senegalés, se basa en la posibilidad de utilizar como oligos, para una reacción de PCR, el propio ADN que se va a amplificar, esperando que el ADN que se encuentra en una mayor proporción en el genoma, como el ADN satélite, sea el que con mayor probabilidad se una en la fase de apareamiento de secuencias durante la reacción de amplificación.

Para ello, se desnaturaliza a 100°C durante 15 min unos 200ng de ADN genómico. Transcurrido este tiempo, se añade 1 µg de ADN sin desnaturalizar (que es utilizado como sustrato) al ADN desnaturalizado (utilizado como cebador) y con las condiciones en las que se realiza una PCR con 4 µl de la mezcla, 0,5 µl de dNTPs a 10mM, 3 µl de Buffer 10X, 2 µl de ClMg (50mM), 0,3 µl de Taq Polimerasa (5 U/µl de la marca Biotools) y 18 µl de agua ultrapura. Las condiciones de amplificación son un primer ciclo a 95°C durante 10 min seguidos de 35 ciclos a 95°C 30 s, 55°C 2 min, 72°C 2 min y finalizando con un ciclo de 10 min a 72°C.

El resultado de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se observó la existencia de producto amplificado. Se llevaron a cabo varias rondas de reamplificación hasta obtener una cantidad suficiente de producto. Posteriormente, el amplificado fue sometido a una digestión con diferentes enzimas de restricción (HindI, AluI, PvuII, RsaI, HaeIII, BamHI, PstI, DraI, SacI, EcoRI). Los fragmentos generados con 5 U/µg de ADN en el tampón recomendado por el fabricante



### 3. Material y Métodos

(Roche) durante 8 a 16 horas a una temperatura de 37°C. Las digestiones, tras precipitación, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa del 1,5 – 2% en tampón TBE 0,5X (Tris 90 mM, Ácido bórico 90mM, EDTA 1mM) con un contenido de 0,5 µg/ml de SYBR® Green.

Las bandas que aparecen en el gel son escindidas y purificadas siguiendo el protocolo con el kit de GE Healthcare de purificación de bandas “Applied Biosystems Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” de GE Healthcare.

Los fragmentos purificados fueron clonados en vectores plasmídicos siguiendo el protocolo seguido del apartado 3.2.8.2.

#### 3.2.4.3. Aislamiento de ADNs repetidos a partir de PCR con oligos diseñados específicamente para dicha secuencia.

Esta técnica fue utilizada para obtener el satélite Pvull del resto de especies del género *Solea*.

A partir de la secuencia del satélite aislado en *S. senegalensis*, se diseñaron primers específicos, para este fragmento de ADN de tal manera que al realizar una PCR, pudieran amplificar la unidad de repetición completa. **TABLA 2.**

Esta PCR se realizó con 50 ng/ µl de ADN, 0,5 µl de dNTPs a 10mM, 5 µl de Buffer 10X, 2 µl de ClMg (50mM), 0,3 µl de Taq Polimerasa (5U/µl de la marca Biotools) y se completa con agua ultrapura hasta un volumen de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron un primer ciclo a 95°C durante 10 min seguidos de 35 ciclos a 95°C 30 s, 52-55°C 1 min, 72°C 2 min y finalizando con un ciclo de 10 min a 72°C. Para el resto de las especies en las que se amplificó este ADN satélite, las condiciones fueron las que se especifican en la **TABLA 3.**

PRIMERS	FORWARD	REVERSE
Pvull	5´-gAg AC ACT AAT AgA AAA-3´	5´-CTC ACA AAT gaa Gtt AAC-3´

**TABLA 2:** Secuencia de los primers diseñados partir del alineamiento de las secuencias del satélite aislado Pvull de *Solea senegalensis*, para amplificar dicho satélite en otras especies de la misma familia. (FIGURA 12 de Resultados).

ESPECIES AMPLIFICADAS CON PVUII	TEMPERATURA DE ANNELING EN °C
<i>S. senegalensis</i>	55
<i>S. solea</i>	52
<i>S. lascaris</i>	53

**TABLA 3:** Temperatura annealing de la Familia Soleidae para el amplificado del satélite Pvull con los primers diseñados.

Posteriormente las reacciones de PCR se corrieron en gel de agarosa del 1,5 – 2% en tampón TBE 0,5X (Tris 90 mM, Ácido bórico 90mM, EDTA 1mM) con un contenido de 0,5 µg/ml de SYBR® Green. Se cortaron las bandas que coincidían con el tamaño buscado.

#### 3.2.4.4. Aislamiento de ADNs repetidos a partir de librerías genómicas.

Se realizó un análisis de los diferentes clones obtenidos a partir de una genoteca que había sido enriquecida para microsatélites ricos en adeninas y timinas en el lenguado senegalés. En esta librería existe un sesgo hacia la presencia de secuencias ricas en estos nucleótidos, algo típico en el caso de ADNs satélites. Así, las secuencias de estos clones fueron analizadas en búsqueda de un patrón repetido dentro de ellas y además, fueron enviadas a la base de datos EMBL/GenBank. Uno de estos clones, ACA72, dio homología con un ADN satélite llamado BG16 (número de acceso AB095091) de la especie *Lepomis macrochirus*, un pez perteneciente al Orden Perciformes.

A partir del alineamiento de las secuencias de este clon ACA72 y de la unidad de repetición del ADN satélite BG16 de *Lepomis*, se diseñaron oligos que pudieran amplificar en una reacción de PCR, la posible unidad de repetición de este ADN repetido en el lenguado. Para ello, los oligos se dispusieron de forma enfrentada y separados en unas pocas pares de bases con el fin de amplificar más de una unidad de repetición. Además, fueron diseñados en las regiones más conservadas entre el satélite de *Lepomis* y la secuencia ACA72 de lenguado con el fin de poder utilizarlos en un grupo amplio de especies de peces. **TABLA 4, TABLA 5.**

### 3. Material y Métodos

PRIMERS	FORWARD	REVERSE
ACA-72	5'-CAG TAA GTG CCT WYT TGT TGR GGT A-3'	5'-TCA AGT CWR TGC TNR WGT WWG GGT-3'

**TABLA 4:** Secuencia de los primers diseñados partir del alineamiento de las secuencias del clon ACA72 y de la unidad de repetición del ADN satélite BG16 de *Lepomis*, para amplificar dicha secuencia repetida en otras especies de peces, del mismo y de diferentes Órdenes.

ESPECIES	TEMPERATURA DE UNIÓN EN °C
<i>S. senegalensis</i>	55
<i>S. solea</i>	55
<i>S. lascaris</i>	54
<i>D. cuneata</i>	54
<i>B. profundícola</i>	55
<i>M. azevíá</i>	53
<i>B. luteum</i>	54
<i>H. hippoglossus</i>	54
<i>P. platessa</i>	56
<i>A. imperialis</i>	55
<i>A. thori</i>	52
<i>L. boscii</i>	53
<i>L. whiffiagonis</i>	54
<i>S. aurata</i>	52
<b><i>T. trachurus</i></b>	<b>55</b>

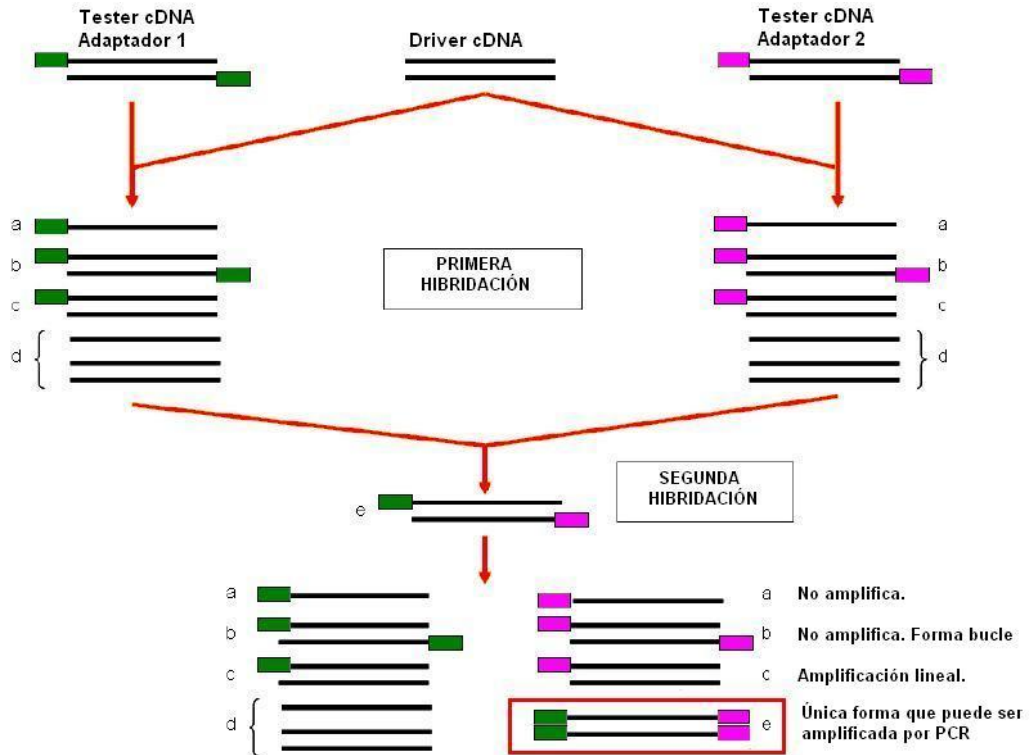
**TABLA 5:** Condiciones de temperatura annealing de los primers ACA-72 para cada especie en la que se amplificó esta secuencia del Orden Pleuronectiformes y del Orden Perciformes.

Estas reacciones de PCR se realizaron con 50 ng/ $\mu$ l de ADN, 0,5  $\mu$ l de dNTPs a 10mM, 5  $\mu$ l de Buffer 10X, 2  $\mu$ l de CIMg (50mM), 0,3  $\mu$ l de Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ l de la marca Biotools) y se completa con agua ultrapura hasta un volumen de 50  $\mu$ l. Las condiciones de amplificación fueron un primer ciclo a 95°C durante 10 min seguidos de 35 ciclos a 95°C 30 s, 52-56°C (**TABLA 5**) 45s, 72°C 2 min y finalizando con un ciclo de 10 min a 72°C.

#### 3.2.5. Aislamiento de secuencias con expresión diferencial: Hibridación sustractiva.

La hibridación sustractiva por supresión (SSH) es una metodología molecular usada para identificar los genes que presentan expresión diferencial (Diatchenko et al., 1996). Con esta técnica se puede identificar genes expresados diferencialmente sin necesidad de clonar previamente el ADN complementario de éstos, así como la

normalización y amplificación de los genes expresados a niveles muy bajos (Diatchenko et al., 1996).



**FIGURA 6:** Esquema de la hibridación sustractiva por supresión, modificada del protocolo de "Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit".

La hibridación sustractiva por supresión (SSH) se ha realizado siguiendo el protocolo del kit de "Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit". (**FIGURA 6**)

1. Los ADNc problema y tester fueron digeridos con la enzima Rsa I, que es una enzima de restricción que reconoce cuatro pares de bases (5'-GTAC-3') y deja extremos romos en el cDNA digerido.
2. Se realizaron dos hibridaciones sustractivas, una de machos, teniendo el cDNA de hembras como tester, y una de hembras teniendo el ADNc de machos como tester.
3. El ADN problema se divide en dos alícuotas y cada una se liga de forma separada con los adaptadores 1 y 2 resultando así dos poblaciones de ADNc problema.

4. Se mezcla una pequeña cantidad de cada muestra problema con un exceso de su correspondiente cDNA tester (5 µg) posteriormente son desnaturalizados por calor, e hibridados durante 8 h a 68 °C.
5. Las dos muestras de esta primera hibridación se combinan e hibridan con un excedente de ADNc tester desnaturalizado toda la noche a 68 °C. Luego se realiza una PCR para amplificar los ADNc que representaban genes expresados diferencialmente.
6. Posteriormente, se hace una segunda PCR con oligonucleótidos consecutivos (1 R y 2 R) para reducir el nivel de amplificación inespecífica.
7. Los productos de amplificación de la segunda PCR son clonados siguiendo el protocolo seguido del apartado 3.2.8.2.

#### **3.2.5.1. Análisis de las secuencias seleccionadas en la hibridación sustractiva.**

Para el análisis de las secuencias, éstas fueron enviadas a la base de datos EMBL/ GenBank BlastX, en búsqueda de homologías. Una vez realizada esta primera clasificación, fueron alineadas y posteriormente se dispusieron en tabla Excel junto con los datos suministrados por EMBL/ GenBank BlastX: especie con la que daba homología, número de acceso, E-value, redundancia, tamaño del conting más grande, porcentaje de identidad. Además, se sometieron a la búsqueda de términos GO a través del software AmiGO v.1.8 (<http://www.geneontology.org/>) (Camon y col., 2004) y se clasificaron en función de estos términos.

Se seleccionaron aquellos genes que pensamos podían tener un especial interés en el desarrollo gonadal de *A. naccarii*, y se diseñaron primers utilizando diferentes técnicas:

1. Diseñando primers sobre las secuencias obtenidas en las regiones conservadas.
2. Comparando la secuencia analizada con otras secuencias, con una alta homología, que se encuentran en otras especies y en las zonas más conservadas y diseñando primers sobre ella.
3. Para el diseño de oligos se usó el programa Primer 3 disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/primer3> (Rozen y Skaletsky., 2000).

Los primers diseñados se utilizaron para obtener fragmentos de los genes seleccionados más largos. **TABLA 6.** Y la PCR convencional se realizó con 100 ng/  $\mu$ l de ADN, 0,5  $\mu$ l de dNTPs a 10mM, 10  $\mu$ l de Buffer 10X, 2  $\mu$ l de CIMg (50mM), 0,3  $\mu$ l de Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ l de la marca Biotools) y se completa con agua ultrapura hasta un volumen de 100  $\mu$ l. Las condiciones de amplificación fueron un primer ciclo a 95°C durante 10 min seguidos de 35 ciclos a 95°C 30 s, Temperatura annealing 45 s, 72°C 2 min, finalizando con un ciclo de 10 min a 72°C.

PRIMERS	FORWARD	REVERSE	Tª ANNEALING EN °C
ZP3.2	5'-TGA AAT TGC TGC TTC ACT GC-3'	5'-CCC AGA GTG GCT TCT ACC AG-3'	45
ZP3.3	5'-GAG ATA ACT GTT GGT TTG GAA G-3'	5'-GCA ACA TAG AAA TCA GAA T-3'	45
FERRITINA	5'-ATG GAG TCT CAG ATT CGC CA-3'	5'-TTA GCT GCT GCT CTC CAA GGT-3'	57
CALCIUMBINDING	5'-GTT TGA CGT CAG CGC AGT G-3'	5'-CCC GTC CTT ATT CTC ATC CA-3'	51

**TABLA 6:** Secuencia de los primers para la amplificación de los genes seleccionados en la hibridación sustractiva para obtener una secuencia más grande.

### 3.2.6. Hibridación tipo shouthern-blot.

#### Restricción del ADN genómico, electroforesis y transferencia a la membrana.

Para el análisis del genoma mediante la técnica del Southern-blot, 5  $\mu$ g de ADN genómico de diferentes peces planos, fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (TaqI, DraI, EcoRI, PvuII, RsaI, HaeIII, MspI, NdeI, BamHI, HpaI, HindI, PstI, DdeI, AflIII, AluI, ApaI, BglII, HindII) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los fragmentos de restricción resultantes fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X conteniendo 0,5 $\mu$ g/ml de SYBR® Green.

Tras la electroforesis, los fragmentos de restricción se transfirieron a una membrana de nylon "Hybon N<sup>+</sup>" (Amersham Biosciences), siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook y Rusell (2001)

La fijación del ADN a la membrana se realizó con NaOH 0,2M durante 2 min, tal y como recomienda el fabricante (Amersham Biosciences) para el uso del kit de marcaje, hibridación y detección no radiactivo "ECL™ direct nucleic acid labelling"

de GE Healthcare. La membrana se lavó con 6XSSC durante 1 min y se dejó secar a temperatura ambiente.

La membrana que contiene el ADN genómico digerido se utilizó para realizar la hibridación usando como sonda la propia banda correspondiente a la supuesta unidad de repetición. El marcaje de la sonda y la hibridación se llevaron a cabo usando el sistema no radiactivo “ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system” de GE Healthcare, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Tras la hibridación se lavó la membrana según la astringencia requerida en cada caso, siguiendo la fórmula de Meinkoth y Wahl (1984), basada en las relaciones de porcentaje de homología entre dos hebras de ADN y la temperatura empleada (T):

$$T=81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\%G+C) - 500/n - 0,61 (\% \text{ formamida}) - 1,5 (\% \text{ bases no complementarias}).$$

En la que M es la concentración de iones Na<sup>+</sup> y n la longitud de la cadena de ADN en pares de bases.

Las condiciones de alta astringencia permiten detectar secuencias que guardan una identidad superior al 95% con la sonda de hibridación, mientras que las condiciones de baja astringencia permiten detectar secuencias que tienen una identidad superior al 82% con la sonda de hibridación.

Los lavados fueron seguidos de la detección de los sitios de hibridación usando soluciones de detección del kit ECL, que contienen peróxido de hidrógeno y luminol. Las membranas fueron expuestas durante 30 min con una película autorradiográfica (Hyperfilm ECL™, Amersham Biosciences) sensible a la luz que se emite en los sitios de hibridación durante la reacción de detección.

#### **3.2.7. Hibridación *in situ*.**

Las hibridaciones *in situ* de las distintas familias de ADN repetido caracterizadas en *H. hippoglossus* y en *S. senegalensis*, se realizaron sobre preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de larvas o de cultivos de sangre (De la Herrán et al., 2005, Garrido-Ramos MA et al., 1999). Las sondas se marcaron con biotina y digoxigenina mediante el kit de Invitrogen™, “BioPrimer® DNA Labeling System”. Las hibridaciones se realizaron siguiendo el protocolo de Schwarzacher et al., 2000 con modificaciones. Tras la hibridación, las

preparaciones fueron lavadas y las sondas fueron detectadas con estreptavidina siguiendo el protocolo de Schwarzacher et al. Tras la detección, los cromosomas se tiñeron con DAPI y PI y se montaron en “VECTASHIELD® Mounting Medium”.

### **3.2.8. Clonación de secuencias aisladas.**

#### **3.2.8.1. Clonación de los productos obtenidos mediante digestión con PUC 18.**

Se procedió a la clonación con el vector PUC18 de las bandas obtenidas por digestión del ADN genómico en el caso del fletan, y por Self Priming en el caso del lenguado.

Para cada caso, el vector PUC18 fue digerido con las mismas enzimas utilizadas para aislar las unidades de repetición de los respectivos ADNs satélites. Posteriormente el vector digerido y la banda purificada fueron incubados en presencia de la enzima ligasa durante toda una noche a temperatura ambiente.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar las células competentes DH5α de *Escherichia coli*.

Los clones recombinantes se detectaron en placas con medio sólido LB (Peptona: Extracto de Levadura: ClNa en una relación w/w 2:1:1 y agar al 15%) conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido), (Sambrook y Russel., 2001) en las que se siembran 100 µl de bacterias.

Las colonias recombinantes se seleccionaron mediante reacción colorimétrica y fueron purificados con el kit de purificación de plásmidos de Eppendorf “Quantum Prep®. Plasmid Miniprep” siguiendo las recomendaciones del comerciante.

#### **3.2.8.2. Clonación de los productos de PCR usando TOPO-TA.**

Este vector sintetizado por Invitrogen™ pertenece al kit “TOPO TA Cloning® Kit for sequencing” y no necesita ser digerido de modo que los fragmentos procedentes de la PCR pueden ser directamente ligados al vector. Este protocolo fue utilizado en los casos en los se obtuvo el inserto mediante amplificación por PCR. Así, se utilizó para los saltélites Pvull del género Solea (Resultados 4.1.2.) como para el ADN repetido ACA72 de peces planos (Resultados 4.1.3.). Por otro



lado, también fue utilizado para la clonación de secuencias obtenidas en la hibridación sustractiva en el caso de los esturiones (Resultados 4.2.1). Tras la ligación, los clones recombinantes se detectaron en placas con medio LB (Peptona: Extracto de Levadura: ClNa en una relación w/w 2:1:1 y agar al 15%) conteniendo ampicilina (100 µg/ml). Este vector a diferencia de los otros no necesita de la presencia de IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido) para la detección de colonias recombinantes y no recombinantes, debido a las características que posee.

Los plásmidos recombinantes fueron purificados con el kit de purificación de plásmidos de Eppendorf “Quantum Prep®. Plasmid Miniprep” siguiendo las recomendaciones del comerciante.

#### **3.2.9. Análisis de los plásmidos recombinantes.**

Para cerciorarnos de que los plásmidos seleccionados contienen inserto se han utilizado varias técnicas:

##### **3.2.9.1. Digestión del plásmido con enzimas de restricción:**

Los plásmidos seleccionados se digieren con el enzima adecuado (presenta dianas flanqueando el inserto). Tras la digestión, los plásmidos se someten a electroforesis y se observa la presencia del inserto así como su tamaño. Los plásmidos con el inserto adecuado son secuenciados.

##### **3.2.9.2. Amplificación mediante PCR:**

Tras seleccionar las colonias recombinantes, estas son inoculadas en 25 µl de agua destilada y son desnaturalizadas calentándolas a 95°C durante 5 min. Para la reacción de PCR se utiliza como sustrato 5 µl de la desanturalización y se siguen las siguientes condiciones: en un volumen final de 25 µl mezclamos 5 µl de la disolución; 10 mM Tris-ClH pH=8.3; 5 mM NH<sub>4</sub>C; 50 mM KCl; 0.2 mM de cada dNTP; 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Biotools) y 5 µM de los cebadores universales (M13R, M13F, T7 o sp6) que tienen homología con secuencias flanqueantes al sitio de inserción en el plásmido, con el siguiente programa: 94°C 30 s, 52°C 15 s, 72°C 2 min, durante 30 ciclos.

El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE y con aquellos clones que tienen inserto se continúa el

proceso de secuenciación tras un tratamiento con exonucleasa y un ciclo de 37°C 15 min y 85°C 15 min.

### **3.2.9.3. Hibridación tipo DOT-BLOT:**

Las hibridaciones tipo Dot-blot del ADN plasmídico se realizaron siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante de la membrana de nylon utilizada, "Hybon N<sup>+</sup>" (Amersham Biosciences). Para ello, el ADN se desnaturalizó en agua hirviendo durante 10 min, se enfrió en hielo durante 5 min y se diluyó en un volumen de 20XSSC (1XSSC= NaCl 0.15M, citrato sódico 0,015M). Una muestra de aproximadamente 50 ng de cada plásmido fue aplicada a la membrana y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se fijó a la membrana con NaOH 0,2M durante 4 min, y la membrana se lavó con 6XSSC durante 1 min y se dejó secar a temperatura ambiente.

La selección de los clones recombinantes con las secuencias de ADN satélite se realizó hibridando los plásmidos inmovilizados mediante Dot-blot con fragmentos marcados, extraídos a partir de la misma banda del gel que se utilizó para clonar. El marcaje y la hibridación se llevaron a cabo usando el kit "ECL<sup>TM</sup> Gene Detection System" (Amersham Biosciences).

### **3.2.10. Secuenciación.**

Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método de Sanger et al. 1977, utilizando el kit comercial "BigDye Terminator v3.1" (Applied Biosystems). Se llevó a cabo con una cantidad de 300-500 ng/μl de plásmido purificado, y en el caso de amplificadores, escindidos de un gel y posteriormente purificados (como se indica en el apartado 2.2.7.B), y digerido previamente con una exonucleasa. En ambos casos, a ese ADN se le añade, 1μl de BDT, 1 μl de primer universal (M13R, M13F, T7 o sp6, dependiendo del vector utilizado) (3,2 pmol), 4 μl de Buffer y 1 μl de DMSO y agua ultrapura doblemente autoclavada hasta un volumen final de 20 μl. Con el siguiente programa: 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min, durante 25 ciclos.

Para la precipitación de las cadenas obtenidas, a los 20 μl de reacción de secuenciación se le añadieron 63 μl de Etanol Absoluto, 15 μl de agua ultrapura autoclavada y 3 μl de Acetato sódico 5M. Tras vórtex se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se centrifugó 15 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con Etanol al 70%. Tras centrifugación

durante 15 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en estufa a 37°C, posteriormente se resuspendió en 20 µl de Formamida.

Los productos de secuenciación son analizados con un sistema automatizado de láser fluorescente, con un secuenciador “Applied Biosystems ABI 3100 Avant”.

#### **3.2.11. Análisis de las secuencias repetidas.**

El análisis comparativo de las diferentes secuencias de los distintos ADN's repetidos caracterizados en esta Memoria requiere del alineamiento previo de dichas secuencias, para lo que se utilizó el programa informático MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

A nivel intraespecífico, se analizó el porcentaje de identidad entre las secuencias monoméricas clonadas, que resulta de la relación entre posiciones nucleotídicas que son diferentes entre dos secuencias comparadas y el número total de nucleótidos que componen dichas secuencias. La variabilidad total de la familia de ADN satélite en una especie se puede evaluar a través del cálculo de la Diversidad Nucleotídica (Nei., 1987), que mide el número medio de diferencias nucleotídicas entre diferentes secuencias y se calcula como:

$$\Pi = \sum \pi_{ij} / n_c$$

Donde n es el número de secuencias analizadas,  $\pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos que son diferentes entre las secuencias i-ésima y j-ésima y  $n_c$  es el número total de comparaciones realizadas:  $n(n-1) / 2$ .

La divergencia interespecífica se ha calculado siguiendo uno de los métodos propuestos por Strachan et al. (1985) Este método mide la variabilidad media por posición nucleotídica utilizando todas las combinaciones posibles entre los distintos clones de las dos especies que se comparan. Básicamente se calcula de manera similar a como se calcula la diversidad nucleotídica dentro de una especie, es decir, sumando todas las diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias que se comparan y dividiendo dicha suma por el número de comparaciones realizadas.

#### **3.2.12. Análisis filogenético.**

El análisis filogenético se ha realizado mediante el programa informático de inferencia filogenético “MEGA 4” (Tamura et al., 2007).

Para ello, previamente se realizó un alineamiento múltiple mediante los programas "CLUSTAL X" (Thompson et al., 1997) y Geneious (4.8.4) created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>)

A partir de los datos de las secuencias se realizaron distintos métodos de análisis basados en distancias, las cuales han sido estimadas mediante los métodos del vecino más próximo (Neighbor-Joining) y el UPGMA. Para comprobar la fiabilidad de los árboles filogenéticos obtenidos se realizó siempre un análisis mediante el procedimiento de remuestreo (método de bootstrap de Felsenstein 1985), que consiste en la obtención de un cierto número de secuencias aleatorias a partir de la secuencia alineada original y la obtención de un árbol consenso en el que se señala el número de veces que cada grupo monofilético ha aparecido en cada réplica aleatoria.

### **3.2.13. Análisis de homologías en bases de datos.**

Las secuencias caracterizadas procedentes de la hibridación sustractiva realizada en esturiones fueron comparadas con secuencias depositadas en bases de datos en búsqueda de homologías, utilizando el programa Blastx, ofrecido por el servidor GenBank (Benson, et al., 2002) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las distintas secuencias obtenidas de la hibridación sustractiva fueron enviadas a la base de datos, y se fueron clasificando en una tabla Excel (office 2003), siendo agrupadas por homologías. Posteriormente, una vez hechos los distintos grupos, cada conjunto de secuencias con las misma identidad fue alineado con el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) obteniéndose, en la mayoría de los casos, una sola secuencia con varios contings. En otros casos, se obtuvieron identidades conformadas por un solo conting, al que se le denomina singelton.

### **3.2.14. PCR cuantitativa. (PCRq)**

Se procedió a la optimización de las reacciones de PCRs para cada par de primers diseñados, llevándose a cabo tanto en ADN genómico como en cDNA. En esta optimización se busca la presencia, en el gel de agarosa de una sola banda de amplificado con un tamaño determinado de la secuencia de interés.

La PCR a tiempo real representa una forma rápida y fiable para la detección y cuantificación de mRNA de un determinado gen de interés. En nuestro caso, puede ser utilizado para evaluar eficazmente los niveles de expresión de genes en

### 3. Material y Métodos

---

machos y hembras. La sensibilidad de la PCRq permite trabajar con una cantidad mínima de material de partida.

Previamente a la cuantificación, los ensayos de PCR cuantitativa se han realizado utilizando el Termociclador “iQ5 Multicolor Real Time PCR” de Bio-Rad.

Para ello se realizó la siguiente mezcla: 1µg de cDNA, 1 µl de cada oligonucleótido R y F diseñado específicamente para cada secuencia (10 µM) (**TABLA 7**), 12.5 µl de “SYBR® Green PCR master mix” de Bio-Rad y agua libre de RNasas hasta completar un volumen final de 25µl.

Las condiciones del ciclo fueron 5 min de desnaturalización a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de 1 min a 94 °C y 1 min a la temperatura annealing requerida para cada oligonucleótido (**TABLA 7**).

Como control de la expresión del gen (gen de referencia) se ha utilizado una pareja de primers del gen de la β-actina que amplifica un fragmento de 216pb (β-actina F-R) estos primers, se usaron para amplificar dicho gen en la especie de esturión *A. transmontanus* (Osachoff y Skirrow., 2006).

La cuantificación de la expresión diferencial entre machos y hembras se ha llevado a cabo mediante el método 2 delta-delta Ct ( $2\Delta\Delta Ct$ ), en el que se comparan directamente los valores de Ct del gen testado y el de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra y posteriormente se comparan los  $\Delta Ct$  de las muestras objeto de estudio con respecto a la muestra control (Pfaffl., 2001, Livak y Schmittgen., 2001).

Para comprobar si las diferencias de expresión observadas eran o no significativas, para cada gen, aplicamos un análisis de varianza de un factor (Stat/ANOVA/One-Way) seguido de un análisis MSD (Desviación Cuadrática Media) posthoc para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $P < 0.01$  y para  $P < 0.05$ .

PRIMERS	SECUENCIA(5´-3´)	TAMAÑO AMPLIFICADO (pb)	TEMPERATURA DE UNIÓN °C
ZP3.2-F	ATC GTC CTG TTT TCA CGA TGG	221	62
AsZP3.2-RTR	TGC AGA GTG TTG TAG CTG CC		
ZP3.3-F	GAC ATA ACT GTT TTG GAA G	235	68
AsZP3.3-RTR	ACC ACC ATG TTA TTA CCG GC		
FERRITINA-F	ATG GAG TCT CAG ATT CGC CA	800	57.6
FERRITINA-R	TTA GCT GCT GCT CTC CAA GGT		
CALCIUMBINDING-F	GTT TGA CGT CAG CGC AGT G	200	60
CALCIUMBINDING-R	CCC GTC CTT ATT CTC ATC CA		
β-ACTINA-F	TTG CCA TCC AGG CTG TGC T	216	64
β-ACTINA-R	TCT CGG CTG TGG TGG TGA A		

**TABLA 7:** En la tabla se muestran los primers diseñados para la cuantificación diferencial entre machos y hembras, junto con las condiciones de temperatura de unión de cada uno y el tamaño esperado de amplificado.



## **4. RESULTADOS**



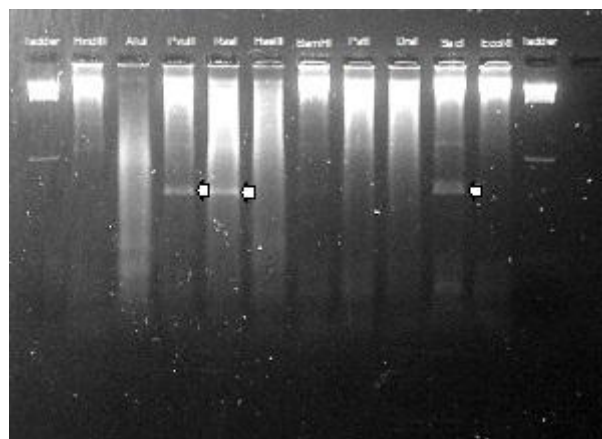


#### 4.1. Aislamiento y caracterización de ADN repetidos en peces planos.

##### 4.1.1. Familia de ADN satélite *SacI* en el Fletan atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).

###### 4.1.1.1. Aislamiento y caracterización del satélite *SacI*.

Tras la digestión del ADN genómico del fletan atlántico con una batería de enzimas de restricción (*Hind* III, *Alu*I, *Pvu*II, *Rsa*I, *Hae*III, *Bam*HI, *Pst*I, *Dra*I, *Sac*I y *Eco*RI) y posterior electroforesis, se generaron bandas intensas visibles de aproximadamente 350 pares de bases (pb) en el gel de agarosa en las calles correspondientes a las enzimas *Sac*I, *Rsa*I y *Pvu*II (**FIGURA 7**), indicando la posible presencia de unidades monoméricas de ADN altamente repetido. Este ADN genómico se transfirió a una membrana de nylon mediante la técnica de Southern-blot. Para determinar si estas bandas correspondían a una o a varias familias de ADN satélite, 10 µg de ADN genómico de fletan fue digerido con la enzima *Sac*I, con el fin de aislar la banda de unos 350pb, mediante su escisión y su purificación a partir del gel. Una alícuota del fragmento purificado, fue usada como sonda en una hibridación sobre la membrana de nylon conteniendo el ADN digerido con la batería de enzimas.



**FIGURA 7:** Electroforesis correspondiente a la digestión del ADN genómico del fletan con una batería de enzimas de restricción. En la figura se señalan mediante flechas blancas, las bandas correspondientes a las enzimas *Sac*I, *Rsa*I y *Pvu*II visibles de un tamaño alrededor de los 350 pares de bases.

La hibridación tipo Southern mostró el mismo patrón para las tres calles correspondientes a las enzimas que presentaban bandas visibles (datos no

#### 4. Resultados

mostrados), indicando la existencia de una única familia de ADN satélite (que fue denominada familia Sacl) cuya unidad de repetición, por tanto, tendría diana para estas tres enzimas (Sacl, Rsal y PvuII). Así, y para llevar a cabo la caracterización de esta familia de ADN satélite, los fragmentos generados con la enzima Sacl, correspondiente a las unidades monoméricas, fueron ligados al vector de clonación pUC18. Se seleccionaron cinco plásmidos recombinantes (Sacl-2, Sacl-9, Sacl-12, Sacl-13, Sacl-32) para su secuenciación. La secuencia de estos clones se muestran en la **FIGURA 8** así como la secuencia consenso que fue obtenida a través del alineamiento múltiple.

SaclI-2	CTCTCCCCTG	CGGCCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	AGTTCTGCCA	GTTACAGTTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGTCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	100
SaclI-13	CTCTCCCCTG	CGGCCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	ACTTCTGCCA	GTTACAGGTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGGCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	
SaclI-12	CTCTCCCCTG	CGGGCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	AGTTCTGCCA	GTTACAGGTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGGCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	
SaclI-9	CTCTCCCCTG	CGGCCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	AGTTCTGCCA	GTTACAGGTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGGCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	
SaclI-32	CTCTCCCCTG	TGGCCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	AGTTCTGCCA	GTTACAGGTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGGCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	
SECCONS	CTCTCCCCTG	TGGCCCTTGG	TGGCTCAGCC	CGGTTTTCAA	AGTTCTGCCA	GTTACAGGTC	CAAAGATGAT	GCCAGAGGCC	AGTTGATCCT	GAAATCCACA	
SaclI-2	CAGGTGCAGT	TTGGGCCCCG	AACCACCCAG	GGACCCCAT	TTGCAGCAG	AGCTTAAGCA	CGGCACCCAG	GAGGTGCATG	GAAAACTGG	TGGCTC-TAC	200
SaclI-13	CAGGTGCAGT	TTGGGCCCCG	AATCACCCAG	GGACCCCAGA	TTGCAGCAG	AGCTTAAGCC	CTGCACCCAG	NATGTGCATG	AAAAATCTGG	TGGCTC-TNC	
SaclI-12	CAGGTGCAGT	TCGGGCCCCG	AACCATGCAG	GGACCCCAGA	TTGCAGCAG	AGCTTAAGCC	CGGCCCCAG	NATGTGCATG	AAAAATCTGG	TGGCTC-TNC	
SaclI-9	CAGGTGCAGT	TCGGGCCCCG	AACCATGCAG	GGGCCCCAGA	TTGCAGCAT	AGCTTAAGCC	CGGCACCCAG	GATGTGCATA	AAAAATCTGG	TGGCTC-TAC	
SaclI-32	CAGGTGCAGT	TCGGGCCCCG	AACCATGCAG	GGGCCCCAGA	TTGCAGCAG	AGCTTAAGCC	CGGCACCCAG	GATGTGCATG	AAACATCTGG	TCGCTC-TAC	
SECCONS	CAGGTGCAGT	TCGGGCCCCG	AACCATGCAG	GGGCCCCAGA	TTGCAGCAG	AGCTTAAGCC	CGGCACACAG	GATGTGCATG	AAACATCTGG	TCGCTC-TAC	
SaclI-2	CTCAGCCAGA	AGTAAAAAA	ACACCTCT--	AACTTTGTG	TNANANGANG	ACTGCACAGA	CAGCCTGTAT	TTNTTNN-NC	NTTGAANA	ANNACTGTCT	300
SaclI-13	CTCAACCAGA	AGTAAA-AAA	ACACCTCTCA	ACCTTTTATC	TCANAAGCTG	ACTGCACAGA	GGGCCTGTAC	TGAATNNTCT	ACTGAAAAAN	NNNACTGTCT	
SaclI-12	CTCAACCAGA	AGTAAA-AAA	ACACCTCT--	ANCTTTTGTG	TCANAAGNTG	ACTGCACAGA	GGGCCTGTAC	TGNNTCN-TC	ACTGAAAAAN	GNCACTGTNT	
SaclI-9	CTCAACCAGA	AGTAAA-AA	ACACCTCT--	AACTTTGTG	TCAGNTGCTG	ACTGCACAGG	CAGCCTGTAT	TTTNTCC-CC	ACTGAAAAAG	NNCACTGTCT	
SaclI-32	CTCAACCAGA	AGTAAA-AAA	ACACCTCT--	AACTTTGTG	TCAGCTGTCTG	ACTGCACAGA	GGGCCTGTAC	TGAATGG-AC	ACTGAAAAAG	GCTACTGTCT	
SECCONS	CTCAACCAGA	AGTAAACAAA	ACACCTCT--	AACTTTGTG	TCAGCTGTCTG	ACTGCACAGA	GGGCCTGTAC	TGAATGG-AC	ACTGAAAAAG	GCTACTGTCT	
SaclI-2	GGGCCCC-TA	GCAGCGAGAG	GTCTGAAATT	TNGA----							
SaclI-13	GCGCCCCCA	GCAGCNAGAG	GTCTGAAATT	-TGGA----							
SaclI-12	GGGCCCCNN	GCAGCGAGAG	GTCTGAAATT	NNGGA----							
SaclI-9	GGGCCCCNA	GCAGCGAGAG	GTCTGAAATN	TGG-----							
SaclI-32	GGGCCCCTTA	GCACCGAGAG	GTCTGAAATT	TTGGATGAG							
SECCONS	GGGCCCCTTA	GCACCGAGAG	GTCTGAAATT	TTGGATGAG							

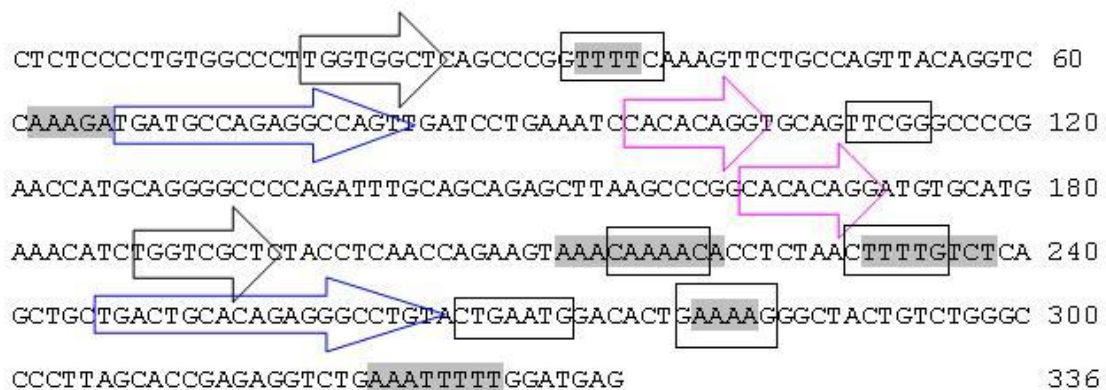
**FIGURA 8:** Secuencias de varias unidades monoméricas correspondientes a la familia de ADN Sacl del genoma del fletan. Como en el resto de tablas SECCONS: secuencia consenso y (-) corresponde con ausencia de nucleótido. Sobre el alineamiento se ha señalado mediante cajas las dianas que presentan para Rsal (en verde) y para PvuII (en azul).

Del análisis de las secuencias de los clones caracterizados, y del alineamiento de éstos, se deduce una longitud monomérica que varía entre 330 y 337 pb. Cuando las secuencias son comparadas entre sí, se puede observar que presentan un alto grado de homología, entre el 99,8% y el 100% (**TABLA 8**), siendo la diversidad nucleotídica media entre los clones de 0,113.

	Sacl-2	Sacl-9	Sacl-12	Sacl-13	Sacl-32
Sacl-2		99,8	99,8	99,8	99,8
Sacl-9			99,8	99,8	99,8
Sacl-12				99,9	99,8
Sacl-13					99,8
Sacl-32					

**TABLA 8:** Valores de identidad entre los clones correspondiente a diferentes unidades monoméricas de la familia de ADN satélite centromérico Sacl del fletan atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).

La secuencia de estos clones es rica en AT (56%), encontrándose tramos consecutivos de estos nucleótidos. Además, hemos encontrado diversos motivos que se repiten de forma directa, los cuales se muestran en la **FIGURA 9**. También, hemos observado la presencia de motivos más o menos conservados en otros ADN satélites con localización centromérica. Estas secuencias, resaltadas en le **FIGURA 9**, son similares a motivos CENP-B.

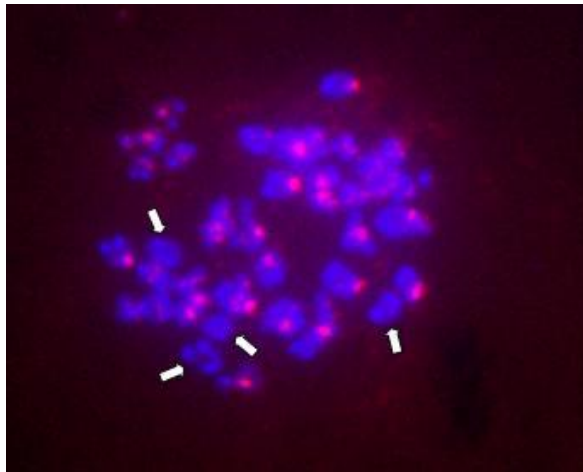


**FIGURA 9:** Secuencia consenso de la unidad monomérica del ADN satélite Sacl en la que se señalan los motivos repetidos de forma directa (flechas) y los tramos ricos en A y T consecutivos (sombreado). En las cajas se resaltan los motivos centroméricos encontrados. Este tipo de motivo también se ha encontrado en una familia de ADN satélite de otra especie de pez plano como la acedía (De la Herrán et al., 2008).

#### 4.1.1.2. Localización cromosómica del satélite Sacl en el fletan atlántico.

En este sentido, la existencia de motivos centroméricos nos puede dar una idea de su localización. Así, y para comprobar y corroborar su posible posición

centromérica, se realizó una hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre cromosomas metafásicos de fletan, utilizando como sonda la unidad monomérica de unos de los clones (Sacl-32). En esta hibridación, mostrada en la **FIGURA 10**, se observa su localización a nivel centromérico, presentando señales de hibridación en la constricción primaria de la mayoría de los cromosomas.



**FIGURA 10:** Hibridación *in situ* sobre cromosomas metafásicos de *H. hippoglossus* usando como sonda la unidad monomérica del clon Sacl-32. La señal de hibridación aparece en el centrómero de la mayoría de los cromosomas, indicándose con flechas los cromosomas que carecen de ella.

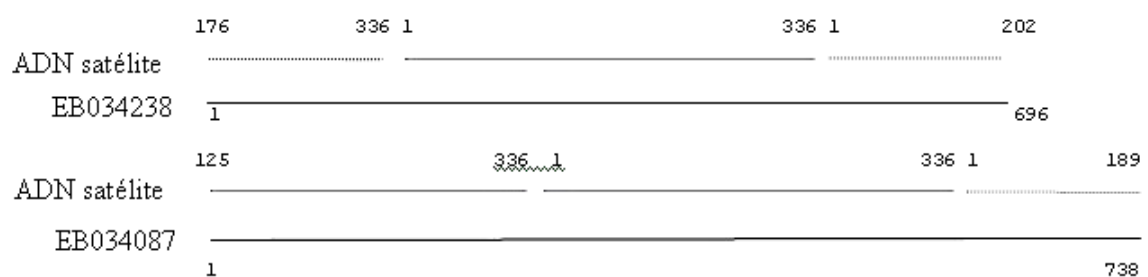
En cuanto a su conservación, y para comprobar su presencia en los genomas de otras especies de peces planos, se realizaron hibridaciones tipo Southern utilizando como sonda la unidad monomérica del ADN satélite Sacl del fletan. Así, cuando se realizaron las hibridaciones sobre ADN genómico de *Solea senegalensis*, *Solea lascaris*, *D. cuneata* y *Scophthalmus maximus* no aparecieron señales ni en alta ni en baja astringencia (datos no mostrados).

Adicionalmente, la secuencia de la unidad de repetición de esta familia de ADN satélite Sacl fue enviada a la base de datos EMBL/ GenBank en búsqueda de homologías. No se encontró similitud con ninguna secuencia depositada en estas bases.

Por otro lado, y debido a que en algunos casos se han descrito ADNs satélites centroméricos que son transcritos a pequeños ARN (Lee H. Wong et al., 2007; Volpe et al., 2003), las secuencias se enviaron en búsqueda de homologías con una bases de datos de ESTs (bases de datos construidas y bajo protección del proyecto

Pleurogene) del propio fletan. Se encontraron identidades con dos secuencias de esta base de datos (Números de acceso: EB034238 y EB034087).

Tras el alineamiento, se puede observar como ambas secuencias se componen de un monómero completo y dos incompletos de la familia Sacl (**FIGURA 11**) con una homología del 96 % con el AN EB034238 y un E-value 8E-71, y una homología del 91% y un E-value 5E-68 con el AN EB034087 (Datos tomados de la base de datos de EMBL/ GenBank).

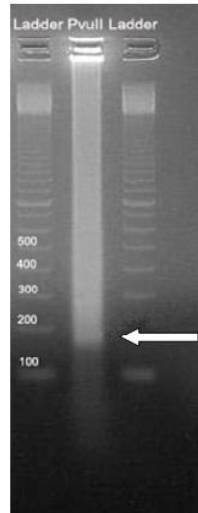


**FIGURA 11:** Esquema de regiones de homologías entre la unidad de repetición del ADN satélite y las secuencias de ESTs del fletan, con números de acceso EB034238 y EB034087.

#### 4.1.2. Familia de ADN satélite Pvull en el Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

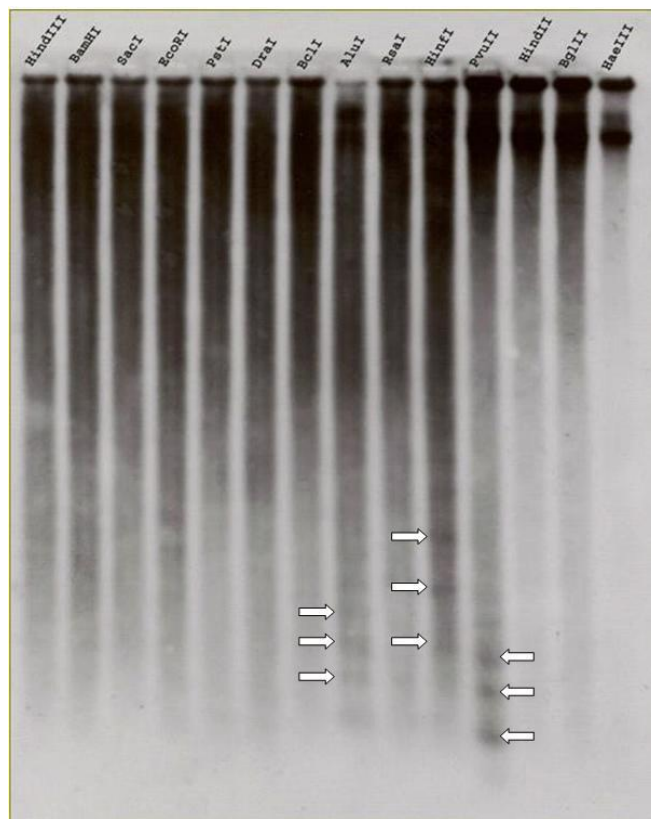
##### 4.1.2.1. Aislamiento y caracterización del satélite Pvull.

Al igual que en el fletan, el ADN genómico del lenguado se digirió con una batería de enzimas de restricción (hasta 20 enzimas fueron probadas). Sin embargo, en ningún caso se pudo observar banda visible en el gel de agarosa que indicara la presencia de una familia de secuencias repetidas. Por ello, se intentó aislar ADN repetido del genoma del lenguado mediante la técnica del self-priming PCR (Buntjer and Lenstra., 1998). De esta forma, tras la amplificación y la digestión del ADN, se obtuvo una banda de aproximadamente 200 pares de bases fácilmente distinguibles en gel de agarosa correspondiente al enzima Pvull (**FIGURA 12**).



**FIGURA 12:** Electroforesis del producto obtenido mediante la técnica de Self-priming (auto-amplificación y posterior digestión) a partir del ADN genómico de *S. senegalensis*. Se observa una banda más intensa de un tamaño aproximado de 200 pares de bases correspondiente a la enzima PvuII (Flecha blanca).

Esta banda fue escindida del gel y purificada. Una alícuota se utilizó como sonda para realizar una hibridación tipo Southern sobre una membrana con ADN de lenguado senegalés cortado con diferentes enzimas de restricción. El patrón de hibridación obtenido para PvuII, que se muestra en la **FIGURA 13**, es el típico patrón en escalera característico de un ADN satélite demostrando, por tanto, que se había aislado una familia de este tipo de secuencias repetidas en el lenguado. En esta misma hibridación se puede comprobar que este mismo patrón se produce tras la digestión con otras enzimas tales como HinfI y AluI debido a que este fragmento, como observa en la **FIGURA 14**, presenta dianas para estas enzimas.



**FIGURA 13:** Hibridación tipo Southern-blot utilizando como sonda los fragmentos de la banda de 200 pares de bases (unidad monomérica de la familia PvuII de ADN satélite de *S. senegalensis*) sobre ADN genómico del propio lenguado digerido con una batería de enzimas de restricción. En la calle correspondiente al enzima PvuII, se observa el típico patrón en escalera de un ADN satélite, señalado mediante flechas.

Las bandas pertenecientes a PvuII fueron escindidas, purificadas, clonadas y, 6 de los plásmidos recombinantes fueron secuenciados. Las secuencias de estos monómeros, así como la secuencia consenso, se muestran en la **FIGURA 14**.



#### 4. Resultados

```

PvuII-2  GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAATA GTGAAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAA-G TATAGGATTT AAGATGTTAA CTTCATTTGT 100
PvuII-8  GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAATA GTGAAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAA-G TATAGGATTT AAGATGTTAA CTTCATTTGT
PvuII-15 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCT--CA GTGAAAAGAAA AAAAAATCA AACACTGAGG GTACGGTTCC CATAACTTTT AAGAAGATAA CTTCATTTGT
PvuII-18 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCTTTTCA GTGAAAAGAAA GCA-AAATCA AACACTGAGG GTACAGTT-C CATAACTTTT AAGATGTTAA CTTCATTTGT
PvuII-26 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCT--CA GTGAAAAGAAA AAAAAATCA AACACTGAGG GTACAGTTT CATAACTTTT AAGAAGATAA CTTCATTTGT
PvuII-41 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAA-G TATAGGATTT AAGATGTTAA CTTCATTTGT
SECCONS GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAACG TATAGGTTTT AAGATGTTAA CTTCATTTGT

PvuII-2  AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAAA 178
PvuII-8  AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAAA
PvuII-15 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAA-A
PvuII-18 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAAA
PvuII-26 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAA-A
PvuII-41 AGTTTTATGT AACGAGAGCA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACTAAAC-GC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAAA
SECCONS AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAAA

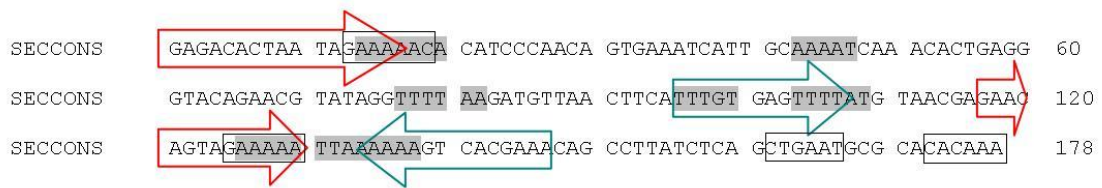
```

**FIGURA 14:** Secuencia de seis unidades monoméricas y la secuencia consenso correspondiente a la familia PvuII en el genoma del lenguado senegalés. Sobre la que se han señalado las dianas que presentan para AluI (en azul) y para HinfI (en verde)

El ADN satélite PvuII aislado del genoma del lenguado presenta unidades monoméricas entre 177 y 178 pares de bases de longitud. Los monómeros presentan un alto contenido en AT con una media del 66% con largos tramos de A y/o T consecutivas. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología media del 92,6% (TABLA 9).

	PvuII-2	PvuII-8	PvuII-15	PvuII-18	PvuII-26	PvuII-41
PvuII-2		100	88,2	89,8	89,3	95,5
PvuII-8			88,2	89,8	89,3	95,5
PvuII-15				94,4	98,3	88,2
PvuII-18					95,5	89,8
PvuII-26						97,2
PvuII-41						

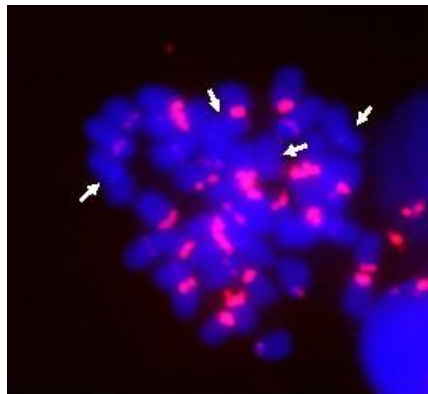
**TABLA 9:** Valores de identidad entre los monómeros obtenidos de la familia del ADN satélite centromérico PvuII en el lenguado senegalés, con una homología media del 92,6%.



**FIGURA 15:** Secuencia consenso de la unidad monomérica del ADN satélite PvuII del lenguado senegalés en la que se señalan los motivos repetidos de forma directa (flechas) y los tramos ricos en A y T consecutivas (sombreado). En las cajas se resaltan los motivos centroméricos encontrados.

#### 4.1.2.2. Localización cromosómica del satélite PvuII en el lenguado senegalés.

Un análisis exhaustivo de su secuencia, pone de manifiesto la existencia de repeticiones tanto directas como invertidas así como la presencia de varios motivos centroméricos parciales, que se han localizado en las secuencias de satélites centroméricos de otros peces (R. de la Herrán et al., 2008, Garrido-ramos et al., 1995) (**FIGURA 15**) lo que nos da idea de cual es su localización cromosómica. Para comprobar esto realizamos una hibridación *in situ* fluorescente cuyo resultado se muestra en la **FIGURA 16**, en la cual se puede observa la disposición centromérica en la mayoría de los cromosomas del lenguado senegalés de este ADN satélite PvuII.

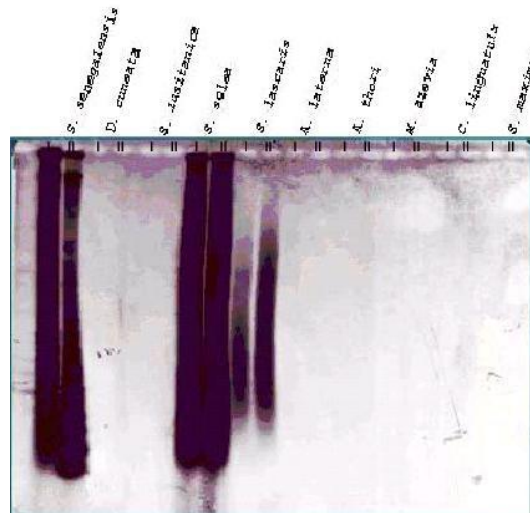


**FIGURA 16:** Hibridación *in situ* sobre cromosomas de *S. senegalensis* teñidos con DAPI y la sonda (banda cortada y purificada) marcada con biotina. Las flechas señalan cromosomas en los cuales no aparecen señales de hibridación.

Por otro lado, se analizó la conservación del ADN satélite PvuII del lenguado en otras especies pertenecientes al orden Pleuronectiformes. Para ello, se llevaron a cabo hibridaciones tipo Southern utilizando como sonda la unidad monomérica de

#### 4. Resultados

este ADN satélite sobre ADN genómico de diferentes especies de peces planos planos digeridos con PvuII y RsaI (*S. senegalensis*, *D. cuneata*, *S. lusitanica*, *S. solea*, *S. lascaris*, *A. laterna*, *A. thori*, *M. azevíá*, *C. linguatula*, *S. maximus*). (**FIGURA 17**).



**FIGURA 17:** Hibridación tipo Southern-blot de la banda cortada, purificada y marcada (unidad monomérica de la familia PvuII de ADN satélite de lenguado senegalés) sobre ADN genómico digerido con PvuII (II) y RsaI (I) de diferentes especies de peces planos (*S. senegalensis*, *D. cuneata*, *S. lusitanica*, *S. solea*, *S. lascaris*, *A. laterna*, *A. thori*, *M. azevíá*, *C. linguatula*, *S. maximus*) se observan señales de hibridación en las calles correspondientes a las especies *S. solea*, *S. lascaris* y el propio *S. senegalensis* usado como control positivo

Como se observa en la **FIGURA 17**, aparecieron señales de hibridación en las calles correspondientes a las especies *Solea solea*, *S. lascaris* y el propio lenguado senegalés (usado como control positivo), poniendo de manifiesto la existencia de esta familia de ADN satélite PvuII en el genoma de estas especies.

Para caracterizar esta secuencia y poder amplificarla en dichas especies, se procedió al diseño de primers sobre la propia secuencia del satélite en *S. senegalensis*. (**FIGURA 18**).

← PvuII-R                      PvuII-F →

```

PvuII-2  GAGACTAA TAGAAAACA CATCCCAATA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAA-G TATAGGATTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT 100
PvuII-8  GAGACTAA TAGAAAACA CATCCCAATA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAA-G TATAGGATTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT
PvuII-15 GAGACTAA TAGAAAACA CATCCT--CA GTGAAAGAAA AAAAAATCA AACACTGAGG GTACGTTCC CATAACTTTT AAGAAGATAA CTTCAATTTGT
PvuII-18 GAGACTAA TAGAAAACA CATCTTTTCA GTGAAAGAAA GCA-AAATCA AACACTGAGG GTACAGTT-C CATAACTTTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT
PvuII-26 GAGACTAA TAGAAAACA CATCCT--CA GTGAAAGAAA AGAAAAATCA AACACTGAGG GTACAGTTTC CATAACTTTT AAGAAGATAA CTTCAATTTGT
PvuII-41 GAGACTAA TAGAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AAGACTGAGG GTACAGAA-G TATAGATTTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT
SECCONS GAGACTAA TAGAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACAGAACG TATAGGTTTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT

PvuII-2  AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA 178
PvuII-8  AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA
PvuII-15 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAA-A
PvuII-18 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA
PvuII-26 AGTTTTATGT AACGAGA-CA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAA-A
PvuII-41 AGTTTTATGT AACGAGGCA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACTAAC-GC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA
SECCONS AGTTTTATGT AACGAGAACA GTAGAAAAAT TAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA

```

**PvuII-F: 5' - ACATCCAGCAGTGAATTCAT -3'**  
**PvuII-R: 5' - TTTTCTATTAGTGTCTC -3'**

**FIGURA 18:** En la parte superior de la imagen se muestra la secuencia del monómero del satélite PvuII de *S. senegalensis* sobre la que se han diseñado los primers de PvuII. Y debajo, la pareja de primers diseñados para la amplificación de esta secuencia en otras peces.

Con estos primers se amplificó este ADN satélite en las especies *S. solea* y *S. lascaris*. Sin embargo, en otras especies de peces planos como *M. azevia*, y *D. cuneata*. no se obtuvieron amplificadas, lo que confirma la ausencia de este ADN repetido en el genoma de estas especies.

En las especies en las que se fue posible su amplificación, los fragmentos correspondientes a las unidades de repetición de PvuII fueron clonados. En la especie *S. lascaris* se secuenciaron seis clones. Las secuencias de los monómeros presentaron tamaños de longitud entre 151 y 163 pb (**FIGURA 19**) y una riqueza de AT de 65,7%. Éstas secuencias fueron alienadas y presentaron una homología media de 91,5% (**TABLA 10**).

#### 4. Resultados

```

PvuII-SL-11 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CATGAGGGT ACAGAACTTA -ATCTTTTAA GATGTAACT TCATTTGTGA 100
PvuII-SL-28 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CAATGAAGGC ACATTA-GTA TATCTTATAA GATGTAACT TCATTTGTGA
PvuII-SL-34 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CAGTGAAGTGT ACAGAACTTA -ATCTTTTAA GATGTAACT TCATTTGTGA
PvuII-SL-41 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CACTGAGGGT ACATAA-GTA TATCCTGTAA GATGTAACT TCATTTGTGA
PvuII-SL-48 GAGACCTCAT AGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATTA-- TAAAATCAA CACTGACGGT ACAGAA-GTA TATCTTATAT GATGTAACT TCATTTGTGA
PvuII-SL-49 GAGACACTA- TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CACTGAGGGT ACAGAAAGTA TAACTTT-AA GATGT-AACT CA--TTGTGA
SECCONS GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCCAACA GTGAAATCAT TAAAATCAA CACTGAGGGT ACAGAA-GTA TATCTTTTAA GATGTAACT TCATTTGTGA

PvuII-SL-11 GA-CAGTATC AAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCTTA TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA 163
PvuII-SL-28 GA-CAGTATC AAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCTTA TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA
PvuII-SL-34 GA-CAGTATC AAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCTTA TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA
PvuII-SL-41 GAACAGTATC GAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCTTA TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA
PvuII-SL-48 GA-CAGATC GAGAAACA AAAAGTCACT AAACGCCTT TCCCGCTGA ATGCGCACAC AAA
PvuII-SL-49 GA-CAGTATC AAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCT-A TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA
SECCONS GA-CAGTATC AAACACT-GA AAAAGTCACT AAACGCCTTA TCTCAGCTGA ATGCGCACAC AAA

```

**FIGURA 19:** Alineamiento de la secuencia del satélite PvuII en varios clones junto a la secuencia consenso, obtenidos como resultado de la amplificación del satélite utilizando los primers en la especie *S. lascaris*, escisión purificación, clonación y secuenciación de dicho amplificado.

	PvuII-SL-11	PvuII-SL-28	PvuII-SL-34	PvuII-SL-41	PvuII-SL-48	PvuII-SL -49
PvuII-SL-11		95,0	98,8	92,5	86,3	93,0
PvuII-SL-28			93,8	93,7	83,8	91,3
PvuII-SL-34				91,9	83,8	91,3
PvuII-SL-41					83,3	90,7
PvuII-SL-48						83,3
PvuII-SL -49						

**TABLA 10:** Tabla que presenta las homologías entre las distintas secuencias de los monómeros analizados para PvuII en *S. lascaris*, siendo la homología media de 90,1%.

Con respecto a *S. solea*, se secuenciaron también seis clones que presentaron longitudes entre 173 y 176 pb (**FIGURA 20**) con una riqueza en AT del 67,9%. Tras el alineamiento de las unidades monoméricas caracterizadas, se pudo comprobar la existencia de una homología media de 85,7% (**TABLA 11**).

```

PvuII-SS-14 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAAACA GTGAAATCGT TGCAAA-TCA AACACTAAGG GTACAGAAGT ATATATTTTA AGATGTTTAC TTCGTTTGTG 100
PvuII-SS-15 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATGCAAACA GTGAAATCAT TGCAAAA-CA AACACTGAGG GTACAGAAGT ATATCTTATA AGTTGTTTAC TTCATTTTGTG
PvuII-SS-21 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACATAAGT ATATCTTATA AGATGTTTAAAC TTCATTTTGTG
PvuII-SS-31 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAA-CA GTGAAATTTAT TGAAAAATCA GACACTGACG GCATATAACT ATATCTTTTA AGATGTTTAAAC TTCATTTTGTG
PvuII-SS-44 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACAGTGAGT GTACAGAAGT AAATCTTTTA AGATGTTTAAAC TTCATTTTGTG
PvuII-SS-45 GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAAACA GTGAACTCTT TGCAAA-TCA AACACTGAGG GTACAGAAGT ATGTC--ATA AGATGTTTAAAC TTCATTTTGTG
SECCONS      GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAGG GTACATAAGT ATATCTTATA AGATGTTTAAAC TTCATTTTGTG

PvuII-SS-14 AGGTTGATGT TATGGGACAG TAGAGAAAGG ATAAAAATCC GAAACAGGC TTATCTCAGA GTATGGCGCA CTCATG 176
PvuII-SS-15 AGGTTTATAT TATGGGACAG TAGAAAAATG AAAAAA-TCC GAAACAGCC TTATCTCAGC TGAATGCGCA CAAAAA
PvuII-SS-21 AGTTTTATGT TATGGGACAC CAGAAAAATT AAAAAATCC TTAAGAGCC TTATCTCAGC TGAATGA-CA CACAAA
PvuII-SS-31 AGTTTTATGT TATGGGACAG CAGAAAAATT AAAAAATCC GAAACAGCC TTATCTCAGC GTTTTGGCGCA CACAAA
PvuII-SS-44 AGATTAAGGT TATGGGACAG TAGAAAAATG AAAAAATCC GAAACAGCA TTATCAAAGC TGAATGAGCC CACAAA
PvuII-SS-45 AAGTATATAT TATGGGACAG TAGAAAAAG AAAAAATCC GAAACAGCC TTATCTCAGC ATAATGCGCA CACAAA
SECCONS      AGTTTTATGT TATGGGACAC CAGAAAAATT AAAAAATCC TTAAGAGCC TTATCTCAGC TGAATGA-CA CACAAA

```

**FIGURA 20:** Alineamiento de las secuencias del satélite PvuII junto la secuencia consenso, de la especie *S. solea*, que presenta un tamaño de 176pb.

	PvuII-SS-14	PvuII-SS-15	PvuII-SS-21	PvuII-SS-31	PvuII-SS-44	PvuII-SS-45
PvuII-SS-14		86,8	82,5	83,4	80,7	83,3
PvuII-SS-15			89,8	86,4	87,5	89,7
PvuII-SS-21				88,1	86,9	86,9
PvuII-SS-31					84,0	84,1
PvuII-SS-44						84,4
PvuII-SS-45						

**TABLA 11:** Tabla de homologías del satélite PvuII, en la especie *S. solea*, en la que se muestran las distintas homologías entre los clones secuenciados. Entre todos, presentan una homología media del 85,7%.

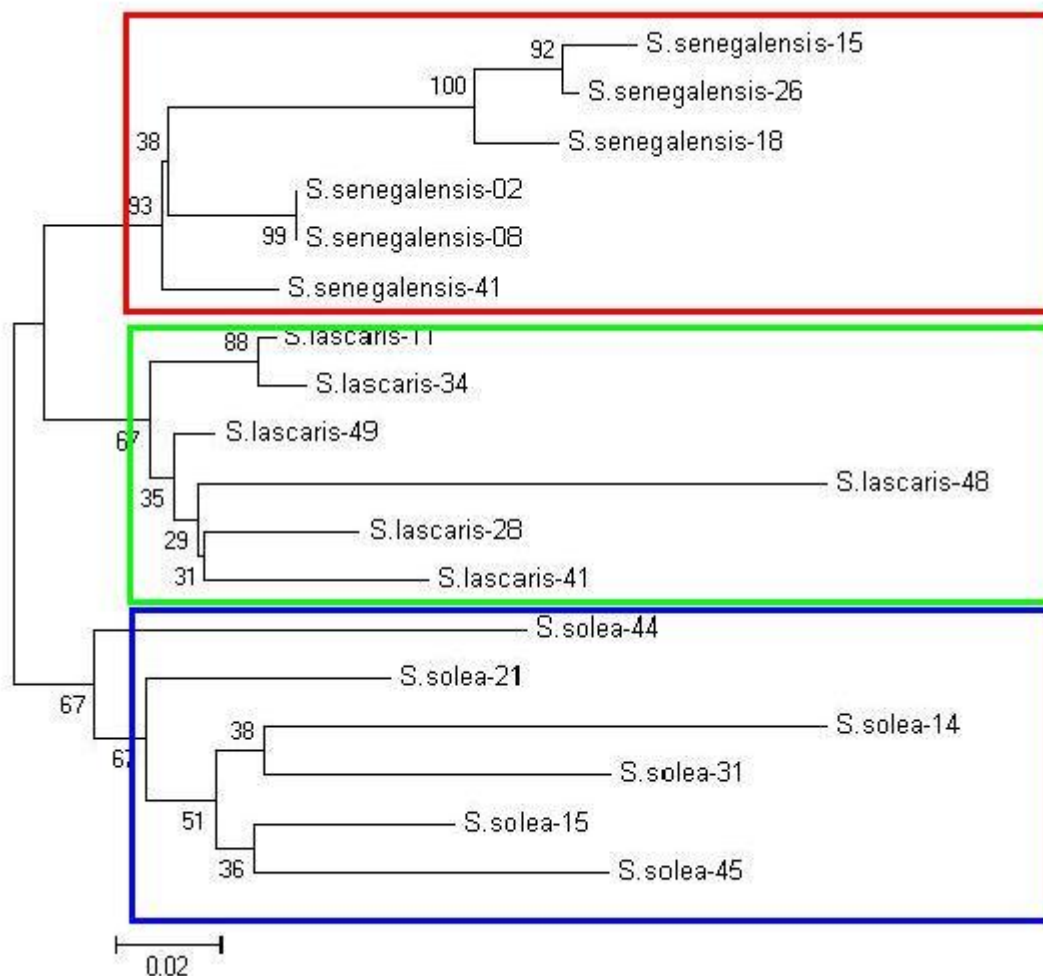
#### 4.1.2.3. Análisis de la divergencia interespecífica de la familia PvuII.

Para llevar a cabo el análisis de la divergencia interespecífica, se alinearon todas las secuencias monoméricas PvuII de las tres especies en las que se habían caracterizado esta familia de ADN satélite. El estudio se llevó a cabo midiendo la variabilidad media por posición nucleotídica en las comparaciones entre todos los clones de las tres especies (**Anexo I**). El alineamiento múltiple, a su vez, se utilizó para un estudio de las relaciones filogenéticas entre todas las secuencias caracterizadas. Para ello, se utilizaron los métodos de inferencia filogenética UPGMA y del vecino más próximo, basados en matrices de distancia. Ésta fueron calculadas mediante el paquete informático MEGA3, y tras aplicar tanto el método UPGMA como el método del vecino más próximo, las unidades monoméricas de una misma especie aparecieron más íntimamente relacionadas entre ellas que con respecto a las de las otras especies, es decir, son agrupadas por afinidad taxonómica (**FIGURA 21**). Esta

#### 4. Resultados

asociación es reflejo de que la variabilidad intraespecífica es siempre menor que la divergencia interespecífica en todos los casos, es decir, la familia de ADN repetido Pvull presenta evolución concertada. Así, y utilizando este ADN satélite como marcador filogenético, se puede observar como las secuencias de *S. senegalensis* se agrupan con las de *S. lascaris* y con las de la especie *S. solea*.

La variabilidad intraespecífica en *S. senegalensis* es de 0,08, la de *S. lascaris* es de 0,11 y la de *S. solea* es de 0,15.



**FIGURA 21:** Árbol filogenético realizado en el género Solea, utilizando el satélite Pvull como marcador, que permitió realizar un análisis filogenético mediante los métodos del vecino más próximo (Neighbor-Joining) y el UPGMA. En el árbol se observa como las diferentes muestras se separan y se agrupan según la especie a la que pertenecen.

Mediante su alineamiento, se llevó a cabo un estudio comparativo entre las secuencias consenso que corresponden al monómero del satélite Pvull, de las tres especies que conforman este grupo (**FIGURA 22**). Se realizó el cálculo de las homologías interespecíficas, obteniéndose una homología media del 81,5%. *S. senegalensis* con *S. lascaris* presenta una homología del 79,8%, y con *S. solea* presenta una homología del 84%. *S. lascaris* y *S. solea*, presentan una homología del monómero de Pvull del 80,7% (**TABLA 12**).

```

SSE GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCTAACA GTGAAAGAAA AGAAAAATCA AACACTGAGG GTACAGTTTC CATAACTTTT AAGAAGATAA CTTCAATTTGT 100
SS  GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAACA GTGAAATCAT TGCAAAATCA AACACTGAAG GTACA-TAAG TATATCTTAT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT
SL  GAGACACTAA TAGAAAAACA CATCCAACA GTGAAATCAT T--AAAATCA AACACTGAGG GTACA-GAAG TATATCTTTT AAGATGTTAA CTTCAATTTGT

SSE GAGTTTTATG TAACGAGACA GTAGAAAAAT TAAAAAAGTC ACGAAACAGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA 177
SS  GAGTTTTATG TTATGGGACA CCAGAAAAAT TAAAAAATC CTTAAAAGC CTTATCTCAG CTGAATG-AC ACACAAA
SL  GAG----ACA GTATCAAACA CTGAAAAAGT CA----- --CTAAACGC CTTATCTCAG CTGAATGCGC ACACAAA

```

**FIGURA 22:** Alineamiento de las secuencias consenso de las distintas especies del género *Solea*, entre todas presentan una homología media interespecífica del 81,5%.

	<i>S. senegalensis</i>	<i>S. solea</i>	<i>S. lascaris</i>
<i>S. senegalensis</i>		84,0	79,8
<i>S. solea</i>			80,7
<i>S. lascaris</i>			

**TABLA 12:** Tabla que muestra la homología interespecífica utilizando la secuencia consenso de las distintas especies que conforman el género *Solea*

Llegados a este punto, hay que destacar que el ADN satélite Pvull estaría conservado solo en las especies del Género *Solea* ya que en especies analizadas de la misma familia (Familia Soleidae) pero pertenecientes a otros Géneros, como son *Microchirus azeví* y *Dicologoglossa. cuneata*, no pudimos poner de manifiesto la presencia de este ADN satélite Pvull en sus genomas, ni por hibridación tipo Southern ni por PCR.

Por último, no se encontró ninguna homología cuando las secuencias de las unidades monoméricas fueron enviadas a la base de datos EMBL/GeneBank. Al igual que se realizó en el fletan, las secuencias fueron también enfrentadas con las secuencias depositadas en una base de datos de ESTs del propio lenguado (realizada también en el proyecto Pleurogene). Al contrario de lo que ocurre con el



fletan, en esta ocasión, no se encontraron homologías significativas con ninguna de ellas.

### **4.1.3. Familia de ADN repetido ACA72 en peces planos.**

#### **4.1.3.1. Aislamiento y caracterización de la secuencia ACA 72.**

En el rastreo de una genoteca enriquecida de microsatélites (genoteca H/R ACA) generada en el lenguado senegalés, se obtuvo un clon (clon 72) cuyo inserto, de 843 pb, presentaba alta homología (88%) con una secuencia (BG16, número de acceso AB095087) de la base de datos GenBank/EMBL identificada como un ADN satélite (familia BamHI descrita en Takahashi et al., 2001) del pez *Lepomis macrochirus* perteneciente al Orden Perciformes.

Con el fin de caracterizar esta secuencia y comprobar si en el lenguado también formaba parte de un ADN repetido, diseñamos una pareja de *primers* en las zonas que se encontraban más conservadas en el alineamiento entre la unidad de repetición del ADN satélite BamHI de *Lepomis* y la región homóloga en el clon 72 de lenguado senegalés. Este alineamiento y la secuencia de los primers diseñados se muestra en la **FIGURA 23**.

Estos primers fueron utilizados para llevar a cabo una reacción de amplificación mediante PCR utilizando el ADN del lenguado. Si la secuencia aislada inicialmente no tuviera un patrón en unidades de repetición en tándem, el amplificado que se esperaba sería de una única banda del tamaño correspondiente a la secuencia entre ambos primers (unos 200 pb). Sin embargo el resultado de esta PCR en patrón de escalera, que se observa en la **FIGURA 24**, confirma la existencia de una familia de ADN repetido en el genoma del lenguado y que denominamos ACA72. Las bandas amplificadas correspondientes a las posibles unidades de repetición de alrededor de 450pb, fueron purificadas, clonadas y secuenciadas (clones ACASSE-5, ACASSE-7, ACASSE-11 y ACASSE-25). Las secuencias de estos clones, así como la secuencia consenso, se muestran en la **FIGURA 25**.

```

ACA-SSE  GGGCAGTTTGTGGACAATCAACTGGATGAATAGCAGAGAAAATGGTTGTGAACCTCCAACTCGGATCACTTCAGATGGAACCACTCATGATTC
LEPOMIS  GGGGAGATGCTTTTGG-----AA--TCACGTTTCAGATCACCTCAAATGGAGACTGATGATTC

ACA-SSE  TGGACTTCATAAGGGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTTGGTTGTGATGGGTTCTGCAGTGAAGCTCTGAATGAACATATCCCAACATCCAATGTGGAGCTC
LEPOMIS  TTGTGTTTCATAAGTGCCTTCTCTTTGGGGTTGTCTTGGTTGTGAGTTGTTCAAAAGACATATCACTTTCAATTTTCACATCAATTTAACCATAACCA---

ACA-SSE  AAATATTCATCACCAACATTACCCAAACACAAGCACTGACTTG-----ACA72-F
LEPOMIS  -TAACTTTGTACCAACATCACCCAAACACAAGCACTGACTTGAGCTCTGAATTCAGTAAGTGCTTCTTGTGGGGTAGTGTGCTGA-CCTCTGAAG

ACA-SSE  TCACATTTGCTTAAGTTCAGAGGGCAA-----TCC-----TCTCGGATAACATATTGATATAACACACCCCTCTGACATTTCTTG
LEPOMIS  TCCAGGATCCCTTTAAGGAATATATTAGAAGAATGATTCTAGATCCCTAAATATAGATGACAATTTTGGATACATGAAATGATTCTTGCCTTCACA

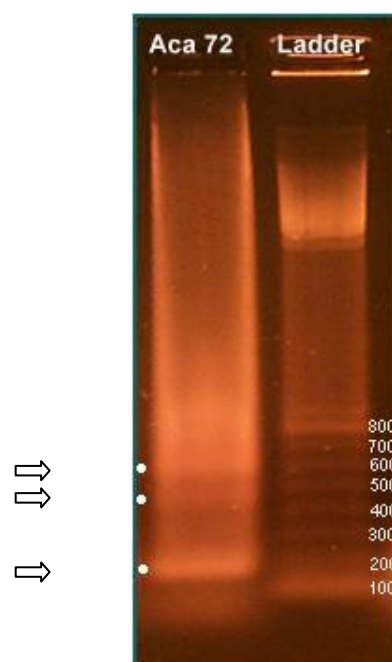
ACA-SSE  TAAGTCTGTACAATTACA72-R
LEPOMIS  CAAG-CTGCTTTGGGCTTTGTGTCAGAAAGTGCCTTTTGGAAATAGAAATTCAGTGCTAACTCTGCTTCTTGTATTGCTTTAAGTACTCCTGATGG

```

ACA72-F: 5'-CAGTAAGTGCCTWYTTGTTGRGGTA-3'

ACA72-R: 5'-TCAAGTCWRTGCTNRWGTWWGGGT-3'

**FIGURA 23:** Fragmento de la zona que se encuentra más conservada en el alineamiento entre la unidad de repetición del ADN satélite BamHI de *Lepomis* y la región homóloga en el clon 72 de lenguado, en dicho alineamiento se señala la zona donde se diseñaron los primers. Debajo, se muestra la secuencia de los primers utilizados para amplificar ACA72 en el lenguado y en las otras especies analizadas en esta Memoria



**FIGURA 24:** Electroforesis de la amplificación realizada en el genoma de *S. senegalensis* (tras analizar la homología entre ACA72 del lenguado senegalés y el satélite BamHI de *Lepomis*) con los primers diseñados con genoma de dicha especie. Se puede observar el patrón en escalera típico de un ADN satélite, señalado mediante flechas con un tamaño alrededor de 200pb, 450pb y 600pb.

## 4. Resultados

```

ACA-SSE-5 CAGTAAGAGT CATTGTGG GGTAGTGTG GTGATTTTT GAGGTCATAT TTGCCA-GT TCAGAGGGCA ATCCCTCTGG ATACATAAT GATATAACAC 100
ACA-SSE-7 CAGTAAGTGC TTTTGTGG GGTAGTGTG TGATTTTT GAGGTCATAT TTGCTTAAGT TCAGAGGGCA ATCCCTCTGG ATACATAAT GATATAACAC
ACA-SSE-25 CAGTA-G-TG AATCAGTTGG GGTAGGGTGG GAGATTTTT GAGGTCATAT TTGCTTAAGT TCAGAGGGCA ATCCCTCTGG ATACATAAA GATATAACAC
ACA-SSE-11 CAGTAAGTTC TTTTGTGG GGTAGTGTG GTGATTTTT GAGGTCACAT TTGCTTAAGT TCAGAGGGCA ATCCCTCTGG ATACATAAT GATATAACAC
SSE-SECCONS CAGTAAGTGC TTTTGTGG GGTAGTGTG GTGATTTTT GAGGTCACAT TTGCTTAAGT TCAGAGGGCA ATCCCTCTGG ATACATAAT GATATAACAC

ACA-SSE-5 AACCTCTGAC ATTTCTTGTA AGTCTGTACA ATTACCOCTAA CTTTAGCATT GACTTGAGTG TTTTTCAG TAAGTGTAC TTGTTGGGGC AGTTTTGTG 200
ACA-SSE-7 AACCTCTGAC ATTTCTTGTA AGTCTGTACA ATTACCOCTAA CTTTAGCATT GACTTGGGTG TTTTTCAG TAAGTGTAC TTGTTGGGGC AGTTTTGTG
ACA-SSE-25 AACCTCTGAC ATTTCTTGTA AGTCTGTACA ATTACCOCTAA CTTTAGCATT GACTTGGGTG TTTTTCAG TAAGTGTAC TTGTTGGGGC AGTTTTGTG
ACA-SSE-11 AACCTCTGAC ATTTCTTGTA AGTCTGTACA ATTACCOCTAA CTTTAGCATT GACTTGAGTG TTTTTCAG TAAGTGTAC TTGTTGGGGC AATTTGTG
SSE-SECCONS AACCTCTGAC ATTTCTTGTA AGTCTGTACA ATTACCOCTAA CTTTAGCATT GACTTGAGTG TTTTTCAG TAAGTGTAC TTGTTGGGGC AGTTTTGTG

ACA-SSE-5 GACAAATATCA ACTGAATGAA TAGCAAGAA AATGGT--- ----CCAAC TCG-ACCCT TCAGATGGAA CCACTCATGA TTCTGGACTT CATAAGTGCT 300
ACA-SSE-7 GACAAATATCA ACTGAATGAA TAGCAGAGAA AATGGTGTG AGCTTCCAC TCGGATCACT TCAGATGGAA CCACTCATGA TTCTGGACTT CATAAGTGCT
ACA-SSE-25 GACAAATATCA ACTGAATGAA TAGCAAGAA GATGGTTGTG AACTTCCAC TCAGACCACT TCAGATGGAA CCACTCATGA TTCTGGACTT CATAAGTGCT
ACA-SSE-11 GAAATATCA ACTGGATGAA TAGCAGAGAA AATGGTGTG AACTTCCAC TCGTATCACT TCAGATGGAA CCACTCATGA TTCTGGACTT CATAAGTGCT
SSE-SECCONS GACAAATATCA ACTGGATGAA TAGCAGAGAA AATGGTGTG AACTTCCAC TCGGATCACT TCAGATGGAA CCACTCATGA TTCTGGACTT CATAAGTGCT

ACA-SSE-5 TCTCTTTGGG GTTGTCTGG TTGTGATGG TTCTGCRAGT GAAAGCTCTG AATGAACAT CCCAAATCC AATGTGGAGC TCAAAATTC ATCACCACA 400
ACA-SSE-7 TCTCTTTGGG GTTGTCTGG TTGTGATGG TTCTGCRAGT GAAAGCTCTG AATGAACAT CCCAAATCC AATGTGGAGC TCAAAATTC ATCACCACA
ACA-SSE-25 TCTCTTTGGG GTTGTCTGG TTGTGATGG TTCTGCRAGT AACTGTCTA AATGAACAT CCTGAAATCC AATGTGGAGC TCAAAATTC ATCACCACA
ACA-SSE-11 TCTCTTTGGG GTTGTCTGG TTGTGATGG TTCTGCRAGT CAA-GCTCTG AATGAACAT CCTATCTCC AATGTGGAGC TCAAAATTC ATCACCACA
SSE-SECCONS TCTCTTTGGG GTTGTCTGG TTGTGATGG TTCTGCRAGT GAA-GCTCTG AATGAACAT CCTATCTCC AATGTGGAGC TCAAAATTC ATCACCACA

ACA-SSE-5 TTACCCAAC ACAAGCACAG ACTTG
ACA-SSE-7 TTACCCATAC ACAAGCAGTG ACTTG
ACA-SSE-25 TTACCCCTAC ACAAGCACAG ACTTG
ACA-SSE-11 TTACCCAAC ACAAGCACAG ACTTG
SSE-SECCONS TTACCCAAC ACAAGCACAG ACTTG

```

**FIGURA 25:** Secuencias de varias unidades correspondientes a la familia ACA72 aislada del genoma del lenguado senegalés junto con la secuencia consenso generada a partir de sus alineamientos.

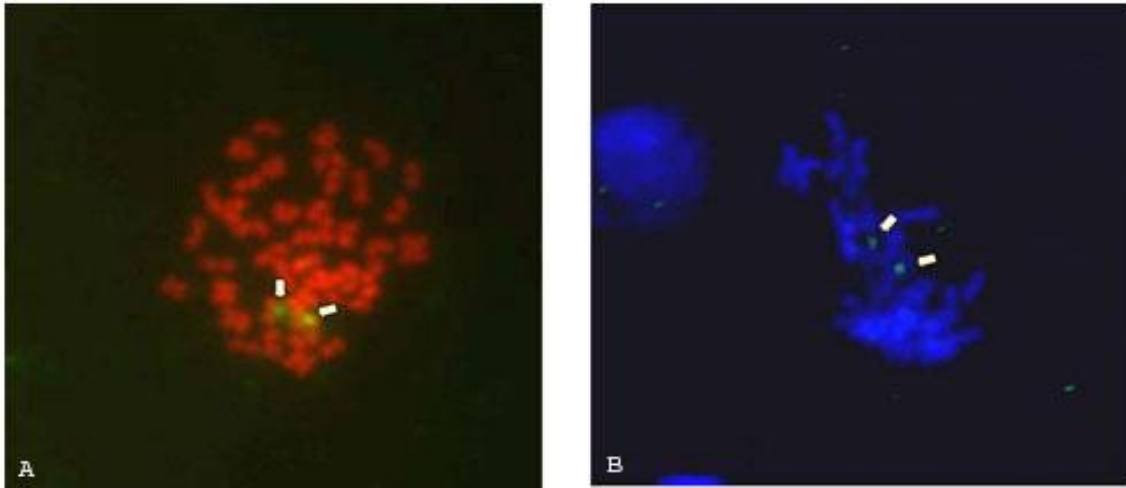
La unidad de repetición de esta familia de ADN en el lenguado tiene una longitud que varió entre 415 a 425 pares de bases, y un contenido medio en AT del 62%. Las unidades caracterizadas presentan una homología media del 91,1% (TABLA 13).

	ACASSE-5	ACASSE-7	ACASSE-11	ACASSE-25
ACASSE-5		93,9	90,6	88,9
ACASSE-7			93	91,5
ACASSE-11				88,7
<b>ACASSE-25</b>				

**TABLA 13:** Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 del lenguado senegalés. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 91,1%.

### 4.1.3.2. Localización cromosómica de la secuencia ACA 72 en el lenguado.

Para su caracterización citogenética, se realizaron hibridaciones *in situ* sobre cromosomas mitóticos de *S. senegalensis* con el fin de poner de manifiesto su localización. Esta hibridación mostró que este ADN repetido se encuentra en una única pareja de cromosomas del complemento del lenguado **FIGURA 26**.



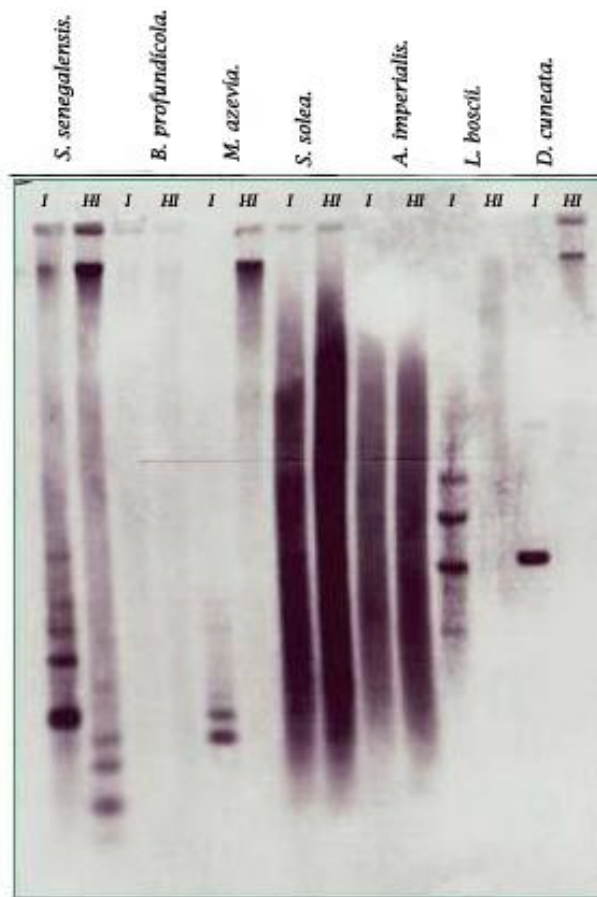
**FIGURA 26:** Hibridación in situ en cromosomas de *S. senegalensis* en individuos diferentes. En la figura A están teñidos con Ioduro de propidio y la sonda marcada con digoxigenina. En la figura B están teñidos con DAPI y la sonda marcada con biotina.

#### 4.1.3.3. Conservación de la secuencia ACA 72 en otros peces planos.

Este análisis se ha realizado, al igual que en las otras familias de ADN repetido caracterizadas con anterioridad, con diferentes abordajes.

Así, en primer lugar, utilizando como sonda la unidad de repetición de ACA72, realizamos una hibridación tipo Southern sobre ADN genómico, previamente digerido con enzimas (EcoRI, y BamHI) de diferentes especies de peces planos: *S. senegalensis*, *B. profundícola*, *M. azevíá*, *S. solea*, *A. imperialis*, *L. boscii* y *D. cuneata*. Las señales de hibridación pusieron de manifiesto la presencia de ACA72 en el genoma de todas estas especies en mayor o menor medida (**FIGURA 27**).

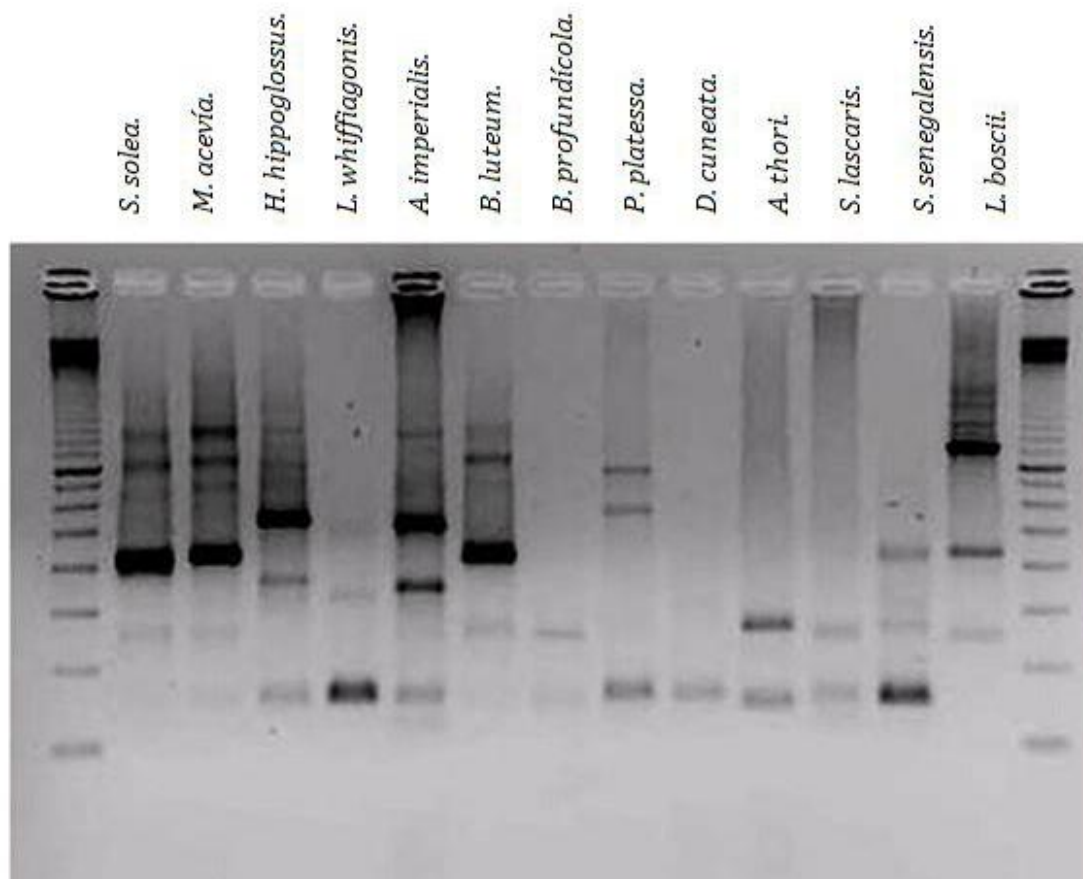
En segundo lugar, utilizando los primers diseñados previamente para el lenguado (ACA-72F/R), se realizaron PCRs para intentar amplificar ACA72 en 13 especies de peces planos: *S. solea*, *S. lascaris*, *D. cuneata*, *Bathysolea profundícola*, *Buglossidium luteum*, *M. azevíá*, *H. hippoglossus*, *Pleuronectes platessa*, *Arnoglossus thori*, *Arnoglossus imperialis*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Lepidorhombus boscii* y el propio *S. senegalensis* como control positivo.



**FIGURA 27:** Hibridación tipo Southern-blot de la unidad monomérica de la familia ACA72 de ADN satélite de lenguado senegalés sobre ADN genómico de diferentes especies de peces planos (*S. senegalensis*, *B. profundicola*, *M. azevia*, *S. solea*, *A. imperialis*, *L. boschii* y *D. cuneata*). Previamente digerido con dos enzimas, EcoRI(I) y BamHI(HI).

Las bandas que presentaron mayor intensidad del amplificado para cada una de las especies fueron clonadas y secuenciadas. Sus secuencias consenso se recogen en los anexos al igual que los porcentajes de homología entre los distintos clones (**Anexo II**).

Una vez analizadas las distintas secuencias, se comprobó que los tamaños de las unidades de repetición variaban entre especies. Así, el tamaño mayor lo presentaron las especies *H. hippoglossus* y *A. imperialis* con 537 pb y el menor lo presentó *S. lascaris* con 255 pb.



**FIGURA 28:** Amplificados obtenidos en las trece especies de peces planos que se han analizado en esta Memoria, utilizando los primers diseñados en la secuencia ACA72 de lenguado.

Esta familia de ADN repetido ACA72 presentó un alto grado de similitud intraespecífica en todas las especies analizadas. El tamaño medio de las secuencia ACA72 de las especies analizadas así como la homología media entre clones dentro de cada especie, se recogen en la **TABLA 14**.

ESPECIE	TAMAÑO MEDIO DE LA SECUENCIA EN pb	GRADO DE HOMOLOGÍA EN %
<i>S. senegalensis</i>	425	91,1
<i>S. solea</i>	425	92,5
<i>S. lascaris</i>	255	95
<i>D. cuneata</i>	263	93,1
<i>B. profundícola</i>	406	89
<i>M. azevía</i>	422	97,2
<i>B. luteum</i>	428	90
<i>H. hippoglossus</i>	535	95
<i>P. platessa</i>	450	96,4
<i>A. imperialis</i>	537	94,1
<i>A. thori</i>	272	97
<i>L. boscii</i>	466	96,35
<i>L. whiffiagonis</i>	411	93,31

**TABLA 14:** En la tabla se muestran las distintas especies de peces planos en las que se ha amplificado la secuencia repetida ACA 72, junto con el tamaño de cada secuencia y su homología media correspondiente.

#### 4.1.3.4. Características de la secuencia ACA 72 en peces planos.

Se realizó alineamiento múltiple con todas las secuencias consenso con el fin de determinar su organización interna. Como ya se comentó en el apartado anterior,

se han caracterizado secuencias de diferentes tamaños en las distintas especies. Mediante este alineamiento de secuencias consenso, hemos podido observar que existen tres regiones comunes (que hemos denominado cajas A, B y C)

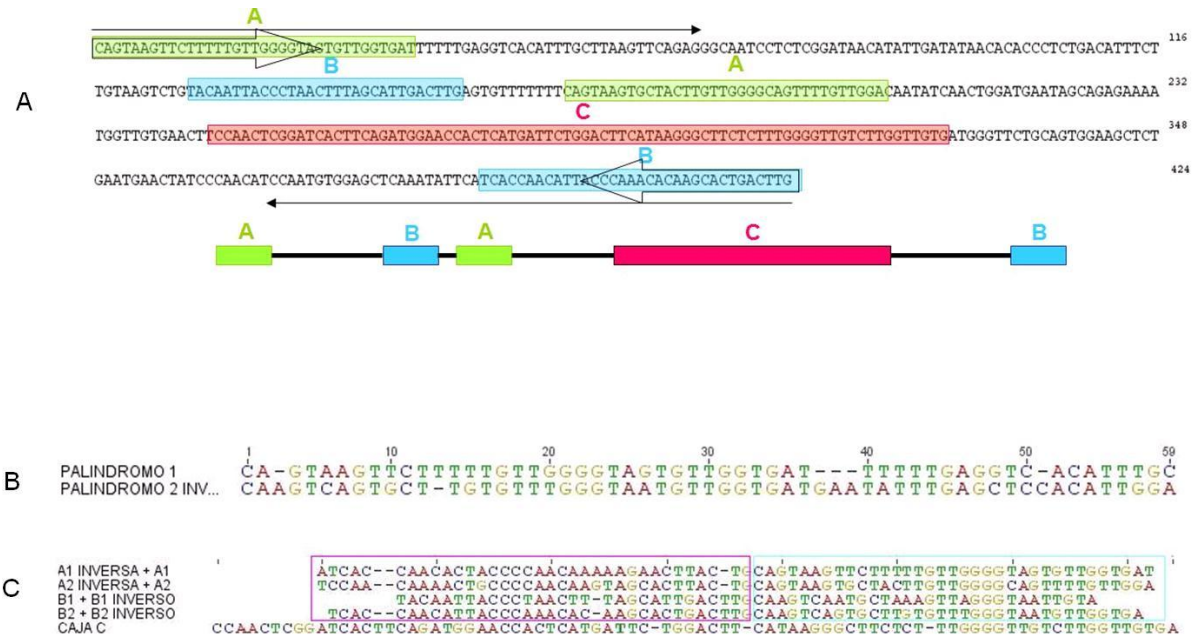
y que presentan un mayor grado de conservación entre especies que el resto de la unidad de repetición. Por otro lado, también se pudo deducir que las diferencias en tamaño entre las unidades de repetición ACA72 de las distintas especies de peces planos, correspondían a la presencia o no de una o varias repeticiones de estas cajas o del tamaño de las regiones espaciadoras. Para realizar un análisis más profundo de la organización de ACA72, se ha utilizado como referencia la unidad de repetición de la especie *S. senegalensis*, a partir de la cual se detectó esta familia de ADN (**FIGURA 29A**).

La caja que hemos llamado A, da comienzo con la secuencia homóloga al primer ACA-72/F (el cual se utiliza para amplificar ACA72). Esta caja tiene un tamaño de alrededor de unos 35 nucleótidos, observándose tramos ricos en T y G consecutivas. Tras una secuencia espaciadora de aproximadamente 90 nucleótidos, se localiza lo que hemos denominado caja B, una secuencia con un tamaño de unos 31 nucleótidos. Tras esta caja B, separada por una secuencia de 11 nucleótidos, prácticamente formada por timinas, aparece nuevamente la caja A. Ésta, se encuentra separada por una secuencia de 72 nucleótidos de la caja C. Esta caja C se encuentra conformada por la secuencia más larga ya que está formada por unos 80 nucleótidos. Por último, la secuencia ACA-72 en el lengüado, termina con otra caja B en la cual se encuentra el primer ACA-72/R (utilizado para su amplificación). Es reseñable que ACA72 comienza y termina con una larga secuencia palindrómica de 68 nucleótidos con una homología del 74% (**FIGURA 29B**).

Adicionalmente, hemos comprobado la existencia de una gran homología entre las diferentes cajas. Así, y como consecuencia de que están incluidas dentro del palíndromo mencionado, las dos secuencias de las cajas A y las dos secuencias inversas complementarias de las cajas B presentan una homología media del 70% (**FIGURA 29C**). Además, hemos constatado que la caja C, es una secuencia palindrómica formada por la unión de las cajas A y B, siendo la primera parte de esta secuencia C (desde el nucleótido 11 al 46) homóloga a la caja B y a la secuencia inversa complementaria de A y la segunda parte (desde el 47 al 81) homóloga a la caja A y a la inversa complementaria de B, con una homología media del 57,5% (**FIGURA 29C**).



## 4. Resultados



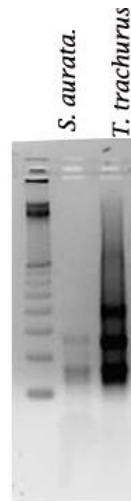
**FIGURA 29: A.** Secuencia consenso de *S. senegalensis*, en la que se muestra el esquema general de la secuencia repetida ACA-72 del grupo de peces planos. En este esquema se observan las distintas cajas en la que la hemos dividido la secuencia repetida ACA-72: caja A, caja B y caja C, y la combinación de estas para conformar la unidad de dicha secuencia. Las flechas negras indican el fragmento de secuencia palindrómica. **B.** Alineamiento del palíndromo (Geneious.4.8.4) que forma el inicio y el final de la secuencia ACA-72, que muestra una homología del 74,6%. **C.** Alineamiento que explica la estructura palindrómica de la caja C, formada por la unión de las cajas A y B, Este alineamiento presenta una homología del 57,5%.

Esta misma organización, la presentaron las especies de peces planos que presentaron tamaños similares en la unidad de repetición ACA72 al de *S. senegalensis*. Estas especies son *S. solea*, *Bathysolea profundicola*, *Buglossidium luteum*, *M. azeví*, *H. hippoglossus*, *P. platessa*, *A. imperialis*, *L. whiffiagonis*, *L. boscii*. Sin embargo, y como ya se ha comentado con anterioridad, existen unidades de repetición de menor tamaño. Estas corresponden a las especies *S. lascaris*, *D. cuneata* y *Arnoglossus thori*. La determinación de las cajas y el alineamiento múltiple nos permitió comprobar que en estas últimas especies, la unidad de repetición comenzaba en la segunda caja A, teniendo, por tanto, una organización de A-C-B. Esto se podría explicar si en estas tres especies, en la PCR realizada para amplificar ACA72, el primer ACA72-F se hubiera unido a la segunda caja A (también zona homóloga a él), por lo que no tendríamos el mismo tamaño de repetición, ya que faltan las cajas A y B iniciales.

#### 4.1.4. Análisis del ADN repetido ACA72 en otros grupos de peces.

##### 4.1.4.1. Aislamiento mediante PCR

Los primers utilizados para amplificar ACA72 en el lenguado, diseñados en las zonas homólogas entre *S. senegalensis* (pleuronectiforme) y *Lepomis macrochirus* (perciforme), se usaron para intentar amplificar este ADN repetido en otras especies fuera de los peces planos. En este sentido, decidimos usar estos primers en dos especies del orden Perciforme, al que también pertenece *Lepomis* tales como la dorada (*Sparus aurata*) y el jurel (*Trachurus trachurus*). La existencia de bandas de amplificación en las diferentes reacciones de PCR, pusieron de manifiesto la presencia de este ADN repetido en el genoma de estas dos especies. (**FIGURA 30**)



**FIGURA 30:** Electroforesis en la que se muestra los amplificados obtenidos en dos especies de perciformes: *S. aurata* y *T. trachurus*, utilizando los primers diseñados en la secuencia repetida ACA72 de lenguado.

Las bandas amplificadas fueron clonadas y 6 clones secuenciados.

Así, la secuencia de la unidad de repetición amplificada en la dorada, presenta un tamaño entre 221 pb y 248 pb, y la secuencia consenso presenta un tamaño de 248pb. En la **TABLA 15**, con un grado de homología media entre las secuencias de los 6 clones analizados del 86,9% y una riqueza en AT del 58,7%.

#### 4. Resultados

Por otro lado, el jurel presentó una secuencia con un tamaño entre 420 pb y 430 pb, con un grado de homología entre sus 6 clones del 94,6% y una riqueza en AT de 61,2%.

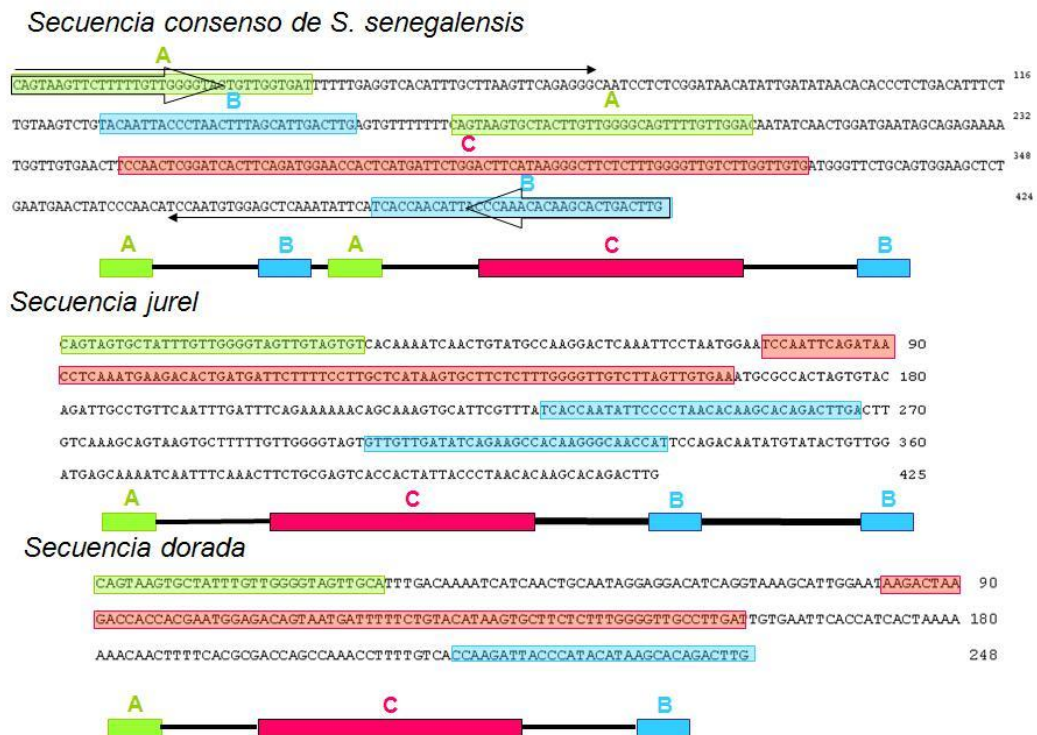
ESPECIE	TAMAÑO MEDIO DE LA SECUENCIA EN pb	GRADO DE HOMOLOGÍA EN %
<i>S. aurata</i>	248	86,9
<i>T. trachurus</i>	435	94, 6

**TABLA 15:** Especies del Orden Perciformes analizadas con la secuencia repetida ACA-72, el tamaño que presentan para dicha secuencia y el grado de homología entre sus secuencias.

La comparación de estas secuencias con las secuencias consensos de los peces planos permitió constatar la presencia y conservación de las diferentes cajas descritas con anterioridad en ACA72. Sin embargo, el análisis de su organización reveló que el número y orden de dichas cajas cambiaba con respecto a los peces planos, lo que explica, en parte, las diferencias en tamaño del ACA72 en estas especies (**FIGURA 31**) Así, la secuencia de la dorada, tal y como se muestra en la **FIGURA 31** es una secuencia más corta, que presenta un esquema A, C, B, sin ninguna repetición de las mismas. Mientras que en el jurel, la organización de estas cajas conservadas sigue el esquema A, C, B, B.

Hay que mencionar que los mismos primers fueron utilizados para intentar amplificar ACA72 en dos grupos de peces muy alejados filogenéticamente de los teleosteos como son los esturiones (Orden Acipenseriforme) y las rayas (Orden Rajiformes). En ninguno de los dos casos pudimos obtener amplificado. Esto podría ser debido a que en sus genomas no está presente esta secuencia o a que presenta un mayor divergencia y los primers no presentaron homología suficiente para poder hibridar en la secuencia diana.

Se realizó un análisis de homologías interespecíficas usando las secuencias consenso de ACA72 entre todas las especies de peces estudiados hasta ese momento (13 pleuronectiformes y 3 perciformes), presentando unos valores relativamente altos, todos ellos por encima del 60%. (**Anexo III**).



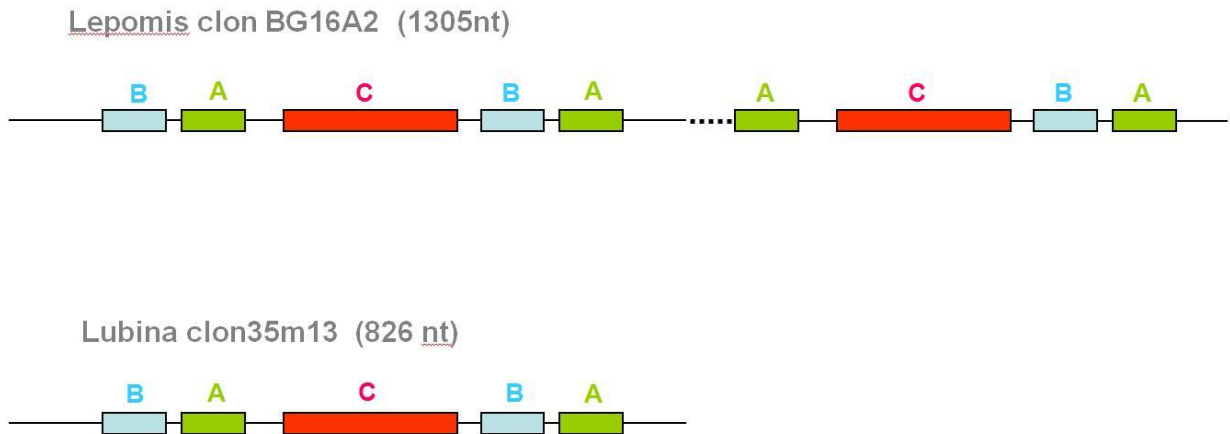
**FIGURA 31:** Comparación de las unidades de repetición de ACA72 entre peces planos (secuencia consenso), y dos especies de perciformes como el jurel y la dorada. Las cajas nominadas como A, B y C, marcan regiones conservadas dentro de ACA72 entre estas especies. Y en algunos casos, estas regiones pueden estar duplicadas en la unidad de repetición.

b) Búsqueda de homologías en bases de datos.

Debido a que las cajas A, B y C caracterizadas presentan un alto grado de homología entre secuencias de distintas especies, el siguiente paso consistió en enviar las secuencias de estas cajas a las bases de datos. Así, encontramos homología, como era de esperar, con el clon BG 16A2, de la familia de ADN repetido BamHI de *Lepomis macrochirus* (E-value:  $9E-17$ ), ya que fue este clon quien dio la pista de la existencia de un ADN repetido. Comparando esta secuencia con las de peces planos, hemos podido definir las diferentes cajas conservadas dentro de la misma (**FIGURA 32**), lo que confirma que el ADN satélite descrito para *Lepomis* es la familia ACA72.

Adicionalmente, en las bases de datos también hemos encontrado homología con clones de secuencias genómicas de lubina *Dicentrarchus labrax* (con un E-






value:2E-13) perteneciente también al orden Perciformes. El análisis de estos clones, utilizando como referencia la unidad de repetición ACA72 de lenguado permitió también establecer la organización interna de esta secuencia repetida (distribución y número de cajas conservadas) en lubina (**FIGURA 33**).



**FIGURA 32:** Homología de ACA72 con las secuencias depositadas en las bases de datos. Junto con la organización de las unidades de repetición en *Lepomis* y Lubina.

Estas similitudes de la secuencia ACA72 de Pleurinctiformes con otros peces, de otro orden como es Perciformes separados filogenéticamente, sugieren que esta familia de ADN repetido podría presentar cierto grado de conservación en el genoma de otros órdenes de teleósteos. Por ello, se realizó una búsqueda en las bases de datos de los genomas secuenciados de las especies modelo de peces *Danio rerio* (pez cebra), *Oryzias latipes* (medaka), *Tetraodon nigroviridis* (tetraodon), *Gasterosteus gymnurus* (Espinoso), y *Takifugu rubripes* (fugu). Estas especies son peces pertenecientes a otros Órdenes como Tetraodontiformes (Fugu y Tetraodon), Gasterosteiformes (Espinoso), Beloniformes (Medaka) y Cypriniformes (Pez cebra).

La organización y tamaño de repetición en estas especies de la familia ACA72 es variable, así como el cromosoma de su complemento en el que se localiza esta secuencia. Tales características se resumen en la **FIGURA 33**.

Especies	Fragmento cromosómico	Cromosoma	Zonas conservadas	Media tamaño repetición	Número de repeticiones
Fugu	Scaffolds 144 y 2106	11		956	7
Tetraodon	19906196-19926093	2		850	?
Espinoso	BAC CH213-237G19	4		1150	>30
Medaka	Scaffold 4154	4		2250	?
Pez cebra	BAC DKEY-69C19	4		1740	11

**FIGURA 33:** Distribución de las distintas unidades de repetición en las diferentes especies modelo encontradas en bases de datos.

En esta **FIGURA 33** se puede observar como en estas especies modelo, la secuencia ACA72 presenta un tamaño superior a la que presenta dicha secuencia en los peces planos. Esto es debido a dos causas, Por un lado, a la variación en el número de cajas conservadas. Así, se puede comprobar por ejemplo, que en el caso del espinoso las cajas A y B se repiten hasta 4 veces dentro de su secuencia y en el pez cebra, se observa la duplicidad de la serie A-B-C. La otra causa, es la diferencia en tamaño de las regiones espaciadoras de las cajas. Así, por ejemplo, en fugu y tetraodon, con organización similar, se diferencian con peces planos, principalmente, por la longitud de las secuencias que separan las cajas conservadas.

A la vista del número de repeticiones que están presente en los genomas secuenciados de las especies modelo, podemos concluir que ACA72 es una secuencia moderadamente repetida, por lo menos en tales genomas y está conservada, al menos ciertas regiones (cajas A, B y C), en todos los grupos de Teleósteos analizados en esta Memoria.

##### **4.1.4.2. Utilización de la secuencia repetida ACA72 en filogenia**

La presencia de ACA72 en todos los grupos de peces analizados, ya sea mediante técnicas moleculares o bien encontrando homologías con secuencias de las bases de datos podría ser un indicativo de su posible utilidad como marcador para estudios filogenéticos.

Tal y como se ha puesto de manifiesto en el apartado 4.1.4, la variabilidad intraespecífica en cada especie fue muy baja, presentado valores medios de 94,6% con secuencia muy homólogas entre los clones de una especie. (**Anexo II**). Adicionalmente, hemos llevado a cabo un estudio de la divergencia interespecífica. Para ello, realizamos un análisis con todas las unidades de repetición de todas las especies de peces planos (13). Como algunas especies, tenían unidades de repetición incompletas (solo se habían podido amplificar parte de la secuencia ACA72 ver apartado 4.1.3.4), se decidió utilizar solo la secuencia común a todas las especies (secuencia formada por las estructura A-C-B). Teniendo en cuenta esto, se alinearon todos los clones y se calculó la variabilidad media en las comparaciones entre todos ellos (**Anexo IV**). Estos datos fueron utilizados para la realización de un árbol de distancias usando el método de Neighbor-Joining (**Anexo V**). Tal como se puede observar en esta figura, las secuencias se agruparon por afinidad taxonómica, indicando, por tanto, que ACA72 presenta evolución concertada. Esto además, queda constatado, en la tabla **Anexo IV** en donde la variabilidad intraespecífica es siempre menor que la variabilidad interespecífica.

Así, hemos realizado un estudio filogenético en los peces planos, utilizando para ello las secuencias consenso de la unidad de repetición ACA72 de todas las especies analizadas. Adicionalmente, hemos incluido en este estudio de divergencia interespecífica a las tres especies de orden Perciformes analizadas en esta Memoria. La secuencia común para todas las especies incluía las cajas A-C-B y las secuencias espaciadoras, con un tamaño medio de 290 pb y una homología no inferior al 60% en las comparaciones entre cualquier especie. **Anexo III**.

El cálculo de las distancias génicas entre todas las secuencias consenso de las diferentes especies (**TABLA 16**), permitió realizar un análisis filogenético mediante el método del vecino más próximo (neighbor-joining), cuyo resultado se muestra en la **FIGURA 34**. En el árbol filogenético obtenido, utilizando la secuencia de *Lepomis*

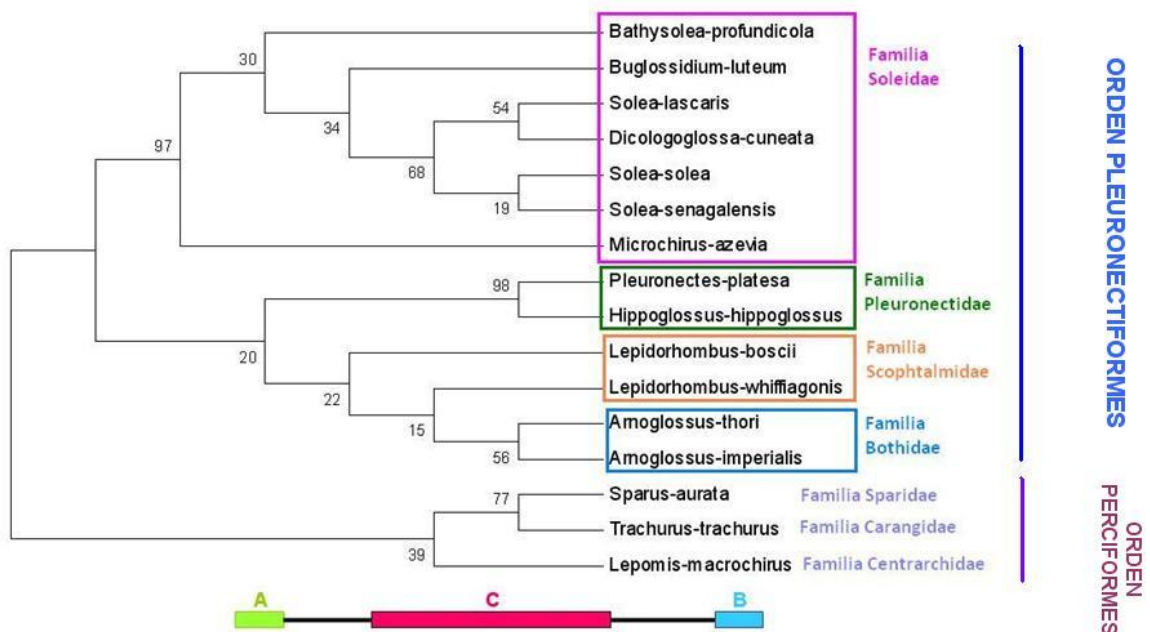
(Orden Perciforme) como *outgroup*, se puede observar como las distintas especies de una misma familia del Orden Pleuronectiforme se agrupan inequívocamente entre sí.

	<i>S. senegalensis</i>	<i>S. solea</i>	<i>S. lascaris</i>	<i>D. cuneata</i>	<i>B. profundicola</i>	<i>B. luteum</i>	<i>M. azevia</i>	<i>H. hippoglossus</i>	<i>P. platessa</i>	<i>A. imperialis</i>	<i>A. thori</i>	<i>L. boscii</i>	<i>L. whiffiagonis</i>	<i>S. aurata</i>	<i>T. trachurus</i>	<i>L. macrochirus</i>
<i>S. senegalensis</i>	<b>0.089</b>	0,13	0,12	0,09	0,14	0,16	0,15	0,37	0,38	0,34	0,35	0,41	0,34	0,37	0,39	0,38
<i>S. solea</i>		<b>0.075</b>	0,10	0,14	0,17	0,16	0,16	0,36	0,37	0,35	0,37	0,37	0,35	0,35	0,38	0,39
<i>S. lascaris</i>			<b>0.05</b>	0,12	0,15	0,18	0,13	0,35	0,36	0,35	0,37	0,37	0,33	0,35	0,40	0,38
<i>D. cuneata</i>				<b>0.069</b>	0,15	0,16	0,13	0,36	0,37	0,34	0,35	0,38	0,30	0,37	0,38	0,40
<i>B. profundicola</i>					<b>0.10</b>	0,11	0,14	0,32	0,32	0,37	0,39	0,36	0,31	0,36	0,39	0,38
<i>B. luteum</i>						<b>0.028</b>	0,15	0,35	0,36	0,39	0,40	0,38	0,33	0,34	0,38	0,37
<i>M. azevia</i>							<b>0.01</b>	0,36	0,37	0,34	0,35	0,40	0,32	0,34	0,38	0,39
<i>H. hippoglossus</i>								<b>0.05</b>	0,06	0,44	0,46	0,39	0,33	0,42	0,45	0,39
<i>P. plateas</i>									<b>0.036</b>	0,45	0,46	0,39	0,33	0,43	0,46	0,42
<i>A. imperialis</i>										<b>0.059</b>	0,06	0,40	0,39	0,36	0,37	0,37
<i>A. thori</i>											<b>0.03</b>	0,42	0,41	0,35	0,37	0,39
<i>L. boscii</i>												<b>0.036</b>	0,25	0,43	0,43	0,43
<i>L. whiffiagonis</i>													<b>0.066</b>	0,40	0,43	0,43
<i>S. aurata</i>														<b>0.131</b>	0,29	0,29
<i>T. trachurus</i>															<b>0.06</b>	0,34
<i>L. macrochirus</i>																<b>*0.013</b>

**TABLA 16:** Tabla en la que se muestran las divergencias interespecíficas, con las trece especies analizadas de peces planos y las tres de Perciformes, utilizando el valor de divergencia intraespecífica de *\*L. macrochirus* calculada a partir de los AN suministrados por la base de datos BlastN: AB095091/ AF214109/ AB095090/ AB095088/ AB095089/ AB095087.



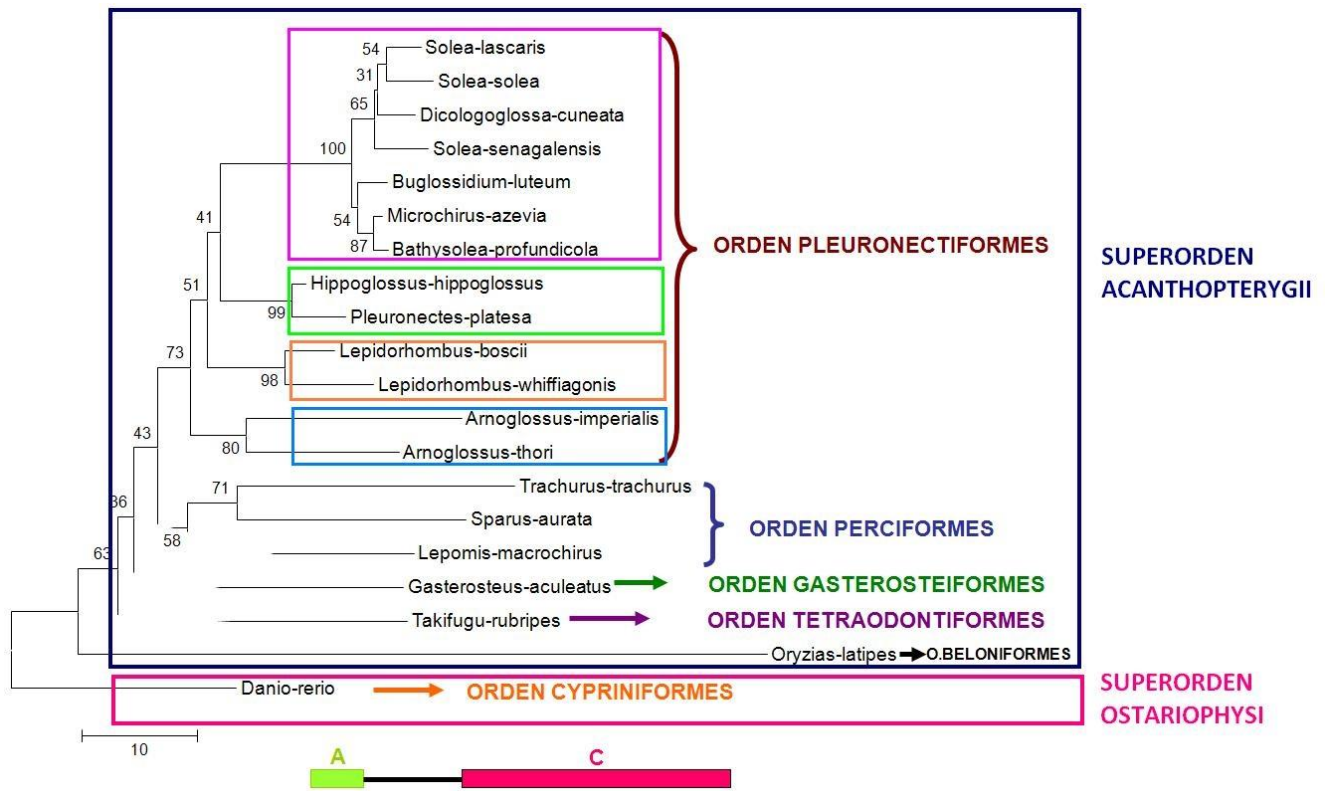
De las 13 especies analizadas de peces planos, siete pertenecen a la familia Soleidae: *S. solea*, *S. lascaris*, *D. cuneata*, *B. profundicola*, *B. luteum*, *M. acevía* y *S. senegalensis*, dos de ellas se agrupan en la familia Pleuronectidae: *H. hippoglossus* y *P. platessa*, dos de ellas en la familia Scophtalmidae como son *A. thori* y *A. imperialis*, y *L. whiffiagonis*, *L. boscii* que se agrupan en la familia Bothidae.



**FIGURA 34:** En la zona superior de la figura se puede observar el árbol filogenético realizado que relaciona al grupo de los peces planos con el de los perciformes.

Una vez comprobado que este ADN repetido ACA72 tiene la capacidad de distinguir entre dos órdenes de peces, nos propusimos usarlo como un marcador filogenético entre otros grupos dentro de Teleósteos, dado que hemos comprobado su presencia y organización (repetido en tándem) está presente en los genomas de las especies modelos. Para ello, y debido a que no todas las especies analizadas tienen la misma organización de las cajas conservadas, utilizamos solo las regiones comunes en las diferentes especies, como hicimos con anterioridad. En este caso, la región común para todos ellos, es la compuesta por la caja A y la caja C y la secuencia intermedia, cuya organización se mantiene en todas las especies que hemos analizado. Calculando las distancias de las secuencias consenso y utilizando

el método del vecino más próximo, en el árbol obtenido se puede apreciar cómo las especies pertenecientes al Superorden Acanthopterygii aparecen juntas, separándose de las del Superorden Ostariophysii. A su vez, dentro de cada uno de ellos, se observa la separación de los diferentes órdenes. **FIGURA 35.**



**FIGURA 35:** En la parte superior de la figura, se muestra el árbol filogenético de diferentes grupos de peces basado en las distancias genéticas de la secuencia repetida ACA-72. En la parte inferior de la figura se muestra el esquema de la unidad de repetición utilizado para realizar el árbol filogenético.

## 4.2. Estudios de genómica funcional en esturiones.

### 4.2.1. Realización de hibridación sustractiva por supresión (SSH).

Para la realización de la técnica de hibridación sustractiva se establecieron dos tipos de muestras de partida: ARN proveniente de gónadas de machos y ARN procedentes de gónadas de hembras. Como se comentó con anterioridad en Material y Métodos, las muestras fueron obtenidas en ambos casos de gónadas que podían ser identificadas inequívocamente como masculina o femenina. De entre los ejemplares seleccionados, se tomaron muestras de aquellos que presentaban gónadas en estadio más inmaduro, lo que supone una edad de entre 3 y 4 años en todos los casos.

El ARN obtenido fue en la mayoría de los casos de alta calidad como se muestra en la relación 28S/18S es se encuentra alrededor de 1,2. Concentración obtenida a partir de la estación de electroforesis virtual Experion (**TABLA 17**).

Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	Ratio 28S/18S
♀F1	625,30	1.20
♀F2	821,30	1.17
♀F3	766,42	1.21
♀F4	759,01	1.24
♀F5	670,95	1.15
♂M1	178,94	1.15
♂M2	184,15	1.20
♂M3	198,93	1.17
♂M4	570,95	1.16
♂M5	400,09	1.18

**TABLA 17:** Concentración del ARN extraído y medido con la estación de electroforesis virtual Experion con el parámetro de calidad 28S/18S.

Este ARN se retrotranscribió a ADNc siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos 3.2.3. La calidad de este ADNc también es puesta de manifiesto en la **TABLA 18**.

Se analizaron los parámetros de  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{230}$  y  $A_{320}$ , el coeficiente  $A_{260}/A_{280}$ , y el  $A_{260}/A_{230}$ , todos ellos indicativos de la calidad del ADNc. Un coeficiente  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8 indica un ADN puro, nuestras muestras se encuentran alrededor de estos valores, teniendo la información de que no hay influencia por contaminación proteica de la muestra.

Mientras que el coeficiente  $A_{260}/A_{230}$  es un parámetro que nos da información sobre la posible contaminación de la muestra por péptidos, fenoles y compuestos aromáticos utilizados en la extracción, un valor entre 1,8 y 2,2 es indicativo de una buena calidad del ADN, en nuestro caso, los valores de las muestras se encuentran en este intervalo de valores, indicando la ausencia de estos compuestos que podrían interferir en las siguientes reacciones.

El parámetro A320, está relacionado con la turbidez de la muestra, siendo los valores en los ADNc obtenidos muy bajos, indicando una buena calidad de las muestras.

MUESTRA	A230	A260	A280	A320	260/280	260/230	CONCENTRACIÓN( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
♀F1	0,285	0,568	0,313	0,002	1,82	1,99	1414
♀F2	0,244	0,515	0,285	0,007	1,83	2,11	1269
♀F3	0,253	0,529	0,305	0,037	1,83	2,09	1230
♀F4	0,235	0,464	0,260	0,001	1,79	1,97	1158
♀F5	0,244	0,488	0,279	0,014	1,79	2,00	1185
♂M1	0,239	0,453	0,255	0,000	1,78	1,89	1133
♂M2	0,260	0,515	0,280	0,000	1,84	1,98	1286
♂M3	0,246	0,494	0,271	-0,005	1,81	2,01	1248
♂M4	0,264	0,510	0,281	-0,004	1,80	1,93	1284
♂M5	0,259	0,513	0,283	-0,004	1,80	1,98	1296

**TABLA 18:** Datos sobre la calidad y concentración del ADNc retrotranscrito, obtenidos a partir del Biofotómetro

Utilizando estas muestras de ADNc, se llevaron a cabo dos reacciones de hibridación:

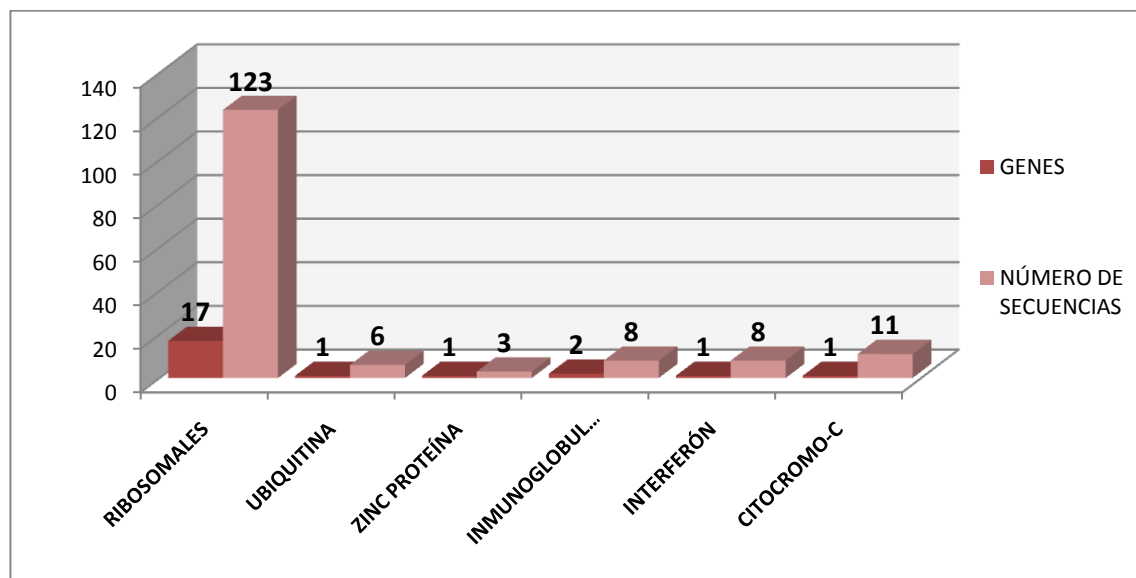
- 1) ADNc de macho usado como *tester* sobre ADNc de hembra usado como *driver* (ver Material y Métodos) para obtener una librería que hemos denominado **librería de machos**. En esta librería de machos, pretendemos encontrar genes con expresión diferencial bien activos solo en machos o reprimidos en hembras
- 2) ADNc de hembra usado como *tester* para obtener la **librería de hembras**, donde queremos poner de manifiesto aquellos genes que se activan en hembras o bien se inhiben en machos, durante el desarrollo gonadal en los ejemplares analizados.

Una vez realizadas estas reacciones, los fragmentos seleccionados correspondientes ADNc “específico” para cada sexo, fueron clonados.

#### 4.2.1.1. Librería de machos.

En la librería de machos se secuenciaron 400 clones. Las secuencias obtenidas fueron enviadas a la base de datos de GenBank usando los algoritmos BLASTN y BLASTX en búsqueda de homologías. Hemos encontrando que 241 (60,25%) no presentaron homología con ninguna de las secuencias depositadas en estas bases de datos. El resto, 159 (39,75%), tuvieron alguna coincidencia con secuencias depositadas en las bases de datos GenBank. Estas 159 secuencias variaron en tamaño entre 167 pb y 1.486 pb, con un tamaño medio de 591 pb. **Anexo VI.**

Las 159 secuencias con significado se agrupan en un total de 23 genes diferentes (**FIGURA 36**). El rango de distribución de estas secuencias varió de 2 a 19 secuencias por gen, no encontrando ningún gen que presentara homología con una única secuencia. **TABLA 19.**



**FIGURA 36:** Grafica en la que se observa el tipo de genes encontrados en la hibridación sustractiva para la genoteca de machos, relacionados con el número de secuencias en las que se han encontrado.

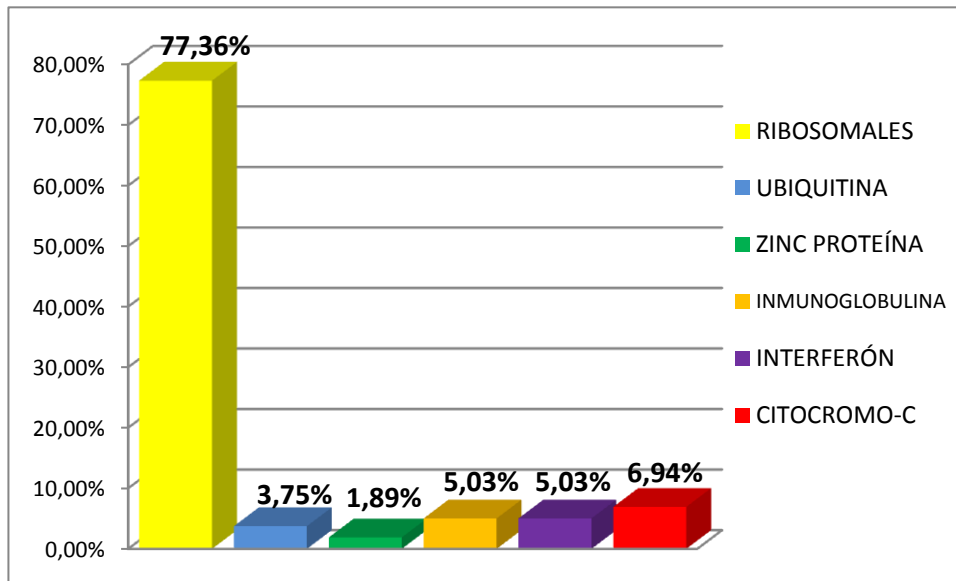
TIPO DE PROTEÍNAS	GENES	NÚMERO DE SECUENCIAS
RIBOSOMALES	17	123
UBIQUITINA	1	6
ZINC PROTEÍNA	1	3
INMUNOGLOBULINA	2	8
INTERFERÓN	1	8
CITOCROMO-C	1	11

**TABLA 19:** Resumen de todas las secuencias con significado encontradas en la genoteca de hembra al ser enviadas a la base de datos BlastX. Se indica el número de genes totales y de secuencias para esa homología.

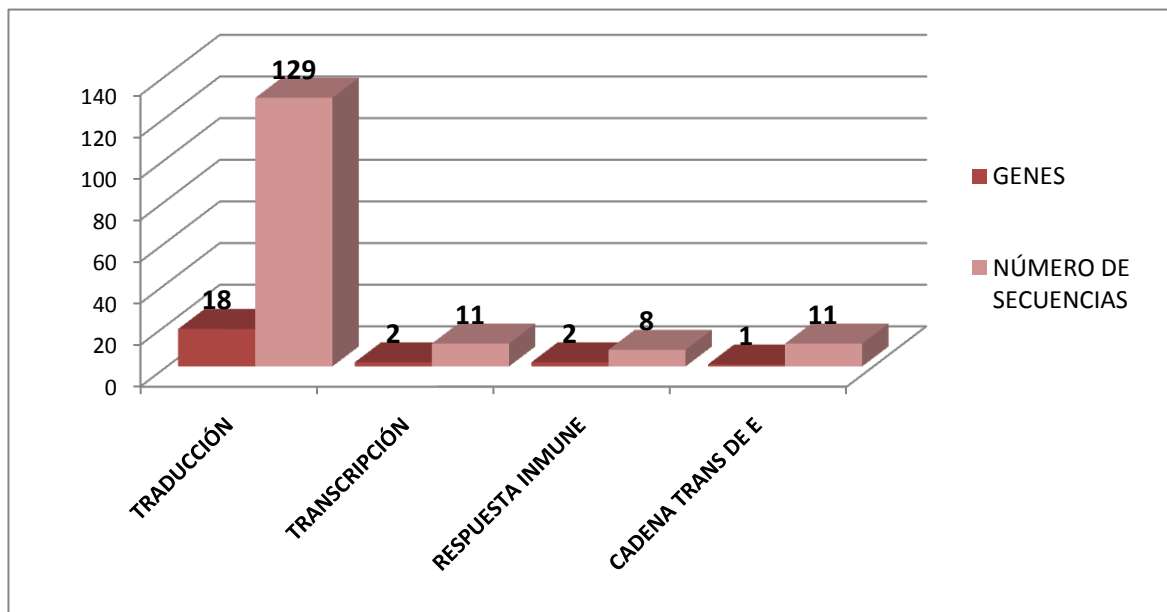
Así, del total de 159 secuencias con homología; 123 secuencias (77,36%) fueron anotadas como proteínas ribosómicas (correspondientes a 17 genes), 11 secuencias (6,94%) corresponden al gen de la citocromo-C oxidasa, 8 secuencias (5,03%) con homología con inmunoglobulinas (2 genes) y otras 8 homólogas al gen del interferon (5,03%). La ubiquitina con 6 secuencias (3,75%) y una proteína de unión al Zinc con un porcentaje del (1,89%) son las secuencias con menor porcentaje encontradas en este análisis (**FIGURA 37**).

Utilizando el programa AmiGO hemos tenido en cuenta los términos GO para dividir el conjunto de secuencias en 4 grupos basados en el **proceso biológico** que desempeñan: traducción, transcripción, respuesta inmune y cadena transportadora de electrones. La **FIGURA 38** y en la **TABLA 20** se recoge un resumen de la genoteca de machos con respecto al número de secuencias y porcentajes en cada una de las categorías de procesos biológicos.

#### 4. Resultados



**FIGURA 37:** Porcentajes de las anotaciones encontradas para las diferentes homologías procedentes de la hibridación sustractiva usando como tester al macho. En la gráfica se pone de manifiesto como las proteínas ribosomales con un porcentaje del 77,36%, predominan sobre los otros genes encontrados seguidas por las inmunoglobulinas y la proteína interferón con un 5,03% respectivamente, y encontramos proteínas del tipo citocromo con un porcentaje del 6,94%, ubiquitina con un 3,75% y con el menor porcentaje la proteína de unión al zinc con un 1,89%.



**FIGURA 38:** En la gráfica se ilustra el número de genes para cada término GO encontrado junto al número de secuencias.

TÉRMINOS GO	GENES	NÚMERO DE SECUENCIAS	PORCENTAJE
TRADUCCIÓN	18	129	81,13 %
TRANSCRIPCIÓN	2	11	6,92 %
RESPUESTA INMUNE	2	8	6,92 %
CADENA TRANSPORTADORA DE e <sup>-</sup>	1	11	5,03 %

**TABLA 20:** En la tabla se especifica el Término GO, para cada homología encontrada en la base de datos BlastX, el número de secuencias que dieron esa homología, el número de genes y el porcentaje con respecto al total de secuencias con significado.

Cuando se clasifican las proteínas encontradas en la librería de machos en función de los procesos biológicos, el grupo que presenta una mayor frecuencia, como era de esperar, es el de traducción que integra a las 17 proteínas ribosómicas y a la ubiquitina. Le sigue el grupo de proteínas implicadas en la transcripción, constituido por dos proteínas, la proteína de unión al zinc, y el factor interferón regulación factor de unión. El grupo de proteínas de respuesta inmune está constituido por dos inmunoglobulinas. Por último, el grupo de la cadena transportadora de electrones se encuentra integrado por una sola proteína, la citocromo-C oxidasa.

#### 4.2.1.2. Librería de hembras.

Con respecto a la genoteca de hembras, se secuenciaron un total de 500 clones de los cuales 364 secuencias (72,8%) no tuvieron homología con secuencias depositadas en estas bases de datos, el resto, 136 (27,2%), presentaron homología con alguna secuencias de la base de datos GenBank. Estas 136 secuencias corresponden a un total de 40 genes diferentes. De ellos, 22 tenían homología una única secuencia de la genoteca (*singleton*), mientras que los 18 restantes presentaron homología con varias secuencias (de 2 a 23), formando *contig*. El rango de longitud de las secuencias con homología varió entre 139 pb y 869 pb con una media de 624 pb. (**Anexo VII**).

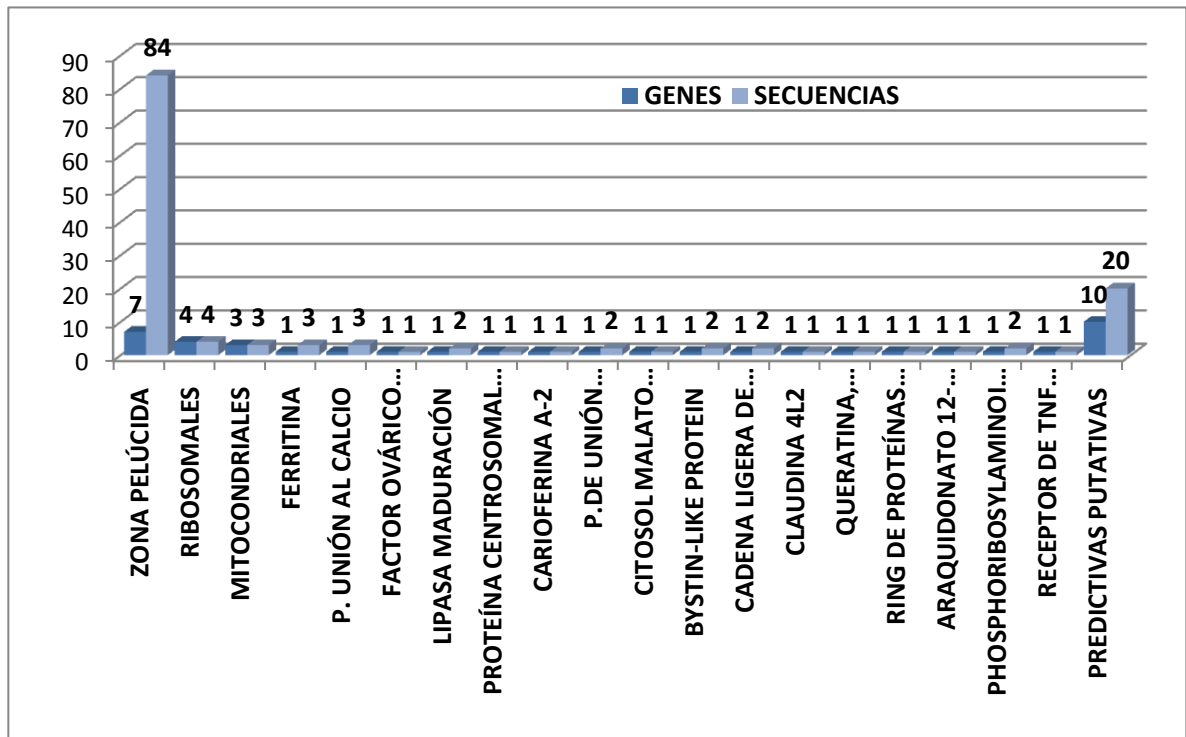
En un análisis de la distribución de secuencias anotadas, hemos realizado tres agrupaciones. Una, formada por 84 secuencias (61,76%) que están relacionadas con proteínas de la zona pelúcida (correspondientes a 7 genes diferentes). Otra formada por 32 secuencias (23,52%) con una redundancia menor (de 1 a 3) y con homologías a genes tales como ribosomales, mitocondriales, ferritina, unión al calcio... Que conforman un grupo de 23 genes. (**Anexo VI**). Una última agrupación compuesta por



#### 4. Resultados

20 secuencias (14,72%) que dan homología con 10 proteínas predictivas o putativas (**FIGURA 39**).

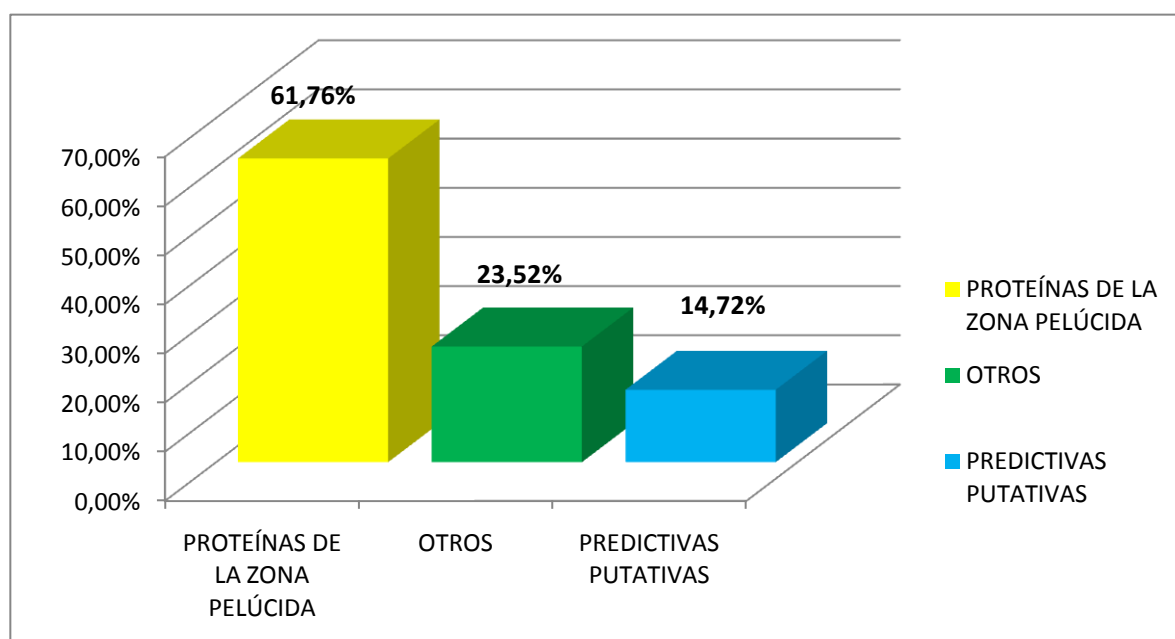
Así, en la **TABLA 21**, se enumeran los genes encontrados en esta genoteca de hembras. Los porcentajes de estos genes se reflejan en la **FIGURA 40**.



**FIGURA 39:** Relación entre número y clases de genes encontrados en la hibridación sustractiva para la genoteca de hembras con el número de secuencias.

HOMOLOGÍAS	NÚMERO DE GENES	NÚMERO DE SECUENCIAS
ZONA PELÚCIDA	7	84
RIBOSOMALES	4	4
MITOCONDRIALES	3	3
FERRITINA	1	3
P. UNIÓN AL CALCIO	1	3
FACTOR OVÁRICO ESPECÍFICO C1Q	1	1
LIPASA MADURACIÓN	1	2
PROTEÍNA CENTROSOMAL 27 KDA	1	1
CARIOFERINA A-2	1	1
P.DE UNIÓN CITOPASMÁTICA POLY A	1	2
CITOSOL MALATO DEHIDROGENASA B	1	1
BYSTIN-LIKE PROTEIN	1	2
CADENA LIGERA DE DINEÍNA CITOPASMÁTICA	1	2
CLAUDINA 4L2	1	1
QUERATINA, CITOESQUELETO	1	1
RING DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA	1	1
ARAQUIDONATO 12-LIPOXIGENASA	1	1
PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE CARBOXILASA	1	2
RECEPTOR DE TNF PROTEÍNA ASOCIADA	1	1
PREDICTIVAS PUTATIVAS	10	20

**TABLA 21:** Resumen de todas las secuencias con significado encontradas en la genoteca de hembra al ser enviadas a la base de datos BlastX. Se indica el número de genes totales y de secuencias para esa homología



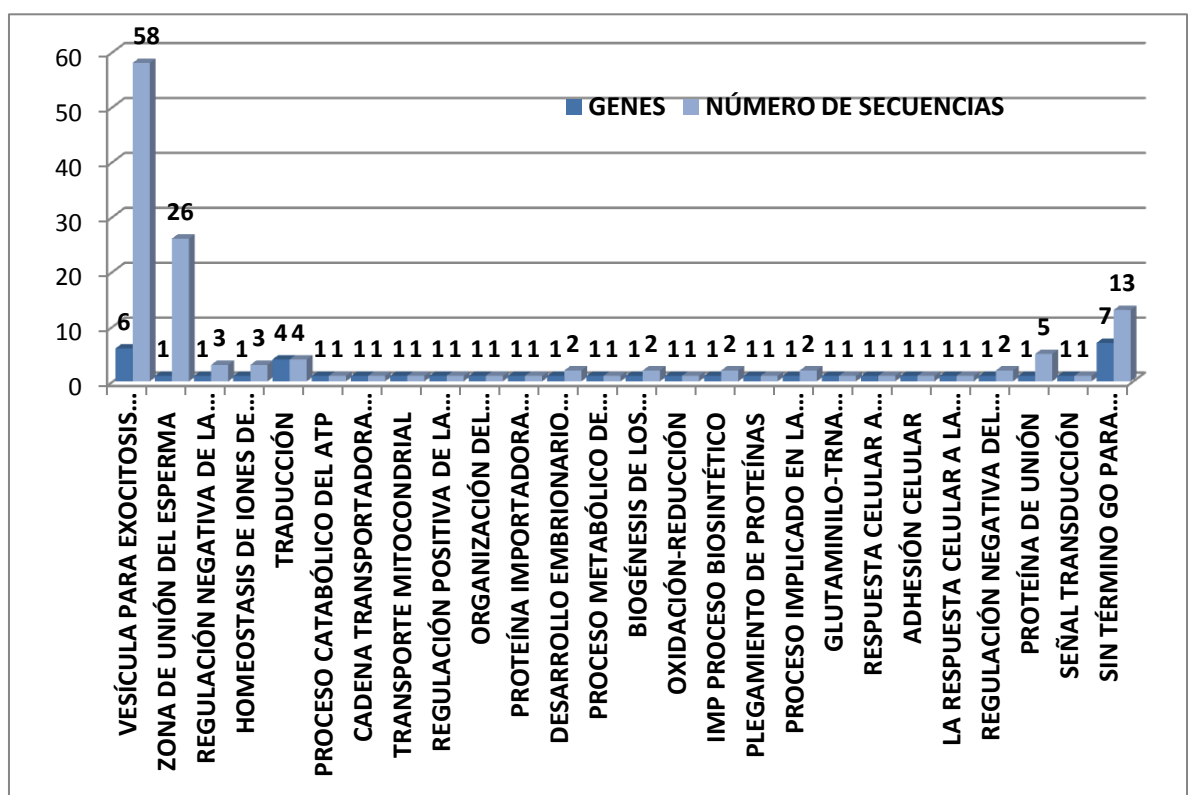
**FIGURA 40:** Resumen de las anotaciones encontradas para los diferentes clones procedentes de la hibridación sustractiva usando como tester a la hembra, en la que se observa la predominancia de proteínas relacionadas con la envoltura del huevo, seguidas por un grupo de proteínas muy variado en el que se pueden encontrar proteínas estructurales y funcionales.

#### 4. Resultados

Tal como hemos hecho con las proteínas encontradas de la genoteca de machos, hemos clasificado las anotaciones de las genoteca de hembras teniendo en cuenta los términos GO, según el programa AmiGO.

En el mismo análisis hemos señalado la frecuencia que le corresponde a cada uno de los grupos que se han formado. **TABLA 22.**

La **TABLA 22** recoge la información correspondiente al número de secuencias, homologías encontradas con secuencias depositadas en la base de datos así como los términos GO referidos a Proceso Biológico.



**FIGURA 41:** Gráfica que representa la clasificación de los distintos genes encontrados en la genoteca de hembras, teniendo en cuenta los términos GO

PROCESO BIOLÓGICO	GENES	SECUENCIAS	PORCENTAJE
VESÍCULA PARA EXOCITOSIS DEL ACROSOMA	6	58	42,63%
ZONA DE UNIÓN DEL ESPERMA	1	26	19,12%
REGULACIÓN NEGATIVA DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LA POLIMERASA II PROMOTOR DE ARN	1	3	2,20%
HOMEOSTASIS DE IONES DE HIERRO CELULAR	1	3	2,20%
TRADUCCIÓN	4	4	2,93%
PROCESO CATABÓLICO DEL ATP	1	1	0,74%
CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES	1	1	0,74%
TRANSPORTE MITOCONDRIAL	1	1	0,74%
REGULACIÓN POSITIVA DE LA ADHESIÓN CÉLULA-SUSTRATO	1	1	0,74%
ORGANIZACIÓN DEL CENTROSOMA	1	1	0,74%
PROTEÍNA IMPORTADORA DEL NÚCLEO	1	1	0,74%
DESARROLLO EMBRIONARIO DE CORDADOS	1	2	1,47%
PROCESO METABÓLICO DE CARBOHIDRATOS	1	1	0,74%
BIOGÉNESIS DE LOS RIBOSOMAS	1	2	1,47%
OXIDACIÓN-REDUCCIÓN	1	1	0,74%
IMP PROCESO BIOSINTÉTICO	1	2	1,47%
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS	1	1	0,74%
PROCESO IMPLICADO EN LA DUPLICACIÓN DEL CENTROSOMA	1	2	1,47%
GLUTAMINILO-TRNA AMINOACILACIÓN	1	1	0,74%
RESPUESTA CELULAR A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	1	1	0,74%
ADHESIÓN CELULAR	1	1	0,74%
LA RESPUESTA CELULAR A LA FALTA DE NITRÓGENO	1	1	0,74%
REGULACIÓN NEGATIVA DEL CICLO CELULAR MITÓTICO	1	2	1,47%
PROTEÍNA DE UNIÓN	1	5	3,67%
SEÑAL TRANSDUCCIÓN	1	1	0,73%
SIN TÉRMINO GO PARA PROCESO BIOLÓGICO	7	13	9,55%

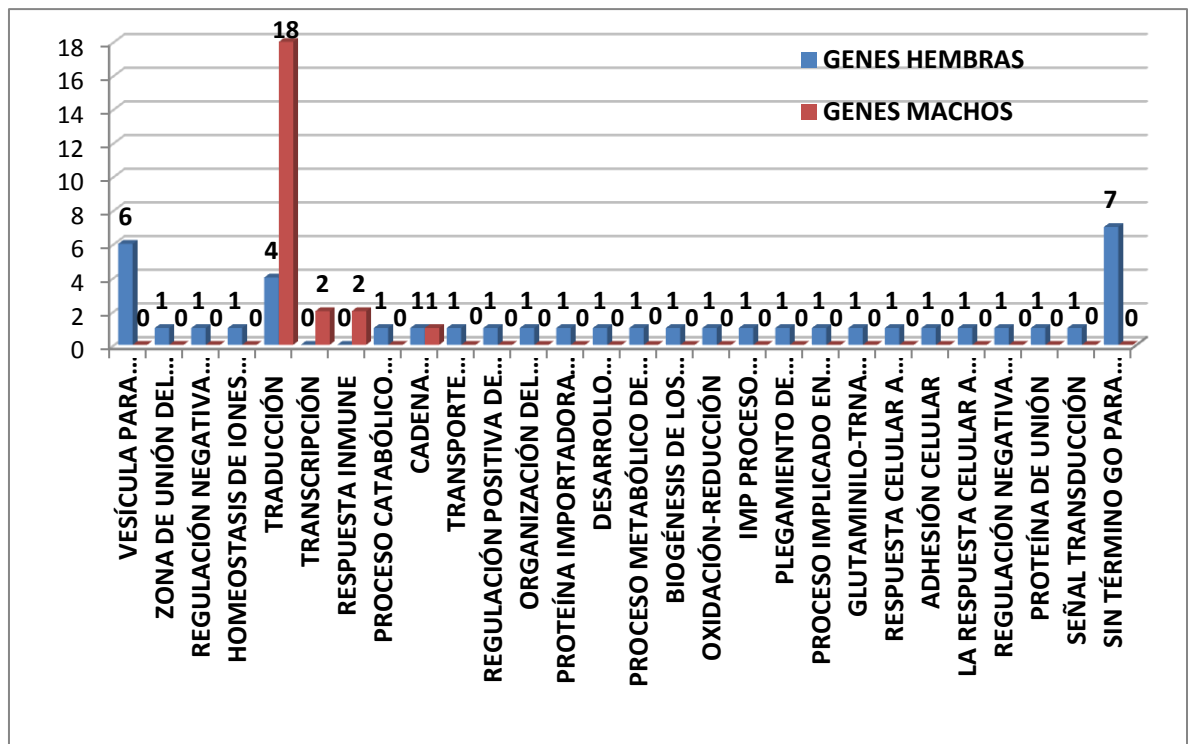
**TABLA 22:** Gráfica y tabla que recogen la información sobre los términos GO en la genoteca de hembras, con respecto al proceso biológico. En la gráfica se ilustra el número de genes para ese término, junto al número de secuencias que le corresponden. En la tabla se especifica el Término GO para cada homología encontrada en la base de datos BlastX, el número de secuencias que dieron esa homología, junto con el número de genes y el porcentaje con respecto al total de secuencias.

#### 4.2.1.3. Comparación entre genotecas.

Por último, hemos comparado el número y distribución de anotaciones encontradas en la genoteca de hembras con las obtenidas en la genoteca de machos (**FIGURA 42**). Hay que destacar la gran diversidad de homologías encontradas en la genoteca de hembras con respecto a la genoteca de machos. Mientras que los genes de macho se pueden agrupar en ribosomales, mitocondriales, proteínas de unión e inmunoglobulinas, en la genoteca de hembras se han encontrado desde genes que se

#### 4. Resultados

encuentran en la cubierta del huevo, inmunoglobulinas, proteínas de unión, hasta genes con actividad estructural, catalítica o encargados de la regulación del ciclo celular, También podemos observar como en la genoteca de hembras aparecen un número elevado de proteínas predictivas-putativas (10), mientras que en machos no aparece ninguna. Por otro lado, muchos de los genes de la hembra, presentan más de un término Go, por lo que su clasificación y posterior comparación con los de la genoteca de machos se complica.(**TABLA 23**).



**FIGURA 42:** Gráfica en la que se compara las homologías encontradas en la genoteca de machos y en la genoteca de hembras, para ello, se ha tenido en cuenta la homología y el término GO.

PROCESO BIOLÓGICO (TÉRMINO GO)	GENES HEMBRAS	GENES MACHOS
VESÍCULA PARA EXOCITOSIS DEL ACROSOMA	6	0
ZONA DE UNIÓN DEL ESPERMA	1	0
REGULACIÓN NEGATIVA DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LA POLIMERASA II PROMOTOR DE ARN	1	0
HOMEOSTASIS DE IONES DE HIERRO CELULAR	1	0
TRADUCCIÓN	4	18
TRANSCRIPCIÓN	0	2
RESPUESTA INMUNE	0	2
PROCESO CATABÓLICO DEL ATP	1	0
CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES	1	1
TRANSPORTE MITOCONDRIAL	1	0
REGULACIÓN POSITIVA DE LA ADHESIÓN CÉLULA-SUSTRATO	1	0
ORGANIZACIÓN DEL CENTROSOMA	1	0
PROTEÍNA IMPORTADORA DEL NÚCLEO	1	0
DESARROLLO EMBRIONARIO DE CORDADOS	1	0
PROCESO METABÓLICO DE CARBOHIDRATOS	1	0
BIOGÉNESIS DE LOS RIBOSOMAS	1	0
OXIDACIÓN-REDUCCIÓN	1	0
IMP PROCESO BIOSINTÉTICO	1	0
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS	1	0
PROCESO IMPLICADO EN LA DUPLICACIÓN DEL CENTROSOMA	1	0
GLUTAMINILO-TRNA AMINOACILACIÓN	1	0
RESPUESTA CELULAR A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	1	0
ADHESIÓN CELULAR	1	0
LA RESPUESTA CELULAR A LA FALTA DE NITRÓGENO	1	0
REGULACIÓN NEGATIVA DEL CICLO CELULAR MITÓTICO	1	0
PROTEÍNA DE UNIÓN	1	0
SEÑAL TRANSDUCCIÓN	1	0
SIN TÉRMINO GO PARA PROCESO BIOLÓGICO	8	0

**TABLA 23:** Tabla en la que se comparan las distintas homologías encontradas para machos y para hembras, utilizando los Términos GO relacionados con procesos biológicos para realizar esta comparativa.

#### 4.2.2. Caracterización y expresión de genes de interés.

Teniendo en cuenta las anotaciones obtenidas en la hibridación sustractiva tanto de macho como de hembras, realizamos una selección de aquellos genes que pudieran estar involucrados en la diferenciación y desarrollo gonadal. En este sentido, ninguna de las secuencias de la genoteca de machos estaban involucradas en este proceso. Sin embargo, en la genoteca de hembras, hemos encontrado varios genes que son susceptibles de ser utilizados en un estudio de expresión diferencial entre sexos. Estos genes son los pertenecientes a la cubierta del huevo (familia de genes

de la zona pelúcida), el gen de la ferritina y el gen que codifica para la proteína de unión al calcio.

### 4.2.2.1. Genes relacionados con la cubierta del huevo

Como ya se ha comentado con anterioridad, tras analizar la librería de hembra, 84 secuencias daban homología con glicoproteínas de la zona pelúcida del huevo (a partir de ahora ZP) en otra especie de esturión, concretamente con el esturión chino *A. sinensis*. Esta gran cantidad de secuencias homólogas encontradas en la librería, unido a la función protectora de ovocito de esta proteína (Ver introducción) nos llevó a seleccionar estos genes para un estudio más profundo.

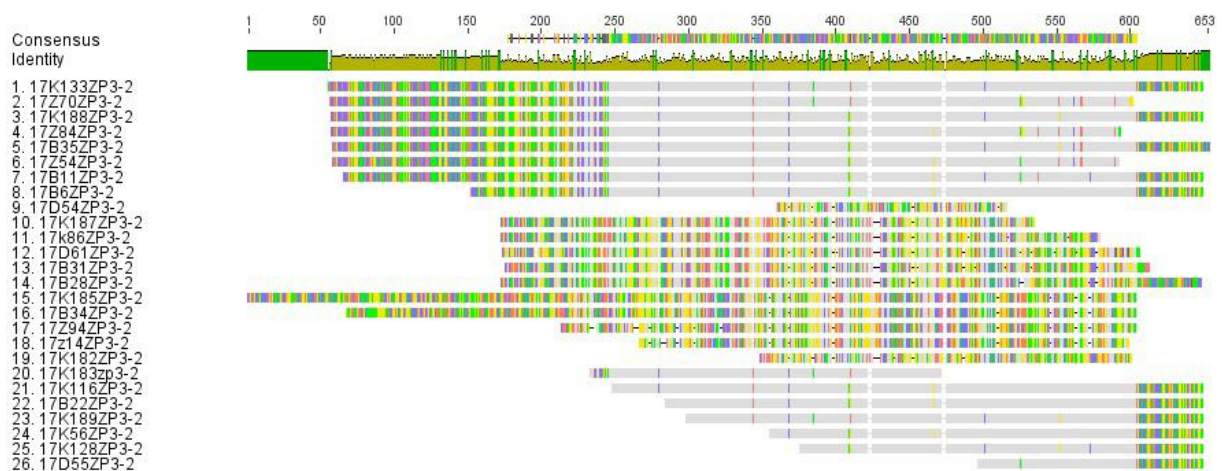
En el conjunto de secuencias obtenidas mediante hibridación sustractiva que han sido anotadas como pertenecientes a la familia ZP (84), podemos distinguir que 42 de ellas son pertenecientes a la subfamilia ZP3.

Debido a que los genes ZP3 presentan una organización compleja de varios genes parálogos, se decidió hacer un análisis con las secuencias de todos los clones. En primer lugar, las secuencias se agruparon en función de las anotaciones obtenidas a partir de las bases de datos (**Anexo VI** y **Anexo VII**).

Así, del conjunto de 42 secuencias, 26 presentaban una homología media del 95% con la secuencia nucleotídica de la proteína ZP3.2 de *A. sinensis* (FJ610234; Chuang-Ju et al., 2011).

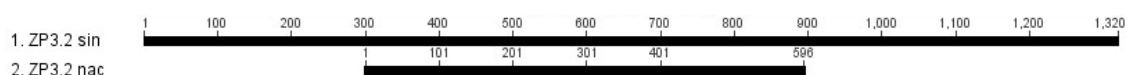
El tamaño medio de estas secuencias es de 411.4pb, con 148pb la secuencia más corta y 593pb la más larga.

Realizamos un alineamiento con éstas utilizando el programa Geneious 4.8.4 (Biomatters. 2009) que nos permitió obtener un contig (incluyendo las 26 secuencias) con un tamaño de 596pb. La **FIGURA 43** muestra un esquema de las secuencias utilizadas y del contig obtenido.



**FIGURA 43:** Figura realizada por el programa informático Genious que representa el alineamiento de las 26 secuencias obtenidas de la hibridación sustractiva que tenían homología con ZP3.2 de *A. sinensis*, y forman un contig con un tamaño de 596pb.

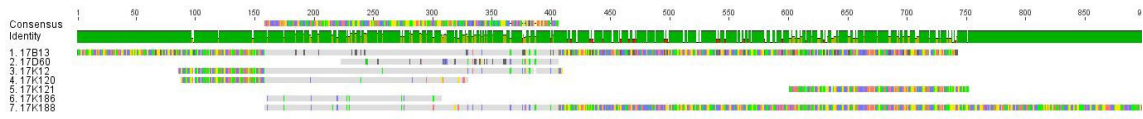
El contig obtenido para la proteína ZP3.2 perteneciente a la especie *A. naccarii*, lo alineamos con la secuencia nucleotídica de la misma proteína depositada en la base de datos y perteneciente a la especie *A. sinensis*. La secuencia de la proteína ZP3.2 en *A. sinensis* tiene un total de 1288pb (sin contar la cola de poli-A). La secuencia de *A. naccarii* se alinea entre las posiciones 300 y 896 en la secuencia de *A. sinensis*, con una homología del 97.8% (**FIGURA 44**).



**FIGURA 44:** En la que se muestra el alineamiento realizado entre el contig de 596pb de ZP3.2 de *A. naccarii* y la secuencia de *A. sinensis*. Con una homología del 97,8%.

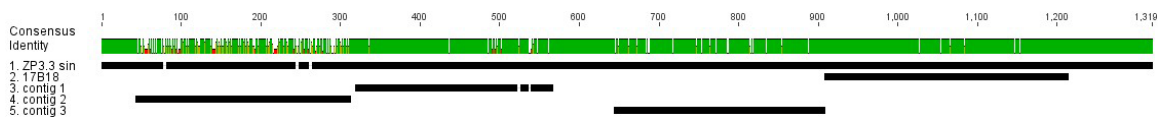
Las 16 secuencias restantes presentan una homología media del 92% con la secuencia de la proteína ZP3.3 del esturión *A. sinensis* (HM067972, Chiang-Ju et al 2011). El tamaño medio de dichas secuencias es de 335pb, oscilando entre 147pb la secuencia más corta y 843pb la secuencia más larga. El alineamiento de las mismas y el ensamblaje realizado mediante el programa Geneious, agrupó las secuencias en tres contig: el contig 1 engloba a 7 secuencias, el contig 2 incluye 4 secuencias y el contig 3 agrupa 4 secuencias; quedando entonces 1 secuencia como singleton. La **FIGURA 45** muestra como ejemplo la agrupación de secuencias perteneciente al contig 1.





**FIGURA 45:** Contig 1 , con un tamaño de 246 nucleótidos, formado por la agrupación de 7 secuencias que dieron homología con la proteína ZP3.3, utilizando el programa Geneious.

Sobre la secuencia de nucleótidos de la proteína ZP3.3 de *A. sinensis* buscamos las posiciones que ocupaban los 3 contig y el singleton, de manera que el contig 1 se encuentra entre las posiciones 315 a la 561; el contig 2 entre la 44 y la 307; el contig 3 entre la 639 y la 902, y el singleton está comprendido entre la posición 903 y la 1207 de *A. sinensis* (**FIGURA 46**).



**FIGURA 46:** Ordenamiento de los distintos contings y el singleton, utilizando como molde la secuencia de nucleótidos de la proteína ZP3.3 de *A. sinensis*.

Del análisis de estos contig, se comprobó que en ningún caso se habían obtenido las secuencias completas de los genes. Para completar tales secuencias, se decidió utilizar la información de los genes ZP3.2 y ZP3.3 de *A. sinensis* para diseñar primers en los extremos de la secuencia de estos genes y poder amplificarlos en *A. naccarii*.

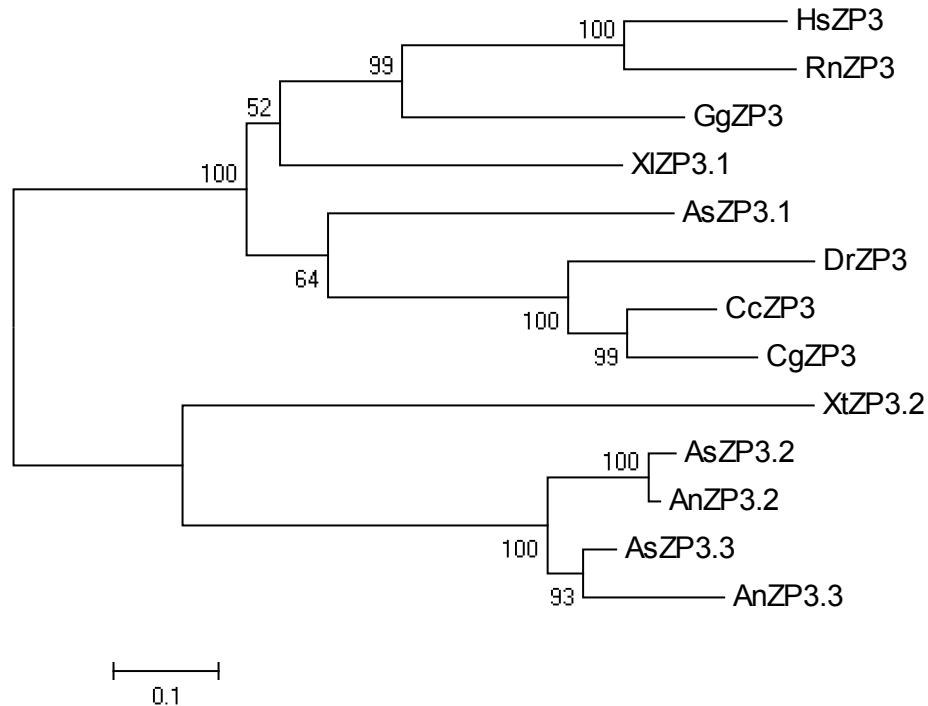
Así, en el caso de la proteína ZP3.2, los primers forward y reverse diseñados se corresponde con las posiciones 1-21 y 1268-1288 respectivamente de la secuencia de *A. sinensis*. Dichos primers amplifican en ADNc de *A. naccarii* un fragmento de aproximadamente 1300pb. En concreto, la secuencia de nucleótidos de ZP3.2 en *A. naccarii* tiene una longitud de 1299pb (sin contar la cola de poli-A). El alineamiento de esta secuencia con la secuencia nucleotídica de ZP3.2 de la especie *A. sinensis*, presentaba una homología del 95%.

Para la proteína ZP3.3, los primers forward y reverse se encuentran localizados respectivamente en las posiciones 1-22 y 1255-1273 en el esturión chino. Con estos primers amplificamos en cDNA un fragmento de 1273pb en *A. naccarii*. La homología de estas secuencias del gen ZP3.3 entre las dos especies de esturión es del 93.9%.

En la especie *A. naccarii* la homología de las secuencias de cDNA para los genes ZP3.2 y ZP3.3 es del 86.9%, valor similar al encontrado entre estos dos genes en la especie *A. sinensis* (86%; Chuang-Ju et al 2011). La homología entre las cuatro secuencias de estos dos genes entre las dos especies es del 88.4%.

Las secuencias obtenidas para los genes ZP3.2 y ZP3.3 en *A. naccarii* fueron utilizadas para realizar un análisis filogenético en el cual se utilizaron genes ZP3 de varias especies de vertebrados (rana, pollo, humano y peces), incluidos los caracterizados en la especie de esturión *A. sinensis*. El cladograma obtenido se muestra en la **FIGURA 47**.

Podemos diferenciar dos clados: uno formado por las secuencias ZP3, (agrupando juntas las pertenecientes a mamíferos (Hs y Rn), más relacionadas con las secuencias de aves (Gg) y anfibios (XI) y bien separadas de las de peces (As, Dr, cc y Cg). El segundo clado engloba las secuencias ZP3.2 y ZP3.3. La del anfibio *Xenopus tropicalis* aparece separada de las secuencias de esturión. En el caso de los esturiones vemos que se agrupan juntas las secuencias correspondientes a los genes independientemente de la especie de esturión de la que vengan.



**FIGURA 47:** *Homo sapiens* (HsZP3, AAA61336); *Rattus norvegicus* (RnZP3, NP\_446214); *Gallus gallus* (GgZP3, NP\_989720); *Xenopus laevis* (XIZP3.1, NP\_001081657); *Xenopus tropicalis* (AAI58454); *Cyprinus carpio* (CcZP3, CAA88836); *Carassius gibelio* (CgZP3, AAD53947); *Danio rerio* (DrZP3, NP\_571406); *A. sinensis* (AsZP3.-1, ACO54852; AsZP3.2, ACO54853; AsZP3.3, ADH93592)

De esta forma queda probado que hemos amplificado de forma diferencial las secuencias correspondientes a los genes ZP3.2 y ZP3.3 en *A. naccarii*.

La secuencia ZP3.2 de *A. naccarii* tiene un marco abierto de lectura de 1185pb que comienza con el codón de inicio ATG en la posición 18 y termina con el codón de Stop TGA en la posición 1202. Podemos señalar la secuencia de poliadenilación (AGTAAA) a 11 posiciones antes de la cola de poli-A.

De la misma forma que ocurre en *A. sinensis*, cuando el péptido señal de 20 aa es eliminado, el péptido maduro consta de un residuo de 374 aa. Presenta un putative N-linked glycosylation site at residue Asn (posición 241)*azul*, las 8 cisteínas ocupan las posiciones 8, 37, 56, 93, 166, 189, 229 y 247 respectivamente *rojo* y podemos señalar los aa conservados de un parche hidrofóbico interno (posiciones 116, 119 y 121)*verde*. **(FIGURA 48)**

```

1 ATCGTCTGTGTTTCACGATGAGTTATTCTGAGCAGTGTGTTTGTGGCC 50
M E L F L S S V L L A -11
51 CTTTGCTGTATTCCCTTTGCAGCACACAGGACGCTGGACTGTAGTCTG 100
-20 L C C I P F A A P Q D A G T V V 8
101 TGGTGTGGACTCTGTCAAGTGTGAGAGTGTGCTGAACATTGGGCAGGCTC 150
G V D S V S V R V L L N I G Q A L 25
151 TTCCTGTGGACCCAAAGGCTTTCTATTGGGAAGCTGCTCTCCGTCACC 200
P L D P K G F L L G S S P S T 41
201 GGCAGCTACAACCTGTGCAATTCCAAATCCGGCTGCTGACTGCAAGTT 250
G S Y N T V Q F Q S G L L D R F 58
251 TATGGCATGGTACTTCCAGCATCATCAGTACATGAATGTGCTGACGT 300
M R M V T S S I I S Y M N V L T Y 75
301 ACCAGCCACCCAGAGTGGCTTCTACCCAGACTCCATTCACCTCAGGCTATT 350
Q P T Q S G F Y Q T P F T Q A I 91
351 GTGTGCACCTACACCAAATTTCTGCTGGACTCCTCCAGTATATAACC 400
V T Y T K L S G W T P P V Y N P 108
401 TGCACCTGGGATGCTTCTGGTGGGAAAGCTGGAGTTTACAATGGGA 450
A L G D A S G G K E T M G I 125
451 TTATGAATGAGGAAATCTCAAGCCCCCGCACCTCCAGTCTGTCTCTCTG 500
M N E E F S A P R T S S L F F L 141
501 GGGTCCCCCATCAACATGCGAGCCGCAAGTGAAGCAGCAATTCACATGCC 550
G S P I N I A A A V K Q Q F H M P 158
551 GCTGATGGTCTACGTGGAAAGTGTGTCGCTGCCAGCACTCCACAGCTGA 600
L M V Y V E E V A A S T P Q L S 175
601 GCCCTTCAAGCCAGACCTACCCCTCATGCGCAACCAGGATGCTTTGTA 650
P S S Q T Y P L I A N H G F V 191
651 GATGGCAGGCTGTAGCTCCAGGTCTCTGCCAGAGTCCAGACTCCGA 700
D G Q A A S S R F L P R V Q T S E 208
701 GATCCGCTKGTGTTGCCAGGCTTCAAGTTCACCAACTGAAACACAGATG 750
I R L V V Q A F K F T Q L N T D V 225
751 TCTATATCCATTGCCAGYHGCTGGCCTGGRACCCTGCCAGCTMAGTAAC 800
Y I H Q R L A W N P A Q L S 241
801 CCCACCAAGAAAGCCTGTTCAATTCACCCAGAGATCCAGGAGCTGGGAGCT 850
P T K K A S F N Q R S R S W E L 258
851 CCTGGATAACCCCTGTCAGAGCTCTGTGTGCAGCTGCTGTACTCCAACT 900
L D N P G Q S S V C S C C T S N C 275
901 GCAATATGAGGAAGAGGAGAGACACAGCTGAAGAGGACTGAGACGCACT 950
N M R K R R R D T A E E G L R R T 291
951 GCAAGTCTGGGACCCTGAGGATCCCTGCTGAGAGCTGCTGCTGGAAG 1000
A V L G P L R I L P E E L S A G S 308
1001 CCAGGAATTCACAGAGGAGCCCTGCTCTATCACTGGAGGAACCAAAGC 1050
Q E F Y Q R S P A L S L E E P K Q 325
1051 AGGCTCTGGCCCTGGCTGCTGCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1100
A L A W L P V L A A P L L M M V 341
1101 GTCCTGGGAGCCCTGCTCTGAGCTACTACATGTGCGTGTGGCAACATCC 1150
V L G A L S L S Y Y M C V W Q H P 358
1151 CAGACTTGACTCAAAGTCCAGCGGTAGAATTCTCATCTCTGCAACCCACT 1200
R L D S K S S G R I L I P A P H + 374
1201 GATGAAATTCACACAGCACTCGGCAAGGTTCCATCAGTTCGCCAGCACA 1250
1251 GCAATACTGGTTTCATCTTTGTATGCTGATGAGTAAATGTCTGCCCGA 1300
1301 AAAAAAAAAAAAAA 1315

```

**FIGURA 48:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *A. naccarii*, sobre las que se han señalado: en cursiva la secuencia de los primers para obtener la secuencia completa; subrayados se muestran los 20aa correspondientes al péptido señal y la letra en color negro indica el primer aa del péptido maduro; en azul el residuo Asn (en posición 241) un putative N-linked glycosylation site, también se señalan las 8 cisteínas que ocupan las posiciones 8, 37, 56, 93, 166, 189, 229 y 247 respectivamente en color rojo y los aa conservados de un parche hidrofóbico interno (posiciones 116, 119 y 121) en color verde. En amarillo se muestra la secuencia de los primers que se han utilizado para la cuantificación.

Las 1273pb de la secuencia ZP3.3 de *A. naccarii* codifican un péptido señal de 20aa y un péptido de maduro de 377aa. Este péptido maduro contiene un putative N-linked glycosylation en el residuo Asn (posición 68) azul, y seis sitios O-linked glycosylation en las posiciones 5, 42, 138, 174, 268 y 365 (rojo) **FIGURA 49**.

```

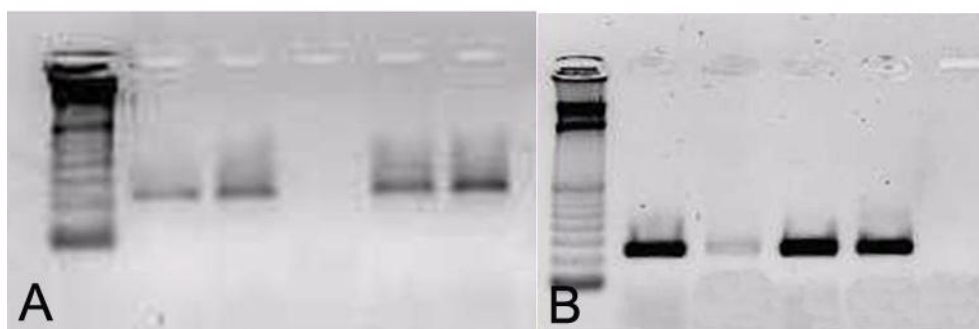
1  CAGATAACTTTTGGCTTTGGAAAGATGGGGTGCCTTGTGGAAATGTGTTTGT 50
   M G C L W K C V L L L -10
51  TGGTCTTTTCTGTATTCCCTTTGCAGCACCACAGGAAGCTGTGAGTATA 100
-20  V L C C I P F A A P Q E A V I 6
101  GCTGCGGTGTGGACTCTGTGGCTGTGAGGGTGTGTGGATTACTCTCG 150
    A C G V D S V A V R V L L D Y S R 23
151  ATCGGGGTGCTCTGGACCCGAGTGGCTCCTGCTGGGACCCTGTCTC 200
    S A L P L D P S G L L L G P C P P 40
201  CATCCAGCAGCAGCCCGGTAATAACATGGTGGTGTTCAGTACGGGCTG 250
    S S S A G N N M V V F Q Y G L 56
251  CTGGACTGCGCTTTATGCGCATGGTTACTGCCAATGTTACCAGTTACAT 300
    L D C R F M R M V T A V T S Y M 73
301  GAATGTGCTGACCTACAAGCCACCCAGAGAGGCTTCTACAGACTCCAT 350
    N V L T Y K P T Q R G F Y Q T P F 90
351  TCAATCAGGCTATTGTGTCACTATACCAAACCTGCTGGCTGGACTCCT 400
    N Q A I V C T Y T K P A G W T P 106
401  CCAATGTATAACCCCTGCACTCGGGATGCCCTGGGTTTGGGAAGCTGGA 450
    P V Y N P A L G D A S G F G K L E 123
451  GTTTACCATGGGGATTATGAATGATGACTTCTCAGCCTCACGCACTCCA 500
    F T M G I M N D D F S A S R S S 140
501  GTCTGTTCTTCTGGGGTCCCCATCAACATCGCGGCTGCAGTGAAGCAG 550
    L F F L G S P I N I A A A V K Q 156
551  CAATTOCCATGCGCTGATGGTCTACATGGAAGAGTGTGTGCTGCCA 600
    Q F H M P L I G L H G R V C C C Q 173
601  GCACTCCAGAGCTGAGCCCTCAAGCCAGACTACCCGCTCAACCAAC 650
    S R A E P F K P D L P A H H Q P 190
651  CACGGGTCTTTGTAGACGGCCAGGTGTAACTTCCAGGTTTCTGCCAGA 700
    R V F V D G Q V V T S R F L P R 206
701  ATCCAGACTCTGAGATCCGCTCGGTTGTCCAGGCCCTCAGGTTTACACA 750
    I Q T S E I R L V V Q A F R F T Q 223
751  AAAGAATAAGATGTATATAATCATGCGGGTGTGCTGGCTGGGACCCTG 800
    K N T D V Y I H C R L L A W D P A 240
801  CCCAGCTCAATGACCCCAAGAAAGTCTGTTTCATCAACCAAGAGAACC 850
    Q L N D P T K K V C S F N Q R T 256
851  AGGAGCTGGGAGCTCCTGGATAACCCCTGGTCAGAGCTCTGTGTGACAG 900
    R S W E L L D N P G Q S V C S C 273
901  CTGTACTTCCAACTGCAATTGAGGAAGAGGAGGGAACGGCTGAGAGG 950
    C T S N C N L R K R R D T A E E G 290
951  GACTGAGACACACTGCACTGCTGGGACCCCTGAGGATCCCTCCTGAAG 1000
    L R H T A V L G P L R I L P E E 306
1001  CTGTCTGCTGGAAGCCAGGAATCTACAGAGGAGCCCTGCTCTGTCACT 1050
    L S A G S Q E F Y Q R S P A L S L 323
1051  GGAGGAGCCCCAGCAGGCTCTGGCCCTGGCTGCTGTCTGCTGCTCC 1100
    E E P Q Q A L A W L P V L A A P L 340
1101  TGCTCTGATGGCTGTCTGGAGCCCTGCTCTGGGCTACTACATGTGC 1150
    L L M A V L G A L S L G Y Y M C 356
1151  GTGTGGGTCATCCAGACTCTGCTCCAAGTCCAGCAGTGAAGCTCTCG 1200
    V W R H P R L C K S S S E L L R 373
1201  TTCCTGTCGCTGTTGATGAAATGCAACAGCAGTGGCACGGTTTCCAGC 1250
    S C R C * 377
1251  AGGTCCAGCAAAGCAATCTGATTTGTATGTTGCAA 1288

```

**FIGURA 49:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *A. naccarii*, sobre las que se han señalado: en cursiva las secuencias de los primers que se han usado para amplificar la secuencia completa. Los aa subrayados indican el péptido señal, el aa marcado en color negro indica el inicio de la secuencia del péptido maduro. Un putative N-linked glycosylation en el residuo Asn (posición 68) está marcado en azul y los seis sitios O-linked glycosylation están marcados en rojo. En verde se muestra la secuencia de los primers que se han utilizado para la cuantificación.

En este trabajo hemos analizado los niveles de expresión diferencial del gen ZP3.2 y ZP3.3 en tejido gonadal de hembras y machos de distintos ejemplares de esturión *A. naccarii*. Para llevar a cabo este objetivo, hemos utilizado los primers que cita la bibliografía y que se han usado para la misma tarea en el esturión *A. sinensis* (Chuang-Ju et al., 2011). Las secuencias de las dos parejas de primers están señaladas en amarillo y verde respectivamente en la **FIGURA 48** y **FIGURA 49**).

Con la pareja de primer ZP3.2 y AsZP3.2-RTR hemos amplificado un único fragmento de 221pb correspondiente al gen ZP3.2 y con los primers ZP3.3 y AsZP3.3-RTR se amplifica un fragmento de 235pb correspondiente al gen ZP3.3 en muestras de cDNA de gónada de machos y de hembras, mediante PCR convencional (**FIGURA 50**). (Las condiciones de amplificación se explican en Material y Métodos apartado 3.2.14).



**FIGURA 50:** **A.** Foto que corresponde al amplificado de ZP3.2 de ambos sexos, con un tamaño de 221pb en *A. naccarii* utilizando los primers que cita la bibliografía. **B.** Amplificado de Zp3.3 utilizando los primers de la bibliografía sobre el ADN de *A. naccarii* de hembra y de macho.

Realizamos el análisis de la expresión de estos genes en las muestras de tejido gonadal tanto de hembras como de machos mediante PCR cuantitativa. Las condiciones de amplificación, réplicas, así como condiciones para amplificar el gen de la  $\beta$ -actina se explican en Material y Métodos apartado 3.2.14).

La cuantificación de la expresión diferencial para el gen ZP3.2 y ZP3.3 entre machos y hembras se ha llevado a cabo mediante el método 2 delta-delta Ct ( $2\Delta\Delta Ct$ ) que proporciona el software del termociclador iQ5, (Ver Material y Métodos apartado 3.2.14) y la **TABLA 24** muestra los valores medios de Ct así como la desviación standar para el gen ZP3.2 y para la  $\beta$ -actina, y la **TABLA 25** muestra los valores medios de Ct así como la desviación standar para el gen ZP3.3 y para la  $\beta$ -actina.

Muestras	Genes	Cuantificación Relativa	Rel Quant SD	Corrected Rel Quant SD	Mean Ct	Ct SD
hembras	ZP3.2	1,00000	0,50036	0,50036	19,50	0,72186
machos	ZP3.2	0,00221	0,00439	0,00439	28,32	2,86269
hembras	$\beta$ -actina	0,93280	0,35754	0,35754	20,47	0,55298
machos	$\beta$ -actina	1,00000	0,69499	0,69499	20,37	1,00266

**TABLA 24:** Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen ZP3.2, junto los valores para la  $\beta$ -actina

Para el gen ZP3.2 observamos un valor medio de Ct más bajo (19.50) en el caso de las hembras que en el caso de los machos (28.32), indicando que para las primeras, obtenemos amplificado para este gen varios ciclos antes que en machos. En el caso del gen de la  $\beta$ -actina, observamos valores similares en Ct para hembras y para machos.

Muestras	Genes	Cuantificación Relativa	Rel Quant SD	Corrected Rel Quant SD	Mean Ct	Ct SD
hembras	ZP3.3	1,00000	0,26176	0,26176	18,24	0,37763
machos	ZP3.3	0,00789	0,00747	0,00747	25,23	1,36615
hembras	$\beta$ -actina	1,00000	0,17554	0,17554	20,59	0,25325
machos	$\beta$ -actina	0,97538	0,44590	0,44590	20,63	0,65953

**TABLA 25:** Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen ZP3.3, junto los valores para la  $\beta$ -actina.

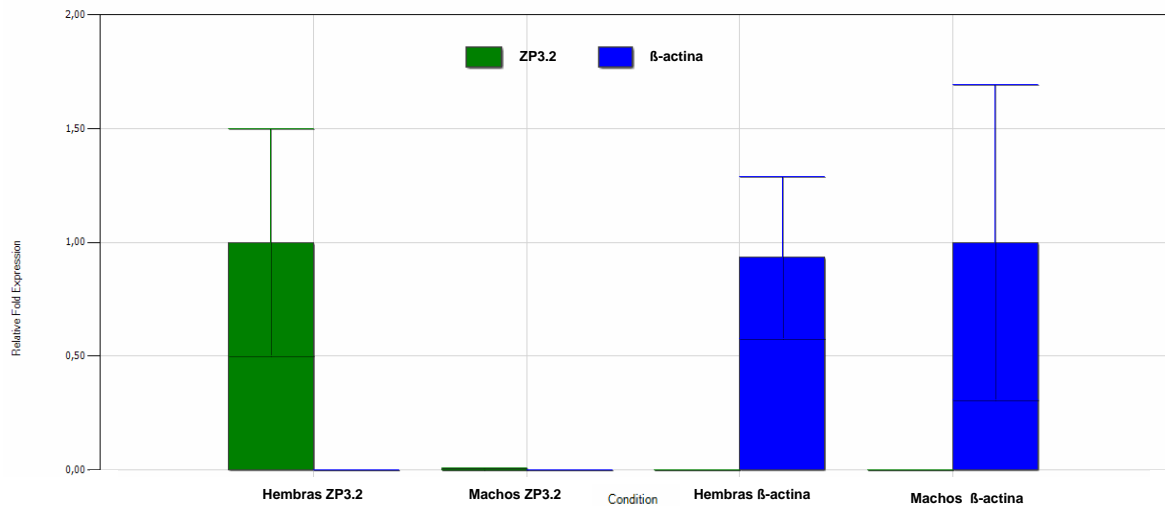
Para el gen ZP3.3 observamos un valor medio de Ct más bajo (18.24) en el caso de las hembras que en el caso de los machos (25.23), indicando que para las hembras obtenemos amplificado para este gen varios ciclos antes que en machos. En el caso del gen de la  $\beta$ -actina, observamos valores similares en Ct para hembras y para machos.

Si comparamos los valores medios de Ct entre hembras y machos de los distintos genes, comprobamos que los valores en las hembras son similares (19.50 y 18.24) y en los machos (28.32 y 25.23) respectivamente para ZP3.2 y ZP3.3. En ambos experimentos, los valores medios de Ct están en torno a 20.5 en ambos sexos en la  $\beta$ -actina.

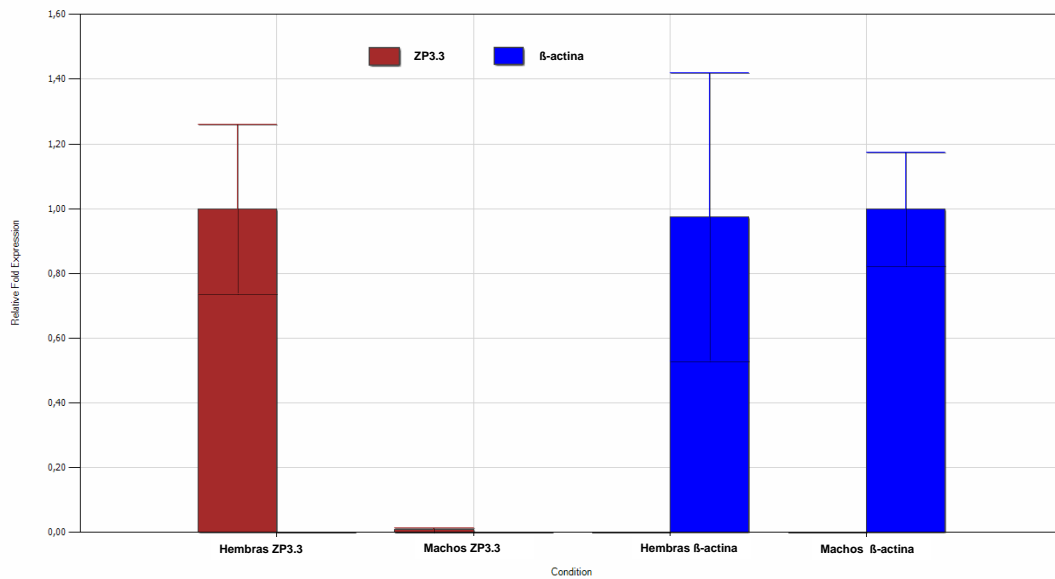


#### 4. Resultados

Estos valores medios de Ct los podemos representar en una gráfica. Como hemos comentado, para el gen de la  $\beta$ -actina no hay diferencias en los niveles de expresión en ambos sexos. Para los genes ZP3.2 y ZP3.3, sí se observa una expresión diferencial en hembras con respecto a machos.



**FIGURA 51:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen ZP3.2, entre machos y hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación standar para ambos genes.



**FIGURA 52:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen ZP3.3, entre machos y hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación standar para ambos genes.

(I) Muestras	(J) Muestras	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 99%		Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Hembras ZP3.2	Machos ZP3.2	-8,80*	1,20	0	-12,62	-4,99	-11,48	-6,12
	Hembras $\beta$ -actina	-0,97	1,59	0,55	-6,01	4,07	-4,52	2,57
	Machos $\beta$ -actina	-0,86	1,59	0,59	-5,91	4,17	-4,41	2,67
Machos ZP3.2	Hembras ZP3.2	8,80*	1,20	0	4,99	12,62	6,12	11,48
	Hembras $\beta$ -actina	7,83*	1,59	0,001	2,78	12,87	4,28	11,38
	Machos $\beta$ -actina	7,93*	1,59	0,001	2,89	12,98	4,39	11,48
Hembras $\beta$ -actina	Hembras ZP3.2	0,97	1,59	0,55	-4,07	6,01	-2,57	4,52
	Machos ZP3.2	-7,83*	1,59	0,001	-12,87	-2,78	-11,38	-4,28
	Machos $\beta$ -actina	0,10	1,90	0,95	-5,92	6,13	-4,13	4,34
Machos $\beta$ -actina	Hembras ZP3.2	0,86	1,59	0,59	-4,17	5,91	-2,67	4,41
	Machos ZP3.2	-7,93*	1,59	0,001	-12,98	-2,89	-11,48	-4,39
	Hembras $\beta$ -actina	-0,10	1,90	0,95	-6,13	5,92	-4,34	4,13

**TABLA 26:** El asterisco (\*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.

Los valores marcados con un asterisco indican diferencias de medias que son consideradas estadísticamente significativas para  $P < 0.01$  y para  $P < 0.05$ .

Como ya indicábamos, existe expresión diferencial en tejido gonadal entre hembras y machos tanto para el gen ZP3.2 como el ZP3.3 (y no hay diferencias de expresión en este tejido entre machos y hembras para el gen de la  $\beta$ -actina).

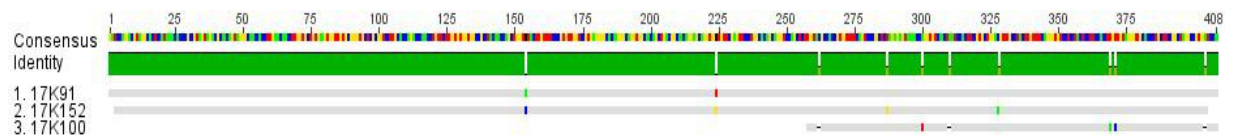
(I) Muestras	(J) Muestras	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		Intervalo de confianza al 99%	
					Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Hembras ZP3.3	Machos ZP3.3	-6,98*	0,67	0	-8,63	-5,33	-9,49	-4,48
	Hembras $\beta$ -actina	-2,69*	0,75	0,01	-4,53	-0,84	-5,49	0,11
	Machos $\beta$ -actina	-2,04*	0,75	0,03	-3,89	-0,19	-4,84	0,75
Machos ZP3.3	Hembras ZP3.3	6,98*	0,67	0	5,33	8,63	4,48	9,49
	Hembras $\beta$ -actina	4,29*	0,75	0,001	2,44	6,14	1,49	7,09
	Machos $\beta$ -actina	4,94*	0,75	0,001	3,09	6,79	2,14	7,74
Hembras $\beta$ -actina	Hembras ZP3.3	2,69*	0,75	0,01	0,84	4,53	-0,11	5,49
	Machos ZP3.3	-4,29*	0,75	0,001	-6,14	-2,44	-7,09	-1,49
	Machos $\beta$ -actina	0,64	0,82	0,46	-1,37	2,66	-2,42	3,71
Machos $\beta$ -actina	Hembras ZP3.3	2,04*	0,75	0,03	0,19	3,89	-0,75	4,84
	Machos ZP3.3	-4,94*	0,75	0,001	-6,79	-3,09	-7,74	-2,14
	Hembras $\beta$ -actina	-0,64	0,82	0,46	-2,66	1,37	-3,71	2,42

**TABLA 27:** El asterisco (\*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.

#### 4.2.2.2. Análisis del gen de la ferritina.

Tres secuencias de la genoteca de hembras de *A. naccarii*, con longitudes de 151pb, 402pb y 408pb, al enviarlas a la base de datos de GenBank, revelaron una

homología media del 95%, con la proteína ferritina caracterizada en el esturión chino *A. sinensis* (ABY81252; Xiao-wu et al., 2009). El alineamiento de estas tres secuencias de *A. naccarii* generó un contig con una longitud total de 408pb, coincidente con el tamaño de la secuencia mayor. (**FIGURA 53**).



**FIGURA 53:** Alineamiento realizado con el programa Geneious, en el que se observa como las tres secuencias con homología para la ferritina, se solapan generando un único contig de 408pb.

Al comparar ahora las secuencias nucleotídicas entre las dos especies de esturión, comprobamos que el contig generado se alinea entre las posiciones 90 y 497 de la secuencia de *A. sinensis*, con una homología del 97.3% entre ambas (**FIGURA 54**).



**FIGURA 54:** Alineamiento realizado con el programa Geneious en el que se detalla el alineamiento obtenido entre nuestro contig con la secuencia de la ferritina de *A. sinensis*, ambas secuencias se alinean, con una homología del 97,3%.

Esta secuencia consenso fue enviada a la base de datos GenBank (BlastX), obteniéndose una homología del 99% con el cDNA de la ferritina del esturión chino y se obtuvo un valor de E-value de 2,00E-80.

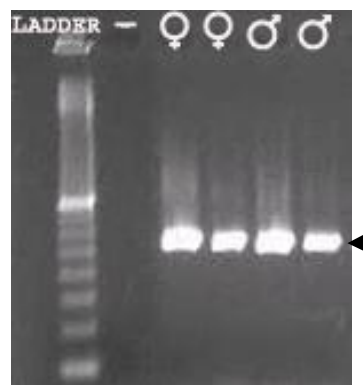
Para poder caracterizar el gen completo en *A. naccarii*, se diseñaron unos primers (FER R/F. Material y métodos.3.2.5.1) usando como base la secuencia de *A. sinensis*. El primer directo se encuentra entre las posiciones 1-20 y el reverso entre la 511-531 del esturión chino (**FIGURA 56**). Estos primers permitieron amplificar un fragmento de aproximadamente 600pb de este gen en *A. naccarii* a partir de cDNA de tejido gonadal de machos y hembras (**FIGURA 55**). Las bandas amplificadas, se

escindieron del gel y fueron clonadas por separado, tanto por sexo como por individuo.

Se secuenciaron 8 clones (dos clones por individuo y por sexo) que fueron alineados entre sí obteniéndose una homología del 97%. La secuencia consenso de estos clones se muestra en la **FIGURA 57**.

La traducción de esta secuencia de *A.naccarii* a proteína mostró un residuo de 176 aa que presentaba una homología del 98.1% en comparación con la secuencia de aa de *A. sinensis*, comprobando de esta forma que teníamos la secuencia completa de la proteína en *A. naccarii*. En esta secuencia podemos señalar las posiciones correspondientes a la Hélice A (11-39), Hélice B (46-73), Hélice C (93-121), Hélice D (124-155) y Hélice E (161-171) que conforman la proteína en *A. sinensis*.

Hemos analizado los niveles de expresión diferencial del gen ferritina en tejido gonadal de hembras y machos de distintos ejemplares de esturión *A. naccarii*. Para llevar a cabo este objetivo, hemos utilizado los primers que se diseñaron para obtener la secuencia completa del gen en *A. naccarii*. Las secuencias de las dos parejas de primers están señaladas en cursiva en la **FIGURA 56** y las condiciones de amplificación se explican en Material y Métodos apartado 3.2.5.1



```

1 ATGGAGTCTCAGATTGCGCCAGAACTACCACCGTGACTGCGAGGCAGCCGTCAATCGCATG 60
1 M E S Q I R Q N Y H R D C E A A V N R M 20

61 GTCAACATGGAGCTGTTTGGCGTCTACACGTACCTGTGCGATGGCTCACTATTTCTCCCGC 120
21 V N M E L F A S Y T Y L S M A H Y F S R 40

121 GATGATGTCGCTCTGAAGGGCTTCTCCAAGTTCTTCAAGGAGCAGAGCGAGGAGGAGCGG 180
41 D D V A L K G F S K F F K E Q S E E E R 60

181 GAGCACGCGGACAAGCTCCTGTCTTCCAGAACAAGAGAGGAGGCCGCATCTTCTGCGAG 240
61 E H A D K L L S F Q N K R G G R I F L Q 80

241 GACATCAAGAAACCCGAGAAGGACGAGTGGGGCTCTGGGCTGGAGGCTCTGCAGTCGGCT 300
81 D I K K P E K D E W G S G L E A L Q S A 100

301 CTGGTGTCTGGAGAAGAACGTGAACCAGGCTCTGCTGGACCTGCACAAGATCGCCTCCGAG 360
101 L V L E K N V N Q A L L D L H K I A S E 120

361 AAAACTGACCCGCACATGTGTGATTTCTGGAGACACATTACCTCAACGAGCAGGTCGAA 420
121 K T D P H M C D F L E T H Y L N E Q V E 140

421 GCCATCAAGAACTGGGAGACCACATCACCAACCTCAAGAAGATGGGAGCTCCCAGCAAT 480
141 A I K K L G D H I T N L K K M G A P S N 160

481 GGCATGGCAGAGTACCTGTTTCGACAAGCTCACCTTGGAGAGCAGCAGCTAA 531
161 G M A E Y L F D K L T L E S S S * 176

```

**FIGURA 56:** Secuencia de nucleótidos y aa de la proteína ferritina en *A. naccarii*. Los nucleótidos en cursiva indican las posiciones de los primers y los aminoácidos subrayados señalan las hélices A, B, C, D y E (11-39; 46-73; 93-121; 124-155; 161-171) respectivamente.

Realizamos el análisis de la expresión de este gen en las muestras de tejido gonadal tanto de hembras como de machos mediante PCR cuantitativa. Las condiciones de amplificación, réplicas, así como condiciones para amplificar el gen de la  $\beta$ -actina se explican en Material y Métodos apartado 3.2.14.

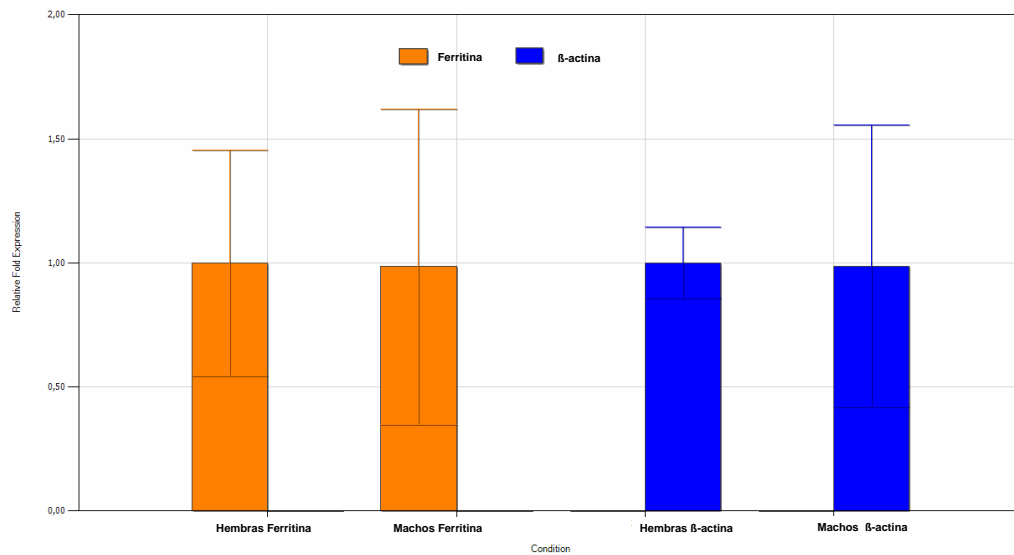
La cuantificación de la expresión diferencial para el gen ferritina entre machos y hembras, se ha llevado a cabo mediante el método 2 delta-delta Ct ( $2\Delta\Delta Ct$ ) que proporciona el software del termociclador iQ5, (Ver Material y Métodos apartado 3.2.14. ) y la **TABLA 28** muestra los valores medios de Ct así como la desviación standar para este gen y para la  $\beta$ -actina.

Muestras	Genes	Cuantificación relativa	Rel Quant SD	Corrected Rel Quant SD	Mean Ct	Ct SD
hembras	Ferritina	1,00000	0,38766	0,38766	30,29	0,55927
machos	Ferritina	0,50990	0,18601	0,18601	31,26	0,52630
hembras	$\beta$ -actina	1,00000	0,14310	0,14310	19,61	0,20645
machos	$\beta$ -actina	0,98721	0,56784	0,56784	19,63	0,82984

**TABLA 28:** Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen de la ferritina, junto los valores para la  $\beta$ -actina

Para el gen ferritina observamos un valor medio de Ct similar tanto en el caso de hembras (30.29) como de machos (31.26) en el caso de las hembras que en el caso de los machos, indicando que obtenemos amplificado para este gen prácticamente al mismo tiempo. En el caso del gen de la  $\beta$ -actina, observamos valores similares en Ct para hembras y para machos (19.6) y similares a los obtenidos para el análisis de los genes ZP.

Cuando estos valores medios de Ct los representamos en una gráfica, no hay diferencias en los niveles de expresión en ambos sexos en ninguno de los dos genes analizados.



**FIGURA 57:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión del gen de la ferritina, entre machos y hembras, observando que en ambos sexos este gen tiene la misma expresión, al igual que el gen usado como referencia, el gen de la  $\beta$ -actina. En la gráfica también se observa la desviación standar para ambos genes.

Mediante el análisis de varianza de un factor (Stat/ANOVA/One-Way) seguido de un análisis MSD (Desviación Cuadrática Media) posthoc para comparaciones múltiples, comprobamos que las diferencias no eran significativas, de manera que para el gen de la ferritina, no hay expresión diferencial en la gónada de hembras y machos.



#### 4. Resultados

(I) Muestras	(J) Muestras	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 99%		Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Hembras Ferritina	Machos Ferritina	-81	48,50	0,14	-260,83	98,83	-199,69	37,69
	Hembras $\beta$ -actina	624,50*	54,23	0	423,43	825,56	491,79	757,20
Machos Ferritina	Machos $\beta$ -actina	613,50*	54,23	0	412,43	814,56	480,79	746,20
	Hembras Ferritina	81	48,50	0,14	-98,83	260,83	-37,69	199,69
Hembras $\beta$ -actina	Hembras $\beta$ -actina	705,50*	54,23	0	504,43	906,56	572,79	838,20
	Machos $\beta$ -actina	694,50*	54,23	0	493,43	895,56	561,79	827,20
Machos $\beta$ -actina	Hembras Ferritina	-624,50*	54,23	0	-825,56	-423,43	-757,20	-491,79
	Machos Ferritina	-705,50*	54,23	0	-906,56	-504,43	-838,20	-572,79
Machos $\beta$ -actina	Machos $\beta$ -actina	-11	59,40	0,85	-231,25	209,25	-156,37	134,37
	Hembras Ferritina	-613,50*	54,23	0	-814,56	-412,43	-746,20	-480,79
Machos $\beta$ -actina	Machos Ferritina	-694,50*	54,23	0	-895,56	-493,43	-827,20	-561,79
	Hembras $\beta$ -actina	11	59,40	0,85	-209,25	231,25	-134,37	156,37

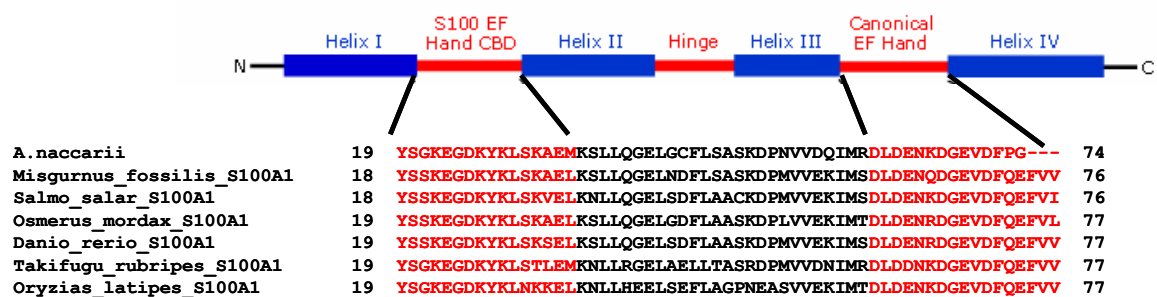
**TABLA 29:** El asterisco (\*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que la expresión del gen de la ferritina son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.

#### 4.2.2.3. Análisis del gen de unión al Calcio (S100 CALCIUM BINDING).

En la hibridación sustractiva se obtuvieron 3 clones con una longitud de 271, 269 y 271pb respectivamente que presentaron una homología media del 84% con secuencias de la proteína de unión a calcio "S100 calcium binding protein A1" pertenecientes a la especie *Misgurnus fossilis* (Q7LZT1) depositada en la base de datos de GenBank. Así, el contig formado por las tres secuencias (**FIGURA 58**) que presenta homología con la proteína S100A1 de este pez se traduce en un residuo de 74 aa comprendidos entre la metionina inicial (M) y el aminoácido fenilalanina (F) del canonical EF hand. La **FIGURA 59** muestra la estructura de la proteína S100A1, dos bucles de unión al calcio cada uno de ellos flanqueado por dos hélices alpha (Marenholz et al., 2004). Los dos bucles de unión al calcio se han señalado en el alineamiento de secuencias de diferentes especies de peces donde hemos incluido la de *A. nacara*.

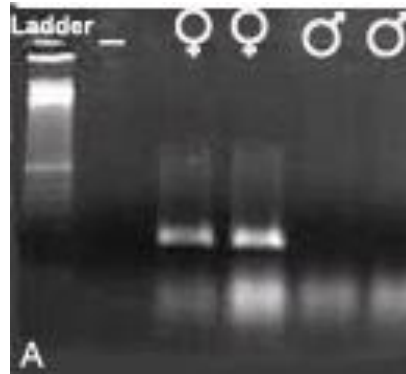


**FIGURA 58:** Figura realizada por el programa informático Geneious que representa el alineamiento de las 3 secuencias obtenidas de la hibridación sustractiva que tenían homología con S100 calcium binding protein A1 de *A. sinensis*, y forman un contig con un tamaño de 271pb



**FIGURA 59:** La figura muestra los dos bucles de unión al calcio se han señalado en el alineamiento de secuencias de diferentes especies de peces donde hemos incluido la de *A. naccarii*.

Hemos analizado la expresión del gen S100 calcium binding protein en tejido gonadal de machos y hembras del esturión *A. naccarii*. Para tal fin, hemos diseñado una pareja de cebadores usando como base la secuencia consenso de los 3 clones obtenidos mediante hibridación sustractiva en *A. naccarii*, y que mediante PCR convencional amplifican un fragmento de aproximadamente 200pb en cDNA de gónadas de hembras encontrando ausencia de amplificado cuando usamos cDNA de gónadas de macho (**FIGURA 60**). (Las condiciones de amplificación se encuentran detalladas en Material y Métodos, apartado 3.2.5.1).



**FIGURA 60:** Electroforesis de la PCR realizada con los primers diseñados para Calcium Binding, en cDNA se observa que mientras que en hembras hay amplificación de un tamaño de 200pb, en machos no existe amplificado.

Para comprobar la ausencia de amplificación en gónadas masculinas, realizamos el análisis de la expresión de este gen en las muestras de tejido gonadal tanto de hembras como de machos mediante PCR cuantitativa. Las condiciones de amplificación, réplicas, así como condiciones para amplificar el gen de la  $\beta$ -actina se explican en Material y Métodos apartado 3.2.14).

De la misma forma que en el estudio de los genes anteriores, la cuantificación de la expresión se ha llevado a cabo mediante el método 2 delta-delta Ct ( $2\Delta\Delta Ct$ ) que proporciona el software del termociclador iQ5, (Ver Material y Métodos apartado 3.2.14) y la **TABLA 30** muestra los valores medios de Ct así como la desviación standar para el gen S100 calcium-binding y para la  $\beta$ -actina.

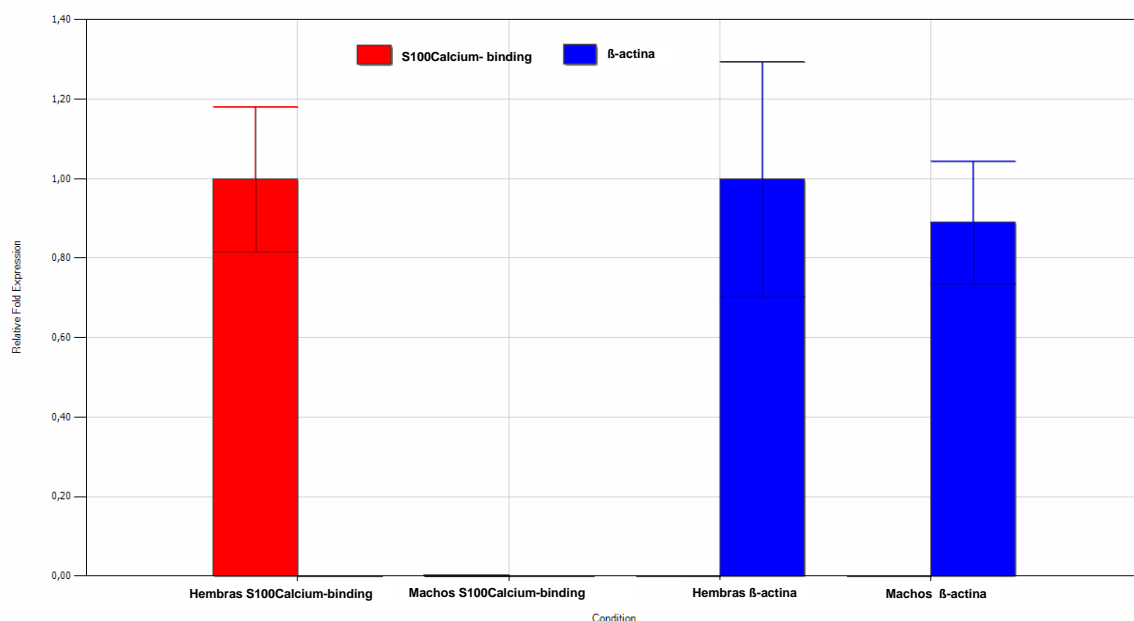
Muestras	Genes	Cuantificación relativa	Rel Quant SD	Corrected Rel Quant SD	Mean Ct	Ct SD
hembras	S100Calcium-binding	1	0,18181	0,18181	21,90	0,26229
machos	S100Calcium-binding	0,00085	0,00017	0,00017	32,09	0,28753
hembras	$\beta$ -actina	1	0,29521	0,29521	20,35	0,42590
machos	$\beta$ -actina	0,89152	0,15355	0,15355	20,51	0,24848

**TABLA 30:** Tabla suministrada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestran los valores medios de Ct, así como la desviación standar para el gen S100 calcium-binding, junto los valores para la  $\beta$ -actina

Para el gen *S100 calcium-binding* observamos un valor medio de Ct mucho más bajo en el caso de las hembras (21.90) en comparación con la de machos (32.09). Como ya veníamos observando, en el caso del gen de la  $\beta$ -actina encontramos valores similares en Ct para hembras y para machos (alrededor de 20.5) y similares a los obtenidos en análisis anteriores.

Esta diferencia entre hembras y machos de más de 10 puntos en los valores de Ct para el gen *S100 calcium-binding*, se ve reflejada cuando los representamos en una gráfica (**FIGURA 61**).

Mediante el análisis de varianza de un factor (Stat/ANOVA/One-Way) seguido de un análisis MSD (Desviación Cuadrática Media) posthoc para comparaciones múltiples, comprobamos que las diferencias eran significativas, de manera que para el gen *S100 Calcium-binding* existe expresión diferencial en tejido gonadal entre hembras y machos de esturión (**TABLA 31**).



**FIGURA 61:** Gráfica proporcionada por el programa del termociclador iQ5, en el que se muestra la expresión diferencial en el gen Calcium binding, entre machos y hembras, mientras que el gen de la  $\beta$ -actina, tiene la misma expresión para ambos sexos, también se señala la desviación estándar para ambos genes.

#### 4. Resultados

(I) Muestras	(J) Muestras	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 99%		Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Hembras Calcium-binding	Machos Calcium-binding	-10,18 <sup>*</sup>	0,17	0,00	-10,69	-9,68	-10,56	-9,81
	Hembras $\beta$ -actina	1,56 <sup>*</sup>	0,17	0,00	1,05	2,07	1,19	1,93
	Machos $\beta$ -actina	1,39 <sup>*</sup>	0,17	0,00	0,88	1,89	1,01	1,76
	Hembras Calcium-binding	10,18 <sup>*</sup>	0,17	0,00	9,68	10,69	9,81	10,56
Machos Calcium-binding	Hembras $\beta$ -actina	11,75 <sup>*</sup>	0,17	0,00	11,24	12,26	11,38	12,12
	Machos $\beta$ -actina	11,57 <sup>*</sup>	0,17	0,00	11,07	12,08	11,20	11,95
	Hembras Calcium-binding	-1,56 <sup>*</sup>	0,17	0,00	-2,07	-1,05	-1,93	-1,19
	Machos Calcium-binding	-11,75 <sup>*</sup>	0,17	0,00	-12,26	-11,24	-12,12	-11,38
Hembras $\beta$ -actina	Machos $\beta$ -actina	-,176	0,17	0,33	-0,68	0,33	-0,54	0,19
	Hembras Calcium-binding	-1,39 <sup>*</sup>	0,17	0,00	-1,89	-0,88	-1,76	-1,01
	Machos Calcium-binding	-11,57 <sup>*</sup>	0,17	0,00	-12,08	-11,07	-11,95	-11,20
Machos $\beta$ -actina	Hembras $\beta$ -actina	0,17	0,17	0,33	-0,33	0,68	-0,19	0,54

**TABLA 31:** El asterisco (\*) indica aquellos valores en los que la diferencia de medias es significativa al nivel 0.01 y al nivel 0.05. En las tablas se muestran los valores que nos indican que las diferencias de expresión del gen calcium binding entre machos y hembras son significativas, basándonos en los métodos estadísticos que hemos aplicado.

## **5. DISCUSIÓN**



La discusión de esta Memoria se ha estructurado en dos apartados generales que vienen marcados por los dos grupos de especies estudiadas (peces planos y esturiones) así como los análisis llevados a cabo en cada uno de estos grupos (Genómica estructural y Genómica funcional). Así, se ha realizado: (1) un análisis del ADN repetido, inicialmente en especies de peces planos y luego ampliado a otros grupos de peces. Se han caracterizado varias familias de ADN repetido y se han hecho estudios evolutivos y filogenéticos, (2) un estudio de expresión genética diferencial entre machos y hembras del esturión *Accipenser naccari* de genes relacionados con la diferenciación gonadal y caracterizados previamente mediante hibridación sustractiva.

## **5.1. Estudios de Genómica estructural: ADN repetido en peces planos.**

### **5.1.1. ADN satélite centromérico**

El mayor componente de los genomas eucariota es el que comprende a las familias de ADN repetido. Este ADN repetido generalmente puede estar organizado bien en bloques en tándem o en secuencias repetidas dispersas dependiendo a las distintas organizaciones genómicas. A su vez, el ADN repetido puede clasificarse según su abundancia en el genoma como ADN altamente repetido o moderadamente repetido

El ADN altamente repetido en tándem es el denominado ADN satélite. Esta fracción del ADN suele localizarse en bloques heterocromáticos en zonas cromosómicas concretas, tales como regiones centroméricas y pericentroméricas así como en regiones subteloméricas, existiendo también familias de este ADN repetido acumuladas en regiones intersticiales (Plohl et al 2012). En este trabajo se han caracterizado en el grupo de peces planos (Orden Pleuronectiformes) tanto a nivel molecular como citogenético dos familias de ADN satélite, la familia Sacl en la especie *H. hippoglossus* (fletan) y la familia de ADN satélite Pvull en las especies del Género *Solea*, *S. senegalensis*, *S. solea* y *S. lascaris*. En este sentido, previamente sólo se habían caracterizado en este Orden otros dos ADN satélite. La familia AI-HindIII en la especie *Achirus lineatus* (Familia Achiridae) por Azevedo et al. (2005) y el ADN satélite Dral de acedía *Dicologloglossa cuneata* (Familia Soleidae) por De la Herrán et al., 2008).



### 5.1.1.1. Características moleculares.

La longitud típica de la unidad de repetición del ADN satélite varía entre 160 y 180 pb o 320-360 pb (Sharman & Raina 2005; Plohl et al., 2008). Los ADN satélites caracterizados en peces planos están incluidos dentro de estos dos rangos. Así, el ADN satélite aislado en la especie *Hippoglossus hippoglossus*, presentó una longitud de la unidad monomérica entre 330 y 337 pb. Por otro lado, la secuencia Pvull aislada en especies del Género *Solea* presentaron longitudes entre 160-177 pb en sus secuencias consensos. El tamaño de la unidad monomérica del ADN satélite Pvull, se asemeja a los tamaños de las unidades de repetición tanto del ADN satélite *Al-HindIII* caracterizado en *Achirus*, que presenta una longitud de 204 pb y al ADN satélite *Dral* de *Dicologlossa cuneata* con una longitud de 171pb. Es interesante recalcar que esta última especie, con longitud muy similar, pertenece a la misma Familia (Soleidae) al igual que las especies del género *Solea*.

En general, las longitudes de unidades de repetición de ADN satélite, observadas en otras especies de peces, presentan longitudes correspondientes al rango menor, sobre todo aquellos ADNs satélites con localización centromérica (Choo, 1997), tal como ocurre con los ADN satélites centroméricos *EcoRI* de espáridos (Garrido Ramos et al. 1995 y De la Herrán et al., 2001), *HpaI* de salmón (Viñas et al., 2004) o *PstI* de esturiones (Robles et al. 2005,) y los ya enumerados con anterioridad de peces planos.

Sin embargo, la longitud del monómero *SacI* del fletan entraría dentro del rango mayor de longitud. Este tamaño mayor de la unidad de repetición viene motivado por la rápida evolución que pueden sufrir estas secuencias en los que intervienen fenómenos de duplicación y posterior divergencia. Esto es lo que parece haber ocurrido en el caso del satélite *EcoRI* descrito en De la Herrán et al., 1998 en la especie *Pagellus bogaraveo* que presenta una longitud de 372, el doble que en el resto de especies de espáridos debido a una duplicación de la unidad de repetición.

En resumen, podríamos decir en peces en general y en peces planos en particular, parecen estar favorecidos evolutivamente estos dos rangos de

longitud de monómeros para sus ADN satélites, al igual que se ha descrito en otro grupos de animales como los insectos (Palomeque y Lorite., 2008).

En cuanto a su secuencia, podemos señalar que al igual que en los dos satélites ya mencionados caracterizados en peces planos y al igual que en otras especies de peces tanto de agua dulce como marinos (Ekker, Fritz & Westerfield., 1992; Garrido-Ramos et al., 1994; Koehler et al., 1997; Reed, Dorschner & Phillips., 1997; Fischer et al., 2000; Robles et al., 2004) presentan, tanto PvuII y SacI, un alto porcentaje de A-T, existiendo series cortas consecutivas de cada uno de estos nucleótidos a lo largo de la secuencia.

Asimismo, se puede destacar que, dentro de los ADNs satélites analizados, existen regiones que se repiten de forma directa o inversa, lo que pondría de manifiesto un posible origen de la unidad de repetición a partir de duplicaciones de una secuencia ancestral más pequeña. De hecho, este es el caso descrito para el ADN satélite Dral de *D. cuneata* generado a partir de una secuencia inicial de 9 nucleótidos (De la Herrán et al., 2008)

En cuanto a la homología entre unidades de repetición, en ambos ADN satélite hemos encontrado que es muy elevada, alcanzando en el caso del satélite SacI del fletan valores del 100% entre algunos clones. Este dato no es raro, al menos en este grupo de peces planos, puesto que los dos ADNs satélites analizados hasta ahora presentan también una gran homología entre sus secuencias (Azevedo et al. 2005, De la Herrán et al. 2008). Este hecho ha sido observado en otros grupos de organismo para otros ADNs satélites como los casos de el satélite detectado en *Tenebrio molitor* (Phohl et al. 1992) y el satélite HindIII de especies de los géneros *Ostrea* y *Crassostrea* (López-Flores et al., 2009). Dos son las razones aducidas para explicar tan alta identidad entre unidades de repetición en la misma especie: por un lado, podría deberse a la presencia de una secuencia monomérica “canónica” en el genoma de tales especies. Por otro, y como se discutirá posteriormente, puede ser debido a los procesos moleculares intrínsecos que operan en este tipo de secuencias repetidas, en las cuales, además de los procesos de cambio producidos por mutación, intervienen mecanismos de homogenización, tales como entrecruzamiento desigual entre cromátidas hermanas y no hermanas, conversión génica y transposición (Charlesworth et al., 1994). Por tanto, los

datos obtenidos para estos dos ADN satélite caracterizados para peces planos en esta Memoria, mostrarían una alta eficacia en los mecanismos de homogenización, algo que parece característico en todas las secuencias repetidas aisladas hasta este momento en especies de peces planos.

### **5.1.1.2. Localización cromosómica.**

Todas estas características reseñadas en el apartado anterior (tamaño de monómero, porcentaje de AT y presencia de motivos repetidos) para las familias Sacl y Pvull, son comunes a la mayoría de los ADNs centroméricos (Singer., 1982; Garrido Ramos et al., 1995; Choo et al., 1977).

En este sentido, tal como demuestra la hibridación in situ, estas dos familias de ADN satélite se localizan en la región centromérica de la mayoría de los cromosomas del complemento de cada especie (**FIGURA 10** y **FIGURA 16**), tal como cabría esperar de sus características moleculares.

Esta localización es compartida con los otros dos satélites caracterizados en estudios previos en peces planos, el de acedía y el de *Achirus*.

En peces, se ha descrito la presencia de un satélite particular en los centrómeros de todos los cromosomas del complemento como ocurre en los espáridos (Garrido-Ramos et al., 1999), en *Oreochromis niloticus* (Ferreria et al., 2000; Martin et al., 2008) e incluso, en el pez plano *Achirus* (Azevedo et al., 2005). Sin embargo, la ausencia de señales de hibridación en algunas parejas cromosómicas, no es un hecho excepcional, puesto que también se ha observado en otras especies de peces (Phillips y Reed., 1996; Viñas et al., 2004, Robles et al., 2003), incluido el ADN satélite Dral de acedía (De la Herrán et al., 2008). Según Haaf et al., 1993, esto podría ser explicado por una relativa mayor eficacia de la homogenización intracromosómica sobre la expansión y homogenización de estas secuencias a través del genoma.

Este es el caso de los satélites caracterizados tanto en el fletan como en el lenguado, los cuales no presentan señales de hibridación en dos parejas cromosómicas. Este resultado también podría ser debido al hecho de que la cantidad de ADN satélite en estas parejas, como consecuencia de la diferente

tasa de expansión intracromosómica, no fuese lo suficientemente elevada para que la señal de fluorescencia pueda ser observada.

### **5.1.1.3. Significado funcional de los ADN satélite Sacl y PvuII.**

La presencia de al menos una familia de ADN satélite en lo centrómeros de los cromosomas eucariotas puede indicar la importancia de estas secuencias en la estructura y función del centrómero (Martin., 2007). Sin embargo, los mecanismos por los cuales podría llevar a cabo dicha función centromérica no están aclarados (Choo., 2000; Henikoff et al., 2012; Pholh et al., 2008).

En este sentido, el porcentaje rico en AT de estas secuencias centroméricas así como la presencia de cortas repeticiones espaciadas de estos nucleótidos se han relacionado con propiedades estereofísicas del ADN como capacidad de curvarse. Estas repeticiones las podemos encontrar en ambos satélites descritos en esta Memoria (**FIGURA 9** y **FIGURA 15**). Estos sitios han sido propuesto como regiones específicas que inducen plegamientos de la cromatina en presencia dominios proteicos HMG (Radic et al 1992), dominios conservados e involucrados en la organización de la cromatina de los centrómeros de los vertebrados (Slama-Schwok et al., 2000; Klass et al., 2003).

Otra característica encontrada en ambos ADN satélites es la presencia de diferentes motivos centroméricos similares a otros satélites centroméricos de vertebrados y puestos de manifiesto en numeroso estudios (Vissel, Nagy & Choo, 1992), ratón (Wong & Rattner, 1988), reptiles (Cremisi et al., 1988) and peces (Wright, 1989; Denovan & Wright, 1990; Garrido-Ramos et al., 1995).

En el caso del ADN satélite Sacl y PvuII los motivos encontrados son similares a CTG(A/C)A(A/T), GA(C/T/G)AAAAC y a (C/G)AAAA(C/G), descritos ya en otros vertebrados (Radic et al., 1992; Gaff et al., 1994; Garrido Ramos et al., 1999; De la Herran et al., 2008; Viñas et al., 2008).

Algunos estudios demuestran que algunos satélites se pueden transcribir (Bonaccorsi & Lohe., 1991; Lee H. Wong et al., 2007; Volpe et al., 2003), y en algún caso se ha demostrado la transcripción de un satélite sexo específico (Rouleux-Bonnin, Bigot & Bigot., 2004). En este sentido el ADN satélite Sacl de fletan ha sido encontrado en una librería de secuencias transcritas. En

principio, debido a que los clones encontrados presentan homología a una unidad de repetición completa y repeticiones parciales (**FIGURA 11**) podíamos pensar que nos encontramos ante una contaminación de ADN genómico de la base de datos de EST de esta especie. Si embargo, serían necesarios estudios adicionales para intentar dilucidar si Sacl se transcribe realmente y comprender su posible papel a este nivel en el genoma de *H. hippoglossus*.

Por último y en cuanto a la caracterización de la secuencia Sac I es de destacar que del análisis de su secuencia se puede deducir que presenta dos motivos centroméricos con secuencias similares al motivo CENP-B de *Sacharomyces cerevisiae*. Este tipo de motivo también se ha encontrado en una familia de ADN satélite de otra especie de pez plano como la acedía (De la Herrán et al., 2008). Otros satélites también presentan regiones homologas con motivos CENP-B en *Lacerta grancea* (Capriglione et al., 1998) en *Adamussium colbecki* (Canapa et al., 2000) y en *Pipistrellus kuhli* (Fantaccione et al., 2005).

Como resumen, al igual que otras ADN satélites centroméricos, la coincidencia de todas estas características descritas nos hace pensar que las secuencias Sacl y Pvull pueden jugar un posible papel en la función centromérica en el fletan y del lenguado respectivamente.

### **5.1.1.4. Análisis evolutivo y estudios filogenéticos.**

Los ADN satélites centroméricos suelen estar conservados en un conjunto de especies relacionadas filogenéticamente, sobre todo, los que han sido descritos a nivel centromérico (De la Herrán et al., 2001). Sin embargo, cuando se comparan los ADN satélites aislados entre especies de peces planos, estos son muy divergentes en sus secuencias monoméricas, siendo familias de ADN satélites distintas. Así, tenemos la secuencia Sacl que parece ser exclusiva del fletan, el ADN satélite Pvull restringido a las especies del género *Solea*, el ADN satélite Dral presente solo en acedía y la secuencia Al-Hind de *Achirus*.

La rápida evolución de estas secuencias produce cambios tanto en su secuencia como en su abundancia y a menudo resultan en variantes especie-específicas y/o en la generación de nuevas familias de secuencias. Por lo tanto el estudio comparativo de las secuencias repetidas se puede considerar como

una buena herramienta para intentar establecer relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de especies. En este sentido hay que señalar que tal y cómo sucede con los dos ADN satélites descritos en peces planos que no presentaban homología entre sí, los dos ADN satélites aislados en este trabajo tampoco presenta homología con ninguno de ellos ni entre sí.

El satélite Sac I del fletan sólo está presente en esta especie no presentando señales de hibridación positiva con el ADN de otras especies de peces planos tales como *Solea senegalensis*, *Solea lascaris*, *Dicologlossa cuneata* y *Scohpthalmus maximus*, indicando que este ADN satélite no está presente en otras familias del Orden Pleuronectiformes. Sin embargo, sería necesario profundizar más en este aspecto, y analizar más especies de otras familias y fundamentalmente especies de la familia Pleuronectidae a la que pertenece el fletan.

Por otro lado el ADN satélite Pvu II del lenguado sólo parece estar presente en las especies del género *Solea* no observándose en otros géneros de esta misma familia tales como *M. azevia* y *D. cuneata*. En este sentido también es de resaltar que la secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los diferentes monómeros caracterizados no presenta similitud con ninguna secuencia de las depositadas en las bases de datos EMBL/GenBank.

El hecho de que estos ADN satélites estén restringidos a una o a un pequeño grupo de especies puede venir provocado por que este tipo de secuencias presenta un ritmo de cambio mucho mayor que cualquier otro ADN del genoma (Singer., 1982). Esto provocaría, incluso, que puedan aparecer y desaparecer familias de ADN satélite en tiempo evolutivo relativamente cortos (Miklos., 1985). De hecho se han citado casos tales como lo de la familia de ADN satélites CgoA y CgoB exclusivas de la especie de primate *Callimico goeldii* (Fanning et al., 1989) o estar restringida a unas pocas especies relacionadas entre sí, como por ejemplo en el caso de los Espáridos que se pueden separar en dos linajes distintos en función de la presencia o ausencia de la familia de ADN satélite Dral (Garrido-Ramos et al., 1998; 1999; De la Herrán et al., 2001).

La restricción de este satélite a la especie *H. hippoglossus* de entre todas las especies analizadas tal y como hemos comprobado por Southern blot así como la alta homología, que presentan los diferentes monómeros que se clonaron y su falta de hibridación con algunos cromosomas puede implicar un origen reciente de esta familia repetida. La presencia de repeticiones dentro de la secuencia monomérica sugiere que en el origen de esta ADN satélite han ocurrido varios procesos de duplicación y posterior divergencia por mutaciones tal y como se ha mencionado ha ocurrido en otros ADNs satélites de peces (Garrido-Ramos et., 1985; de la Herrán et al., 2001).

Por otro lado la secuencia Pvull sí que está presente en más de una especie del Género *Solea*. En concreto *Solea Solea*, *Solea lascaris* y *Solea senegalensis*. Nuestros datos sugieren que esta familia de ADN satélite evoluciona de forma concertada. A esta conclusión se llega cuando comparando la variabilidad intraespecífica con la divergencia interespecífica se observa como la identidad entre los monómeros de una especie es mayor que la existente entre las de dos especies distintas (Dover, 1982, 1986). Esto se ve corroborado cuando se realiza un árbol filogenético entre las distintas secuencias por el método del vecino más próximo y se comprueba que estas se agrupan por especies (**FIGURA 15**). Se ha propuesto que este hecho es consecuencia de la homogenización de las secuencias mediante mecanismos de conversión génica, tales como transferencia no recíproca y distribución aleatoria del material genético en la meiosis y segregación meiótica (Plohl et al., 2012).

### **5.1.2. Secuencia de ADN repetido ACA 72.**

#### **5.1.2.1. Aislamiento y localización del ADN repetido ACA 72 de *Solea senegalensis***

En un estudio de aislamiento de microsátélites en *Solea senegalensis* la secuencia de un clon de una de las genotecas obtenidas presentó una homología de 88% con 87 pb de un ADN repetido de *Lepomis macrochirus*. Este dato nos hizo pensar que el inserto contenido en este clon podría corresponder a la secuencia de un ADN repetido no detectado hasta ahora en el lenguado.

Mediante amplificación por PCR con primers diseñados “*ex profeso*” obtuvimos un patrón de amplificado correspondiente a un ADN repetido (Ver apartado 4.1.2.1 de Resultados). Uno de los clones obtenidos se utilizó como sonda de hibridación sobre cromosomas metafísicos de *S. senegalensis*. En esta hibridación se pudo observar señal positiva sobre una sola pareja de cromosomas (**FIGURA 16**). Esta característica resulta peculiar, ya que, generalmente, y tal como hemos señalado anteriormente los ADNs satélites se localizan en todos los cromosomas de un cariotipo o en la mayoría de ellos. La presencia de un ADN repetido en un único cromosoma del complemento de una especie es un caso inusual y generalmente afecta a regiones cromosómicas específicas (Jamilena et al., 1993) o cromosomas especiales tales como sexuales o cromosomas accesorios (Birchler et al., 1993; Ruiz Rejón et al., 1994; Shibata et al., 1999; De la Herrán et al., 2001). En este último caso la presencia del ADN repetido en una pareja de cromosomas de la lileácea *Muscari comosum* coincidía con una banda heterocromática, indicando que este ADN repetido habría sufrido una gran amplificación.

Tanto la localización como la abundancia de las familias repetidas en un genoma pueden reflejar los diferentes mecanismos mediante los cuales estos componentes de los genomas son amplificados y difundidos entre cromosomas. Schweizer y Loidl (1987) han sugerido que la evolución inicial de un ADN repetido puede estar limitado por propiedades nucleotípicas, por ejemplo la disposición espacial de los cromosomas en el núcleo, (Ruiz Rejón et al., 1988) y por reordenaciones cromosómicas en interfase.

En este sentido los datos obtenidos en genomas de peces modelos pueden arrojar luz sobre la localización y abundancia de ACA72. Por un lado, hemos comprobado que la secuencia ACA72 se localiza en un único locus cromosómico de todas las especies modelo (**FIGURA 33**). Este resultado confirma la hibridación *in situ*, con una única señal de hibridación en el complemento del lenguado. Por otro lado, y aunque en esta Memoria no hemos analizado la cantidad de ADN repetido que ACA 72 presente en el genoma de los peces planos, es de esperar que esta no sea muy elevada, dada la señal de hibridación “*in situ*” que aparece sobre los únicos cromosomas que la muestran. Adicionalmente, el análisis de la secuencia en las especies modelo



puso de manifiesto la existencia de pocas unidades de repetición (de 7 a menos de 30) en sus genomas. Estas observaciones nos hacen suponer que la secuencia ACA 72 es una secuencia repetida en tándem, que está poco representada en el genoma de peces planos y localizada en un único locus.

### **5.1.2.2. Conservación de la secuencia ACA 72.**

La secuencia consenso del ACA72 fue enviada a la bases de datos EMBL/GeneBank en búsqueda de homologías. Como cabía esperar, presentó homología con la secuencia BG16 con accession number AB095087 perteneciente a un ADN satélite de *L. macrochirus* (Perciformes), ya que fue a partir de esta comparación como se identificó su existencia. Pero además, también mostró homología con una secuencia de un BAC, DKEY-69C19 con accession number BX088538 del pez *Danio rerio* (pez Zebra), un ciprínido.

Estas similitudes con otros peces que no son peces planos, nos llevó a pensar que este ADN repetido podría estar muy conservado. Para comprobar esta idea realizamos distintos análisis. Así, en primer lugar pudimos constatar mediante Southern-blot su presencia en mayor o menor medida (**FIGURA 27**) en otras especies de peces planos, pertenecientes a diferentes Familias dentro del Orden tales como *Microchirus azevíá*, *Solea lascaris*, *Dicologlossa cuneata*, *Solea solea*, *Synaptura lusitanica*, *Citharus linguatula*, *Arnoglossus thori*, *Arnoglossus laterna*, *Scohpthalmus maximus*. También utilizando los primers diseñados en el lenguado se amplificó mediante PCR la secuencia ACA72 en el resto de especies analizadas en esta Memoria (**FIGURA 28**), poniendo de manifiesto su presencia en el genoma de todas ellas.

Los mismos primers sirvieron para amplificar ACA72 en algunas especies del orden Perciformes, tales como Sparus y Trachurus, confirmando su presencia dentro de este grupo, al igual que en *Lepomis*. Hay que resaltar que estas tres especies, *L. macrochirus*, *S. aurata* y *T. trachurus*, pertenecen a Familias diferentes (Familias Centrarchidae, Sapridae y Carangidae, respectivamente), por lo que podemos suponer una presencia más extendida dentro de este Orden Perciformes.

Por último, y mediante diferentes motores de búsqueda, pudimos encontrar en las bases de datos secuencias homólogas a ACA72 en otros

grupos de peces. Así, inicialmente, constatamos la presencia de ACA72 en otra especie de Perciforme como la lubina (*D. labrax*) y también se detectaron homologías con secuencias de genomas de peces modelos, tales como fugu, tetraodon, medaka, espinoso y pez zebra (**FIGURA 33**). Esto indicaría la existencia de una secuencia repetida y conservada en casi todos los peces. En este punto habría que destacar los intentos de amplificar ACA72 en esturiones (Orden Acipenseriforme, Subclase Chondrostei) y en rayas (Clase Chondrichthyes). En ninguno de los dos casos se obtuvo amplificado. Este dato, podría indicar que ACA72 no está presente en los genomas de estas especies, originándose después de la diversificación de estos dos grupos. Sin embargo, otra explicación sería que ACA72 hubiera divergido en estas especies lo suficiente para que no se pudieran amplificar con los primers utilizados para el resto de especies.

En esta Memoria, se ha demostrado la presencia de ACA72 en el genoma de dos superórdenes de teleósteos. Zuogang et al. (2006), utilizando el genoma del ADN mitocondrial, han datado que la diversificación de algunos grupos de teleosteos, entre ellos el superorden Ostariophysii, en el cual se incluye el Orden Cypriniforme (analizado en esta Memoria), ocurrió hace unos 282 millones de años. Este dato, indicaría que ACA72 tiene un origen anterior a este suceso, pues también está presente en el Superorden Acanthopterygii (de los cuales hemos analizado cinco órdenes) y que se separaron con anterioridad.

Los diferentes tipos de secuencias repetidas, en tándem, dispersa, altamente repetidas o con número bajo de copias, constituyen la arquitectura genómica nuclear (Cioffi y Bertollo., 2012). Entre ellas, secuencias repetidas en tándem y que se encuentren conservadas han sido descritas ampliamente en la bibliografía. Por un lado, aquellas secuencias con función conocida como pueden ser los genes del ARN ribosómico o de las histonas, y por otro, secuencias no génicas altamente repetidas y generalmente localizadas en regiones concretas de los cromosoma como los telómeros y los centrómeros, como casos de familias de ADN satélite que están conservadas en grandes grupos de especies (esturiones, cetáceos...).

La existencia de ADN repetido ha sido estudiada ampliamente en invertebrados y mamíferos, siendo hasta ahora escasos los datos en cuanto a las especies de peces. No obstante a pesar de esta falta de datos en el genoma de peces se ha encontrado toda clase de ADN repetido e incluso en el mismo genoma varios tipos (Cioffi y Bertollo., 2012).

La secuencia ACA72, no puede clasificarse como ADN satélite pues presenta un número reducido de repeticiones. Por otro lado, no se localiza en centromeros o telómeros. Sería, por tanto, la primera vez que se describe una ADN repetido en tándem, conservado en un gran grupo de especies y que se localiza en una región concreta de una sola pareja cromosómica. Esta observación confirma la gran diversidad de secuencias repetidas que existen en los genomas eucariotas (Callaghan et.al., 1996).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la distribución en los genomas de estas secuencias repetidas como transposición o formación de bucles de recombinación.

La secuencia ACA 72 presenta dos características tales como el poseer una organización interna en la que existen duplicaciones directas e inversas así como el hecho de estar flanqueada por dos regiones palindrómicas, como veremos posteriormente. Esto induce pensar que su origen podría haber sido un elemento móvil que posteriormente ha perdido la capacidad de transposición quedando localizado en un solo cromosoma del complemento. El origen de un ADN satélite repetido en tándem a partir de un elemento móvil esta ampliamente descrito en la bibliografía, siendo un ejemplo e, ADN satélite Hindi de ostrás, originado a partir del elemento móvil CvA, de las familia de los *Perl* (López-Flores., 2003)

Una de las características de este ADN repetido puesta de manifiesto tanto *in silico* como *in vitro* es que las posibles unidades de repetición en las distintas especies, presentaron tamaños diferentes. Esto nos llevó a plantearnos un estudio molecular sobre la estructura y organización interna de la secuencia ACA72 en todas las especies.

### 5.1.2.3. Caracterización de la secuencia ACA 72.

En un primer momento, observamos diferentes tamaños de amplificado dentro de los peces planos. Por un lado, está el grupo de especies cuyas secuencias presentan un tamaño alrededor 250-270 pb, formado por tres especies y por otro el resto de especies analizadas (**TABLA 14**) cuyo tamaño de amplificado varió entre 411-543 pb. Una característica de todas ellas, es una gran homología intraespecífica, con valores superiores al 90% en todos los casos (**Anexo II**). Del alineamiento múltiple de las todas secuencias de peces planos podemos definir unas regiones que se encuentra más conservadas entre especies y que se repiten con cierta periodicidad. A estas regiones las hemos denominado cajas A, B y C. Las dos primeras suelen encontrarse repetidas varias veces, según la especie, mientras que la tercera sólo se encuentra una vez en cada monómero. La longitud de estas cajas es variable, las dos primeras A y B presentan una longitud parecida (30-35 nucleótidos) y la tercera la caja C posee una longitud prácticamente del doble de las dos anteriores (72 nucleótidos). Es muy interesante el hecho de la gran homología entre estas tres cajas. Así, y tal como se muestra en la **FIGURA 29**, la caja A presenta homología con la inversa complementaria de B y ambas, con la caja C, la cual, es una secuencia palindrómica formada por las secuencias directas y secuencias inversas complementarias de A y B. De esta forma, ACA72 se había generado a partir de una secuencia de unos 35 nucleótidos que se encuentran presentes varias veces en el monómero tanto de forma directa como su inversa complementaria. La formación de la unidad monomérica de una ADN repetido a partir de motivos menores, es habitual y ha sido descrito por ejemplo en un ADN satélite de otro pez plano como la acedía, en el cual, se puede observar que la familia Dral está originada a partir de duplicaciones de un motivo conservado de 9 nucleótidos (De la Herrán et al., 2008).

Un análisis posterior se realizó para poner de manifiesto la presencia de esta secuencia en los genomas de otros peces. De esta forma y después de realizar una búsqueda de las regiones conservadas de la secuencia ACA72 en las bases de datos de los genomas de las especies modelo de peces, nos permitió comprobar, igualmente, que estas regiones se encuentran presentes en todos ellos. Su organización y tamaño de repetición es variable (siendo

siempre mayor a los amplificadores obtenidos en esta Memoria), así como el cromosoma del cariotipo en el que se localiza (**FIGURA 33**).

Este dato, posiblemente indicaría que en peces planos y en las especies de perciformes analizadas, no hayamos caracterizado la unidad de repetición completa, debido a la organización interna con motivos repetidos de este elemento.

### **5.1.2.4. Utilidad de la secuencia ACA 72 para estudios filogenéticos.**

Los marcadores moleculares se pueden usar, entre otras aplicaciones, para el estudio de las relaciones entre organismos constituyendo una herramienta válida para establecer relaciones filogenéticas entre amplios grupos taxonómicos. Las filogenias realizadas con ADN repetido han sido a menudo coincidentes con otras filogenias realizadas con otro tipo de secuencias como puede ser el ADN mitocondrial.

En este trabajo, en primer lugar, hemos analizado la variabilidad por posición nucleotídica de la secuencia ACA72 en todas las especies de peces planos. El análisis de las distancias, permitió realizar un análisis filogenético mediante los métodos del vecino más próximo (Neighbor-Joining) y el UPGMA. Se pudo comprobar que las secuencias se agrupan por afinidad taxonómica, estando todas las secuencias de una especie más próximas entre sí que con las secuencias de otras especies lo que puede señalar que la secuencia está sufriendo un proceso de evolución concertada (Dovers et al., 1982).

Una vez comprobada la evolución concertada de la secuencia ACA 72 y que está presente en todos los peces analizados mediante amplificación por PCR de la unidad de repetición ACA72, se realizó un árbol filogenético usando la información obtenida de su secuencia. Del árbol obtenido es posible inferir varios puntos de interés en cuanto a las relaciones filogenéticas de los diferentes grupos incluidos. Así en primer lugar comprobamos la separación en dos bloques de las especies del Orden Pleuronectiformes y de las del Orden Perciformes. En segundo lugar, dentro del Orden Pleuronectiforme, las distintas especies se agrupan en familia, previamente establecida mediante otros marcadores (Borsa y Quignard., 2001; Infante et al., 2004; Pardo et al., 2005). Se confirma, por tanto, la estrecha relación existente entre las especies *Solea*

*senegalensis*, *Microchirus azevía*, *Solea lascaris* y *Dicologoglossa cuneata*, puesta previamente de manifiesto en otros estudios genéticos (Infante et al., 2004; Pardo et al., 2005). Además, también se ha demostrado la estrecha relación existente entre *Pleuronectes platessa* e *Hippoglossus hippoglossus*, ambas consideradas actualmente dentro de la Familia Pleuronectidae confirmando así estudios previos como los de Espiñeira et al., 2008.

Una vez comprobado que este ACA72 también está presente en el genoma de peces modelo y dado que habíamos comprobado que ACA 72 es capaz de distinguir entre las especies de dos Órdenes de peces diferentes nos propusimos la realización de una filogenia. En ella se incluyeron todas las especies, tanto de órdenes Pleuronectiformes y Perciformes como las especies modelos de Teleósteos. En el árbol obtenido, en este caso utilizando una secuencia consenso común se puede apreciar cómo se agrupan por afinidad taxonómica todas las especies. Así, las especies pertenecientes al Superorden Acanthopterygii aparecen juntas, separándose de las del Superorden Ostariophysii. A su vez, dentro de cada uno de ellos, se observa la separación de los diferentes órdenes. Estos resultados ponen de manifiesto la relación más próxima de Pleuronectiformes (peces planos), con Perciformes (*Trachurus trachurus*, *Lepomis macrochirus* y *Sparus aurata*) que con Cypriniformes, al cual pertenece el pez cebra (*Danio rerio*). De hecho, estudios realizados mediante otros marcadores moleculares, como el caso gen nuclear RNF213, confirman esta misma situación (Li et al., 2008).

Estos resultados revelan que el ADN repetido ACA72 es un marcador útil en estudios filogenéticos y que puede ser, por tanto, una herramienta a considerar para el análisis de las relaciones, el origen y la antigüedad de los grandes grupos de peces Teleósteos.

## **5.2. Estudios de genómica funcional: hibridación sustractiva en esturiones**

La determinación del sexo en las distintas especies de esturiones es un proceso que, hasta la fecha, no está nada claro. Tal y como señalan Ludwig et al. (2001) el tamaño y la complejidad del genoma de los esturiones pueden ser dos factores que contribuyen al aumento de las dificultades para conseguir este

objetivo. En el trabajo llevado a cabo en esta Memoria hemos tratado de dilucidar este aspecto mediante la técnica de hibridación sustractiva que, de acuerdo con Wuertz et al. (2006), compara la expresión diferencial, en nuestro caso de gónadas de machos y hembras, y por lo tanto podría ser un abordaje que permitiera avanzar en el conocimiento de los genes involucrados en la determinación y diferenciación gonadal.

En este sentido hay que señalar que los distintos marcadores empleados (RAPDs, SSCPs, AFLPs ISSRs) para encontrar marcadores moleculares sexo-específicos desarrollados en esturiones, no han tenido éxito (Wuertz et al. 2006; Keyvanshokoo et al. 2007; McCormick et al. (2008 Yarmohammadi et al. 2011). Sin embargo, en esturiones se han llegado a caracterizar y estudiar su expresión, algunos genes relacionados con el determinismo sexual puesto de manifiesto previamente en otras especies de peces. Por ejemplo, la especie de esturión *A. schrenckii* presenta expresión diferencial entre machos y hembras de genes Sox (Chen et al., 2006). Estos genes codifican para factores de transcripción relacionados con el gen Sry de mamíferos. Por su parte, Li et al., (2011) en la especie *A. sinensis* analizaron tres genes AsZP3.1 AsZP3.2 y AsZP.3.3. Ninguno de los genes presenta expresión en estadios tempranos de desarrollo incluyendo etapas entre uno y dos años. Es a partir de los tres años cuando se observa su expresión en testículos de machos y en los ovarios de las hembras.

Recientemente (Berbejillo et al., 2012) han analizado la expresión diferencial, de algunos genes implicados en la diferenciación sexual, mediante la comparación de los patrones de expresión en las gónadas indiferenciadas en el esturión *Acipenser baerii*. En este trabajo se observa un claro dimorfismo en la expresión de siete genes que aparecen más sobre-expresado en machos que en hembras, manteniéndose esta situación hasta estadios más maduros sexualmente.

### **5.2.1. Hibridación sustractiva en *A. naccarii***

Este es el primer intento realizado de caracterización de la expresión diferencial mediante hibridación sustractiva en esturiones, en concreto se ha llevado a cabo en la especie *A. naccarii*.

La hibridación subtractiva es una técnica que ha sido ampliamente empleada por numerosos grupos para investigar varios aspectos de la fisiología de peces incluyendo reproducción y desarrollo (Larkin et al., 2003, Hayashi y Spencer 2005; Xie et al. 2012) y tradicionalmente se ha utilizado para analizar la expresión diferencial de peces en relación con patógenos y productos tóxicos (Bayne et al., 2001; Chapman et al., 2004; Tsoi et al., 2004; Wang and Wu, 2007).

De los resultados obtenidos en nuestros experimentos de hibridación sustractiva se observa que la extracción de ARN tanto en machos como en hembras se obtuvieron muestras de una calidad aceptable tal y como se puede deducir la. En la **TABLA 17** este mismo sentido, podemos concluir que los resultados obtenidos en el experimento de retranscripción de este ARN a ADNc también fueron de buena calidad (**TABLA 18**)

Los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados de hibridación sustractiva entre los ADNc de machos y de hembras son diferentes. Por un lado en la genoteca de machos, la mayoría de las secuencias obtenidas tienen homología con anotaciones de proteínas ribosomales. Este dato podría esperarse dado que, como se ha señalado en la bibliografía (Díaz de Cerio et al., 2012) en el proceso de maduración de las gónadas se pueden producir incrementos en la expresión de los genes ribosómicos según el estadio de desarrollo del individuo. Esto, podría deberse al hecho que en el proceso de formación gonadal se necesite una mayor cantidad de síntesis proteica, lo que estaría favorecido por la síntesis de proteínas ribosómicas.

Por lo que se refiere a la librería de hembras el porcentaje de secuencias con homología en las bases de datos fue menor que en la librería de machos, pero sin embargo encontramos mayor diversidad en cuanto al número y tipo de genes. Es en esta librería donde hemos encontrado algunos genes relacionados con los procesos de desarrollo gonadal tales como los genes ZP, proteína de unión al calcio y ferritina, los cuales, fueron analizados en esta Memoria.



### **5.2.1.1. Análisis de los genes de la zona pelúcida (ZP).**

Los ovocitos de los vertebrados están rodeados de una matriz extracelular conocida como envoltura vitelina en anfibios, corion en peces, membrana perivitelina en reptiles-aves y zona pelúcida en mamíferos.

Esta matriz consta de entre dos a cuatro glicoproteínas principales llamadas proteínas de la zona pelúcida (ZP) (Wassarman et al ., 2008); que sirven de protección al embrión durante la segmentación y evita que este se fije al oviducto en su migración al útero (Moore y Persaud., 2000). También tiene varias funciones fundamentales en la fecundación: por un lado, constituye una barrera ante las fecundaciones interespecíficas, ya que participa activamente en el reconocimiento y unión específica entre los gametos (función importante cuando la fecundación es externa). También facilita la unión del espermatozoide al óvulo y da comienzo a la reacción acrosómica una vez producida la fusión de éste (Cherr et al., 1986). Por otro lado, evita la poliespermia con el endurecimiento posterior a la entrada del espermatozoide, que es fundamental para el bloqueo poliespermático.

Las proteínas ZP están codificadas por familias multigénicas y se pueden dividir en seis subfamilias ZPA/ZP2, ZPB/ZP4, ZPC/ZP3, ZP1, ZPAX, ZPD (Goudet et al 2008).

La zona pelúcida está formada por unos filamentos compuestos, a su vez, por dímeros de proteínas ZP2 y ZP3, que a su vez se encuentran unidas por la proteína ZP1, formando una especie de malla. La ZP1 es un filamento homodimérico que estabiliza las uniones heterodiméricas de ZP2 y ZP3. La proteína ZP3 actúa como receptor primario para el espermatozoide mientras que la ZP2 sería un receptor secundario que se uniría al acrosoma y contribuiría a establecer uniones más estrechas con el espermatozoide.

Con respecto a ZP3, esta glicoproteína es un componente muy importante de la zona pelúcida ya que es esencial para la fecundación, actuando como receptor del espermatozoide.

La estructura del dominio de ZP3 refleja su función biológica dual. La mayoría de la proteína se compone de un módulo de polimerización 260 residuos, el dominio llamado ZP (Bork y Sander., 1992), seguido por una región

C-terminal de 40 aminoácidos que es específica para ZP3 y se encuentra implicada en la interacción con el espermatozoide (Wassarman y Litscher., 2008).

Centrándonos en peces, el gen, ZP3 ha sido descrito en medaka (Murata et al., 1995), en la dorada (Del Giacco et al., 1998; Modig et al. 2006), en el pez cebra (Wang and Gong., 1999; Del Giacco et al., 2000), en la carpa común (Chang et al., 1996), en el carpín (Fan et al., 2001), en la trucha arcoíris (Hyllner et al 2001), en el half-smooth tongue sole (Sun et al., 2010) y en el esturión chino (Chuang-Ju et al., 2011).

El lugar de síntesis y regulación de las proteínas ZP varía entre especies. Se sintetizan principalmente en el hígado en algunas especies de peces teleósteos (Lyons et al., 1993, Hamazaki et al., 1989, Shimizu et al., 1998, Kanamori et al., 2003 y Hyllner et al., 2001); en el pollo la síntesis ocurre en las células de la granulosa y en el hígado (Waclawek et al., 1998; Bausek et al., 2000); en el ratón, humanos y *Xenopus* la síntesis ocurre en los oocitos (Epifanio et al., 1995; Wassarman et al., 2004; Yamaguchi et al., 1989); en la carpa y el pez cebra tiene lugar en el ovario (Chang et al., 1996, 1997; Wang and Gong., 1999); en el esturión chino tiene lugar en hígado, riñón, bazo, corazón y ovario si se trata de la proteína ZP3.1 y sólo en la gónada si se trata de ZP3.2 y ZP3.3 (Chuan-Ju et al., 2011).

Por lo que se refiere al estudio llevado a cabo en este trabajo en la especie *Acipenser naccarii*, a partir de la hibridación substractiva hemos encontrado un conjunto de secuencias que dan homología con estos genes pertenecientes a la familia ZP3 de *A. sinensis*. Mediante el alineamiento de todos los conting obtenidos se ve que, en función de la homología con los genes de la familia ZP3 de *A. sinensis* se pueden dividir en dos grupos, el primero constituido por 26 secuencias que presenta una homología del 95% con el gen ZP3.2 de esta especie y un segundo grupo formado por 16 secuencias que presentan una homología del 92% con el gen ZP3.3.

Esto puso de manifiesto que en la hibridación sustractiva habíamos obtenido dos genes ZP, ZP3.2 y ZP3.3. Para confirmarlo, y a partir de la información de estos genes en la especie *A. sinensis*, se diseñaron parejas de primer para ambos genes y se amplificaron en *A. naccarii*. Las secuencias

completas de estos genes en *A. naccarii* se utilizaron para ensamblar los clones obtenidos en la sustractiva. De nuevo, las mismas secuencias se agruparon entre sí. Adicionalmente, utilizando la secuencia completa de estos genes en varias especies, se realizó una filogenia, la cual puso de manifiesto la mayor relación interespecífica entre genes ZP3.3 y ZP3.2, que entre ellos mismos (**FIGURA 47**). Esto indica que los genes ortólogos son más homólogos que los genes parálogos, poniendo de manifiesto que la duplicación de estos genes surgió ancestralmente, ya que esta organización se mantiene en la mayoría de los peces (Goudet et al., 2008).

El conjunto de secuencias se separaron en dos grupos, pertenecientes a los genes ZP3.2 y ZP3.3. Para el ZP3.2. Las correspondientes al ZP3.2 generaron un contig (**FIGURA 43**) con una longitud de 596 pb que presentaba una alta homología (97.8%) con el gen correspondiente de *A. sinensis*, previamente estudiado Chuan-Ju et al., 2011.

Pero dado que el gen completo de esta especie posee una longitud de 1.288 pb sólo habíamos conseguido obtener un 46.2 % de la longitud de la secuencia en *A. naccarii*.

Por otra parte para el gen ZP.3.3 no fue posible generar un contig que reuniera todas las secuencias obtenidas en la sustracción, porque no existían zonas de solapamiento entre ellas que permitieran su unión. Sin embargo en este caso ordenando los diferentes grupos de secuencias obtenidas es posible reunir prácticamente todo el gen completo ZP3.3 de *A. naccarii* (**FIGURA 46**).

Se obtuvieron las secuencias completas de ambos genes en *A. naccarii* mediante amplificación con primers diseñados en la secuencia del gen ZP3.3 de *A. sinensis* (Chuan-Ju et al., 2011)

Del análisis de las secuencias completas de ambos genes, se comprobó que los genes aislados en este trabajo presentaban, tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como a nivel de aminoácidos, las características típicas de estas proteínas (Bork y Sander., 1992; (Wassarman y Litscher,., 2008).

Por lo que se refiere a su expresión, y mediante PCR convencional, se utilizaron los primers específicos para cada gen diseñados en *A. sinensis* por Li et al., 2011, ya que comprobamos que sus secuencias eran compatibles con

las que habíamos obtenido para *A. naccarii*. Ambos genes ZP3.2 y ZP3.3 dan señal positiva tanto en machos como en hembras a partir de ADNc (**FIGURA 50**). Este resultado es congruente con los obtenidos por Li et al., 2011, en *A. sinensis* en el que también ambos genes amplifican en los dos sexos, aunque en este caso los individuos utilizados tenían edad diferente.

Sin embargo cuando se analiza la expresión diferencial entre machos y hembras mediante PCRq, se encuentra que en los individuos analizados la obtención de amplificado en hembras es mucho más prematura que en machos (**FIGURA 51, FIGURA 52 y TABLA 24, TABLA 25**) siendo las diferencias de expresión estadísticamente significativas. Estos resultados, también son congruentes con los resultados obtenidos en *A. sinensis* (Li et al., 2011).

#### **5.2.1.2. Análisis del gen la proteína de unión al calcio.**

En la hibridación sustractiva de la genoteca de hembra se obtuvieron 3 secuencias, dos de ellas con una longitud de 271pb y una tercera con 269pb, que presentaron una homología media del 84% (mediante BlastX) con secuencias de la proteína de unión a calcio “S100 calcium binding protein A1” pertenecientes a la especie de pez *Misgurnus fossilis* (Q7LZT1) depositada en la base de datos de GenBank.

El término S100 se refiere a una familia multigénica de proteínas de unión al calcio (Moore., 1965). Estas proteínas poseen una estructura común de bucles de unión al calcio flanqueados por dos hélices alfa (Marenholz et al 2004).

La proteína S100 intervienen en muchos procesos celulares tales como: modulación de la actividad de algunas proteínas kinasas, modulación de actividades enzimática, mantenimiento de la estructura celular y su movimiento, modulación de señales de transducción y regulación de la concentración del calcio (Santamaria et al., 2006).

El patrón de expresión de esta familia multigénica presenta un gran grado de especificidad tisular, de forma que muchos tejidos y tipos celulares tienen una única enzima con composición proteica diferencial y con un nivel de expresión específico (Saris et al., 1987; Lefranc et al., 2002).

Si bien en mamíferos la familia de proteínas S100 Calcium binding ha sido objeto de estudio desde hace 40 años, menos datos se tienen de esta familia de proteínas en peces. Así, la proteína S100A se ha descrito en los huevos del pez *Misgurnus fossilis* (Ivanenkov et al., 1993), la proteína S100A10 en *Solea senegalensis* en relación con la atresia folicular (Tingaud-Sequeira et al., 2009) y otras proteínas pertenecientes a esta familia (S100B, S100P, S100I, S100V) en diferentes especies de teleósteos (*Tetraodon nigroviridis*, *Danio rerio*, *Osmerus mordax* o *Salmo salar*), peces cartilagosos (*Callorhynchus milii* y *Squalus acanthias*) y lampreas (*Petromyzon marinus*) (Kraemer, Saraiva and Korsching., 2008).

### **5.2.1.3. Análisis del gen de la Ferritina.**

La ferritina es una proteína evolutivamente muy conservada encargada del transporte y almacenaje de los átomos de hierro en los organismos. Está constituida por diferentes subunidades, que se diferencian entre sí en función de su velocidad de absorción de iones y presentan expresión específica (Chen et al. 2008). En trabajos previos se ha comprobado que existen cambios en la expresión de este gen en el desarrollo de ovarios en el salmón *Onconrhynechus kisutch* (Luckenbach et al., 2008) en el pez cebra (Knoll-Gellida et al., 2006), aunque su papel durante este proceso es poco conocido. Dado esta información previa y que ya se conocía la secuencia del gen en el esturión chino (Chen et al., 2009) se decidió analizar este gen como candidato en el estudio de expresión diferencial que hemos realizado *A. naccarii*.

Las tres secuencias obtenidas que mostraban homología para este gen se reunieron en un único contig de longitud igual al mayor de ellos dado que este incluía a los otros dos. Este contig presenta una homología del 97.3% con el gen del esturión chino.

Una vez obtenida la secuencia completa del gen, su homología fue del 97% a nivel de secuencia de aas con el gen aislado en *A. sinensis* Esta alta homología se mantiene con los genes del salmón (*Salmo salar*) y de medada (*Oryzia latipes*), confirmando su alto grado de conservación evolutiva.

Por lo que se refiere a la expresión de este gen, se ha demostrado que el gen de la ferritina se expresa ampliamente en muchos órganos del esturión

chino, tales como: hígado, páncreas, músculo, cerebro, corazón branquias y mucosa gástrica ocurriendo igual en todos los organismo. En este trabajo hemos demostrado la expresión de este gen en gónadas de esturión (**FIGURA 55**). Adicionalmente, hemos ampliado el estudio al análisis de la expresión relativa de este gen entre machos y hembras mediante PCR a tiempo real. Hemos analizado la expresión en cDNA en ambos sexos, no habiendo encontrado que existan diferencias entre ellos. Tampoco hemos encontrado diferencias entre distintos individuos con gonadas más o menos diferenciadas, independientemente de que fuera machos o hembras. Y aunque se ha demostrado que existen diferencias en cuanto al predominio en la expresión de las diferentes subunidades en función del estadio de desarrollo en algunos peces como el salmón (Luckenbach et al., 2008), esto no lo hemos detectado en los esturiones, ya que quizá los estadios de desarrollo de los individuos utilizados no son lo suficientemente distantes para encontrar diferencias significativas en la expresión de este gen. O bien, esto no se cumple en el esturión *A. naccarii*.



## **6. CONCLUSIONES**





**PRIMERA.** Hemos analizado una familia de ADN satélite en el genoma del fletan (*Hippoglossus hippoglossus*) del Orden Pleuronectiformes. Esta ADN satélite denominado Sacl está localizada a nivel centromérico, tiene una longitud aproximada de 239 pares de bases y presenta un alto contenido en AT. Esta familia de ADN satélite está ausente en otras especies de peces planos.

**SEGUNDA.** Hemos aislado y caracterizado otra familia de ADN satélite *Pvull* a partir del genoma de la especie *Solea senegalensis*, en donde se ha localizado a nivel centromético de casi todos sus cromosomas. Este ADN satélite, está presente en las otras especies analizadas del género *Solea* (*S. solea* y *S. lascaris*) y, sin embargo, no se encuentra en especies muy relacionadas con ellas como *M. azevia* y *D. cuneata*. La unidad monomérica es de 230 pares de bases, presenta un contenido en AT del 65,70% y se han detectado motivos centroméricos conservados en otras especies de peces. El análisis de las secuencias de las unidades monomérica de las tres especies analizadas ha puesto de manifiesto que esta familia de ADN satélite presenta evolución concertada.

**TERCERA.** El análisis comparativo de las diferentes familias de ADN satélite centromérico caracterizadas en esta Memoria, con los dos existentes en la bibliografía (Al-Hind de Achirus y ADN satélite Dral de *Dicoglossa cuneata*) han revelado que, al contrario que en otros grupos de vertebrados, que comparten una misma familia de ADN satélite en sus centrómeros, los peces planos presentan diferentes secuencias asociadas a la estructura del centrómero, pudiendo estar alguna de ellas solo en un grupo reducido de especies muy relacionadas o, incluso, ser especie-específica.

**CUARTA.** Adicionalmente, se ha aislado una secuencia repetida, denominada familia ACA72, del genoma de *S. senegalensis*. Esta secuencia fue detectada en una genoteca de ADN genómico de lenguado por su homología con un ADN satélite de una especie de pez del Orden Perciforme, *Lepomis macrochirus*. Mediante hibridación *in situ*, se ha demostrado que este ADN repetido se localiza a nivel intersticial en una única pareja del complemento del lenguado.

**QUINTA.** Mediante las técnicas de Southern-blot y de PCR se ha puesto de manifiesto la presencia de esta secuencia repetida, no solo en 13 especies de peces planos sino, además, en especies del Orden Perciforme como el ya mencionado *Lepomis* y las especies *Sparus aurata* y *Trachurus trachurus*.

**SEXTA.** La búsqueda en las bases de datos GenBank ha revelado que esta secuencia se encuentra mucho más conservada en Teleósteos pues se han encontrado homologías con regiones concretas de una pareja de cromosomas en especies modelo de peces.

**SÉPTIMA.** La comparación entre las secuencia de ACA72 de todas las especies permitió, por un lado, establecer una estructuración interna de la unidad de repetición basada en repeticiones internas, tanto directa como reversa complementaria, y palíndromos, todos ellos muy conservados, siendo las secuencias espaciadoras entre estos motivos conservados las regiones más variables. Por otro lado, nos podría indicar que la secuencia aislada a partir de PCR tanto en pleuronectiformes como perciformes podría formar parte de una estructura mayor. Las características moleculares de ACA72 nos hace pensar que su origen pudo producirse a partir de un elemento móvil.

**OCTAVA.** Tras el análisis intra e interespecífico de ACA72 podemos concluir que este ADN repetido presenta evolución concertada, pudiendo ser por tanto, un excelente marcador filogenético para un grupo grande de especies. El análisis filogenético realizado demuestra este hecho, pues pudimos establecer algunas relaciones entre especies, que son concordantes con filogenias realizadas usando otros marcadores filogenéticos.

**NOVENA.** Utilizando la técnica de hibridación sustractiva hemos construido dos genotecas (una para machos y otra para hembras) de secuencias que potencialmente se expresan de forma diferencial en gónadas de machos y hembras del esturión *A. naccarii*. Mientras que en la genoteca de machos, no pudimos encontrar ninguna secuencia anotada que pudiera ser de interés, en la genoteca de hembras, seleccionamos cuatro genes que podrían

estar relacionados con la diferenciación gonadal: dos genes de la cubierta del huevo (ZP3.2 y ZP3.3), el gen de unión al calcio y la ferritina.

**DÉCIMA.** Para los genes ZP3.2 y ZP3.3 se obtuvieron sus secuencias completas y se comprobó su homología con estos mismos genes en el esturión *A. sinensis*. La PCR cuantitativa ha revelado una expresión diferencial de ambos genes, expresándose en hembras más que en machos.

**UNDÉCIMA.** En esta Memoria se describe por primera vez la proteína de unión al calcio en esturiones. Aunque se tiene una secuencia parcial, esta sirvió para realizar un análisis de expresión en gónadas de *A. naccarii*. La PCR cuantitativa puso de manifiesto que este gen se expresa de forma estadísticamente significativa más en hembras que en machos. Aunque habrá que ampliar el estudio a gónadas menos diferenciadas, inicialmente, este gen puede ser útil para identificar machos y hembras en estadios recientes.

**DUODÉCIMA.** Se ha caracterizado el gen completo de la ferritina en *A. naccarii*. Su análisis y comparación con otras especies ha puesto de manifiesto que este gen se encuentra muy conservado en peces. Adicionalmente, hemos puesto de manifiesto que tanto en gónada de machos como de hembras este gen se expresa a niveles similares.



## **7. ANEXOS**



## 7.1. Anexo I

	Pvull-SSE-2	Pvull-SSE-8	Pvull-SSE-15	Pvull-SSE-18	Pvull-SSE-26	Pvull-SSE-41	Pvull-SS-14	Pvull-SS-15	Pvull-SS-21	Pvull-SS-31	Pvull-SS-44	Pvull-SS-45	Pvull-SL-11	Pvull-SL-28	Pvull-SL-34	Pvull-SL-41	Pvull-SL-48	Pvull-SL-49
Pvull-SSE-2	0.00	0.12	0.10	0.10	0.05	0.19	0.13	0.12	0.17	0.16	0.17	0.12	0.14	0.13	0.13	0.20	0.15	
Pvull-SSE-8		0.12	0.10	0.10	0.05	0.19	0.13	0.12	0.17	0.16	0.17	0.12	0.14	0.13	0.13	0.20	0.15	
Pvull-SSE-15			0.05	0.02	0.12	0.28	0.20	0.19	0.20	0.22	0.25	0.17	0.17	0.18	0.18	0.20	0.24	0.21
Pvull-SSE-18				0.04	0.10	0.26	0.17	0.17	0.19	0.19	0.23	0.17	0.17	0.18	0.18	0.19	0.24	0.21
Pvull-SSE-26					0.10	0.26	0.18	0.17	0.17	0.20	0.24	0.23	0.16	0.18	0.17	0.19	0.23	0.20
Pvull-SSE-41						0.17	0.12	0.11	0.17	0.16	0.17	0.17	0.11	0.13	0.12	0.13	0.19	0.14
Pvull-SS-14							0.15	0.20	0.17	0.22	0.17	0.17	0.26	0.28	0.27	0.28	0.32	0.30
Pvull-SS-15								0.10	0.14	0.14	0.11	0.18	0.18	0.19	0.18	0.18	0.25	0.24
Pvull-SS-21									0.12	0.14	0.14	0.17	0.18	0.18	0.16	0.24	0.24	0.23
Pvull-SS-31										0.18	0.16	0.20	0.21	0.20	0.22	0.27	0.28	0.28
Pvull-SS-44											0.17	0.15	0.20	0.14	0.22	0.28	0.22	0.28
Pvull-SS-45												0.21	0.21	0.22	0.20	0.25	0.25	0.25
Pvull-SL-11													0.06	0.01	0.07	0.18	0.06	0.06
Pvull-SL-28														0.07	0.07	0.17	0.11	0.11
Pvull-SL-34															0.08	0.19	0.07	0.07
Pvull-SL-41																0.16	0.10	0.10
Pvull-SL-48																		0.23
Pvull-SL-49																		

Tabla en la que se muestra la divergencia interespecífica entre todos los clones pertenecientes al satélite Pvull en la familia Soleidae.



## 7.2. Anexo II

**SS-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTGTGGTGATTTTTGATGTCATAT
TTGCATAATTTTCAGAGGTCAGTCTTTTTGGATACCATATTGATAAACACA
ACCTCTGACATTTCTTGTACGTCGTACAATTACCCTAACTTTAGCATTG
ACTTGAGTGTTTTTTTTTCAGTAAGTGCTACTTGTGGGGCAGTTTTGTTG
ACAATATCAACTGAATGAACAGCCAAGGAAATGGCTGTGAGCTTCCAAC
CGGATCACCTCAGATGGAACCACTCATGATTCTGGACTTCATAAGTGCTT
CTCTTTGGGGTTGTCTTGGTTGTGATGGGATCTGCAGTGGAAAAGGTCTA
AATGAACTTTCCTAAAATCCAACCTGCAATTCAAATATTTAATACACCTG
CATACCCAAACATAAGCACAGACTG

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Solea solea*.

	SS-10	SS-53	SS-54	SS-103	SS-104	CONSENSO
SS-10		86.8	96.2	91	97.1	94.6
SS-53			86.15	93.9	85.9	89.3
SS-54				90.6	99	96
SS-103					91	94.13
SS-104						96

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Solea solea*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 92.5%.

**SL-CONSENSO-ACA**

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
CAGTAAGTGCTTCTTGTTGGGGTAGTTTTGTTTGACAATATCAACTGAAT
GAATAGCAAAGGAAAAGGTTGTGAGCTTCCAACCTCGGATCACTGCAGATG
GAACCACTCATGATTCTGGGCTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCT
TGGTTGTGATGGGATCTGCAGTCGCAAAGTCTAAATGAACTACCCTGAAA
TCAAATTCAACCATTTATCACCAGTATTACCCAAACAGCAAGCACAGACT
TG

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Solea lascaris*.

	SL-31	SL-35	SL-36	SL-41	SL-42	CONSENSO
SL-31		93,6	92,8	95,3	99,2	94,9
SL-35			95,7	95,7	94,5	97,7
SL-36				94,1	93,7	97,7
SL-41					95,3	96,5
SL-42						95,7

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Solea lascaris*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología alta entre sí, con una media del 95%.

**DC-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTTTTGTTTGACAATATCAACTGAAT
GAATAGCAAAGAAAATGGTTGTGAGCTCTCCAACCTCAGATCACTTCAGAT
GGAACCACTCATGATTCTGGACTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTC
TTGCTTGGGATGGCTTCTGCAGTGGAAACGTCTGAATGAACTATCCTAAT
ATCCAATGTGGAACCTCAAATATTGATAGACATGCATTACCCAAACACCAG
CACAGACTTG

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Dicologlossa cuneata*.

	DC-21	DC-23	DC-24	DC-25	DC-26	DC-43	DC-45	CONSENSO
DC-21		99,2	92	95,3	92	92	89,5	93,8
DC-23			92,6	95,3	92,6	92,2	89,5	94,6
DC-24				95,3	98	91,8	93	95,4
DC-25					95,3	94,6	91,2	95
DC-26						91,8	93,4	95
DC-43							88,5	97
DC-45								92

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Dicologlossa cuneata*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 93,1%

**ACA-BP-CONSENSO**

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTGTGGTGATTTTTAGAAAGTCATTT
TGGTGTAATTTTAGAGGGCAGTCATTTTGGATACCATATTGATAAAACAC
AATATTGCTATTTCTTGTAAGTCTGTACAATTACCCTAACTTTAGCATTTC
ACTTGACTGTTTCTTTTCAGTAAGTGCTACTTGTGGGGCAGTTTTGTTG
GACAAATATCAACTGAATGAATAGAAAACAAAATTGTTGTGAGCTTCCAAC
TCGGATCACTTCAGATGGAACCACTCATGATTCTGGTTTTTCATAAGTGCT
TCTCTTTGGGGTTGTCTTGGTTGTGATGGGTTCCACATGTGGAAAAGGGG
AAGAATGAACTATCCTAAAATCTGTTCCGTGCCTCAAATATGTATTCCACA
AGCAT

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Bathysolea profundicola*.

	BP-2	BP-7	BP-23	BP-55	BP-58	CONSENSO
BP-2		81.4	91.39	95.53	93.1	96.1
BP-7			81	81.4	79.55	82.73
BP-23				90.5	89.42	94.1
BP-55					94.1	96.1
BP-58						92.6

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Bathysolea profundicola*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 90%.

**MA-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTGTGGTGATTTTTAGAGGGCAGTC
ATTTTGGATACCATAGTGATAAAACACAATATAACTATTTCTTGTAAGTC
TGTAACAATTACCATAACTTTAGCATTGACTTGGCTGTTTTTTTCAGTAAG
TGCTACTTGTGGGGCAGTTTTGTTGGACAATATCAACTGAATGAATAGA
AAACAAAATTGTTGTGAGCTTCCAACTCAGATCACTTCAGATGGAACCAC
TCATGATTCTGGTCTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTTGTTGT
GATGGGGTTCTACACTTGGAAAAAGTCTCAATATAGCTGAATGAACTATC
CTAGAATATATTCTGATCTTCAAATATGTATCACCAGCATTACCCTAACT
CGAGAGACAGACTGAA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Microchirus azevía*.

	MA-4	MA-6	MA-21	MA-23	CONSENSO
MA-4		99	98,5	98,2	99
MA-4			98	98,8	98,2
MA-21				97,5	98,4
MA-23					99,2

Valores de identidad entre los clones de la familia de ADN repetido ACA72 de *Microchirus azevía*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología media de 99,9%.

**BL-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTGTGGTGATTTTCAGAAGTCATTT
TGGTGTAATTTTAGAGGGCGGTCCCTATATTGATAAAACACAAAACACAAC
CTCTGACATCTCTTGAACGTCTGTACAATTACCCTAACTTTAGCATTGAC
TTGACTGTTGTTTTCAGTAAGTGCTATTTGTTGGGGTAGTTTTGTTTGAC
AATATCAACTGTGAATGAATAGAAAACCAAATTGTGAGCTTCCAACCTCGG
ATCACTTCACATGGAACCACTCATGATTCTGGTCTTCATAAGTGCTTCTC
TTGGGGTTGTCTTGGTTGTGGTGGTTTCTACAGTGGAAAAGTGTGAATG
AACTATCCTCAAATCTGATGTGAACTTCAATCATTTACACCCAGCATCAC
CCAAAGCATCAGCACAGACATGA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Buglossidium luteum*.

	BL-2	BL-3	BL-10	BL-11	BL-12	BL-13	CONSENSO
BL-2		96.9	96.9	95.8	96	96.9	97.4
BL-3			97.6	96.5	98.1	97.6	99.5
BL-10				97,4	96,5	95.8	97.6
BL-11					96.3	94.8	98.1
BL-12						98.6	98.6
BL-13							98.1

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Buglossidium luteum*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 97,2%.

**HH-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTACTTGTGGGGTAGTATTGATGATTTCAAATGTCCATGT
TCTCTTCACAGCTGCTTTGTACATCCATTTCTGGTGTTTTATGACTGGAA
AGAACATTGCAAGTCTTTTGTATGTCTTTACTATTACCCATACACGAGCA
TTGACTTGACAGTTGAATTCAGTAAGTGCTACTTGTGGGGCAGTTTTAA
TCGACAAAAACAATATGAAAAGACACAATGTTATGGAAATCCAACCTCTGA
TCACCTCAAATAGAGCCACTCATGATTATTGGCTTCATAAGTGCTTCTCT
TTGGGGTTGTCTTGGTTGGGATATTTTCTGCAGTATAATATTTTCAGTAAT
GATTCAATTCAGTGAATGAAATCAGACATCAATAGAACTGCTATGTAG
TTGATTGTGTATCCAAAAATATTCAGCAAAATTTGAAAATAACTTTTCAGA
GGACAATTTTTTTAAACAAAGCCTACATTTTGTACACAACCTAGGTGGTCA
CCGGCTTTACCCCANACCCAGACTCAGACTGAANN

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Hippoglossus hippoglossus*.

	HH-11	HH-16	HH-50	HH-51	HH-54	HH-67	CONSENSO
HH-11		94,7	96	95,5	94	93,4	96,5
HH-16			96	96	96,2	94,7	97
HH-50				98,3	95,7	95,7	98,9
HH-51					95,7	95,1	97,6
HH-54						95,1	95
HH-67							96

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Hippoglossus hippoglossus*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología alta entre sí, con una media del 95%.

**PP-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTCTTGTTGGGGTAGTATTGATGATTTATAAATGTCCATGC
TCTTTTCACAGCTGCTTTGTACATCCATCTCTGGTGCTTTATGACTGGAA
AGAAATATTGCAAGTCTTTTGTATGTCTTTACTATTACCCTTCACTTGAG
CATTGACTTGACAGTTGGTTTCAGTAAGTGCTACTTGTGGGGCAGTTTT
AATCGACAAAAACAACATAAAAAAGACACAATGTTATGGAAATCCAACTCT
GATCACCTCAAATGGAGCTACTCATGATTACTGGCTTCATAAGTGCTTTT
CTTTGGGGTTGTCTTGGATGGGATATTTTCTGCAATATAATATTTTCAGTA
ATGATTCAATTCCAGTAAATGAAATCAGACATCAATAGAACTGCTATGT
AGTTGGGTGTGTATTCAAAAATATTCAGTAATATTTGAAAAAACTTTT

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Pleuronectes platessa*.

	PP-19	PP-28	PP-40	PP-43	CONSENSO
PP-19		95	80	85	78
PP-28			80	86,3	83
PP-40				86	94,3
PP-43					72

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Pleuronectes platessa*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 96,5%.



**AI-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTATTTGTTGGGGTAGTTTCAAATGACACCACCTACTGAAT
CCATAGAAGACCACCTTGGATTTAAGAATCAAGCACTGGCCACCTCAAATA
GAGACATTAATGATGAATGTTTTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCT
TGGCTGAGATGTGTTATGCGTTGGAGTAGACTGACCTACAGAGTAAAAGT
TGAGACGTCACAAGTAATCAGTCATGTCTATTACCCTACCATGAGCACAA
ACTTGGTTTATTGAATTCAGTAAGTGCTATTTGTTGGGGTAGTTTTAAGT
GACGAGAGCAACTGAATCCACGGAAGACCACCTTTGAGAGTCCAGCTCTGA
TCACCCTGAATGGAGACACTAATGATTCGCCCTTTTCATAAGTGCTTCTAT
TTGGGGTTGTCTTGGCTGAGATGTACAACCTGCGGAGAAGACCATGCAGTA
CAGATGAAGTGAGGCATAAAAACATTTCTTCACCCAGGTACCAGCTATGT
CGAACGCAACACCCCCCTTACACAAGCACAGACATGA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Arnoglossus imperialis*.

	AI-2	AI-3	AI-5	AI-7	AI-9	AI-10	CONSENSO
AI-2		92.6	92.31	94.06	95.54	94.8	97.06
AI-3			94.3	92.6	94.1	93.9	94.6
AI-5				91.1	93.4	91.5	93.3
AI-7					96.6	95.7	96
AI-9						96.1	98.1
AI-10							96.3

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Arnoglossus imperialis*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 94.1%.

**AT-CONSENSO-ACA**

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
CAGTAGTGCTTTTTGTTGGGGTAGTTTTAGTGCATCGAGAGCAACTGAAT
CCACAGAAGACCACCTTTGAGAGTCCAGCTCTGACCACCCTGAATGGAGAC
ACTAATGATTCCCCTTTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTTGGCT
GAGATGTTCCACTGCCGAAGAAGACCATGCAGTACAGATGAAGTGAGGCAT
AAAAACATTTCTACAGGCAAGATACTTTTCATGCTATTACCAACACCACCC
AAACACAAGCACAGACTTGA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Arnoglossus thorii*.

	AT-3	AT-4	AT-5	AT-7	AT-9	AT-10	CONSENSO
AT-3		96.7	97.4	97.8	98.4	94.3	98.9
AT-4			97.8	97	96.7	95.6	97
AT-5				94.3	98.2	95.5	98.4
AT-7					97.4	95.9	97.8
AT-9						95.8	99.6
AT-10							96.7

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Arnoglossus thorii*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 97%.

**LB-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAGTGCTTCCTTGTTGGGGTAGTTTTAAAGTTACAAAATCAACTGAAT
GCAAAGAAGACATACTTTTATATGAATCCAACCTCTGATCACTTCAAATGG
AGCCACTAATGATTTCTGGCTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTT
GGTTGTGACAATACCTGCACCTGTTGATTCTGATTGTTACTTATTTGATGA
TTTATGTTATAATCATTTTATTTTTTACAAGACTAGCCAAGTTCATTTAT
TAGTCACTAACATTACCCTAACAAAAGTACCAACTTGACTACTGAAAGCA
GTAAGTGCTATTTGTTGGGGTAGTGTGCTGATATTGTAAGTCTTCTCCC
ATTACACAGTTCATGAAAACCTGCCATTTTAGATTTCTTAATAAAAAAACA
AACAAACACTGAAGATATCTTTTAAGTCCATACTATTACCCAAACTCAAG
CACAGACTTGA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Lepidorhombus boscii*.

	LB-1	LB-8	LB-9	CONSENSO
LB-1		93.8	95.7	96.2
LB-8			96.2	96.9
LB-9				99.3

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Lepidorhombus boscii*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 96.35%.

**LW-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGGTAGTTTTAACAGACAAATCAACTGAAT
GCAAAGAAGACATACTTTTATATGAATCCAACCTCTGATCACTTCAAAAGG
AGCCACTAATGATTTCTGCCTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTT
GGTTGTGACAACCTTCTGCAGTGGAAACATGTCTTATCAGCTGATTAATAAA
ATCTACAAATTTTCATGTGAATCCAACCTCTGACCACTTCAAATGGAGCCA
CTAATGATTTCTGCCTTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTGTCTTGGTTG
TGACAACTTCTGCAGTTGAGTACAATATCTACAAATTTTGTGAAGAAT
AACATTGGAAGATACTTTTTAAGTCCATACTATTACCCAAACTCAAGCAC
AGACATGA

```

Secuencia consenso correspondiente a la familia ACA72 en el genoma de la especie *Lepidorhombus whiffiagonis*.

	LW-1	LW-3	LW-4	LW-5	LW-7	CONSENSO
LW-1		92.9	90.75	90.3	95.13	95.9
LW-3			96	93.4	91.4	97.1
LW-4				93.8	91.4	94.8
LW-5					88.9	94.5
LW-7						93.4

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Lepidorhombus whiffiagonis*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 93.31%

**AU-CONSENSO-ACA**

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
CAGTAAGTGCTACTTGTGGGGCGGTTGCATTTGACAAAATCATCAACTG
CATGAGGAGGACATCAGGTAAAGCATTGGAATCAGACTAAGACCACCTCG
AATGGAGACACTAATGATTTTTCTGTACACAAGTGCTTCTCTTTGGGGTT
GCCTTGATTGTGAATTCACCATCACTAAAAAACAACTTTTTCACATGACC
AGCCAAACATTTTGTGCACCAAGATTACCCTACTTCAGCACAGACTTG

```

Secuencia consenso correspondiente a ACA-72 en el genoma de la especie *Sparus aurata*.

	AU-4	AU-5	AU-6	AU-7	AU-8	AU-9	CONSENSO
AU-4		85.8	86.7	96.8	96.8	96	95.2
AU-5			84	85.4	84.3	85.8	84.8
AU-6				87.1	86	88.4	87.3
AU-7					96	96	95.6
AU-8						95.2	94.4
AU-9							99

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Sparus aurata*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 90%.

**TRA-CONSENSO-ACA**

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
CAGTAGTGCTATTTGTTGGGGTAGTTGTAGTGTACAAAAATCAACTGTAT
GCCAAGGACTCAAATTCCTAATGGAATCCAATTCAGATAACCTCAAATGA
AGACACTGATGATTCTTTTCCTTGCTCATAAGTGCTTCTCTTTGGGGTTG
TCTTAGTTGTGAAATGCGCCACTAGTGTACAGATTGCCGTGTTCAATTTGA
TTTCAGAAAAACAGCAAAGTGCAATTCGTTTATCACCAATATTCCCCTAA
CACAAGCACAGACTTGACTTGTCAAAGCAGTAAGTGCTTTTTGTTGGGGT
AGTGTGTTGATATCAGAAGCCACAAGGGCAACCATTCCAGACAATATGT
ATACTGTTGGATGAGCAAATCAATTTCAAACCTTCTGCGAGTCACCACTA
TTACCCTAACACAAGCACAGACTTGA

```

Secuencia consenso correspondiente a ACA-72 en el genoma de la especie *Trachurus trachurus*.

	TRA-3	TRA-2	TRA-1	TRA-9	TRA-10	TRA-5	CONSENSO
TRA-3		94.1	96.5	94.1	94.7	95.8	96.9
TRA-2			94.6	97.9	93.7	95	96.9
TRA-1				93.6	94.4	95	97.2
TRA-9					94.4	96.5	96.2
TRA-10						96.5	96
TRA-5							98.1

Valores de la identidad entre los clones de la familia de ADN satélite ACA72 de *Trachurus trachurus*. Las unidades monoméricas caracterizadas presentan una homología entre sí, con una media del 94,6%.

## 7.3. Anexo III

Tabla HOMOLOGÍA	<i>S. senegalensis</i>	<i>S. solea</i>	<i>S. lascaris</i>	<i>D. cuneata</i>	<i>B. profundicola</i>	<i>B. luteum</i>	<i>M. azevia</i>	<i>H. hippoglossus</i>	<i>P. platessa</i>	<i>A. imperialis</i>	<i>A. thori</i>	<i>L. boscii</i>	<i>L. whiffiagonis</i>	<i>S. aurata</i>	<i>T. trachurus</i>
<i>S. senegalensis</i>	89,3	86,3	89,7	85	81,9	80,6	62,6	69,3	64,5	65,9	68,8	70,1	66,1	65,8	
<i>S. solea</i>		87,8	88,2	86	83	81	66,8	67,2	63	66,1	68,1	70,3	67,1	68,6	
<i>S. lascaris</i>			86,2	80,9	84,5	79,9	68,2	65,9	68,8	66,6	67,9	69,4	67	68,3	
<i>D. cuneata</i>				81,4	85,7	82,3	69,4	68,7	65	66	66,5	71	64	64,8	
<i>B. profundicola</i>					81,8	85,2	66,7	68,7	64	67,1	68,8	70,8	62,5	64,6	
<i>B. luteum</i>						80,5	67,5	65,6	62,3	66	66,3	70,1	66,2	68,4	
<i>M. azevia</i>							66,9	66,2	65,7	68,9	68,7	72,4	63,8	66,9	
<i>H. hippoglossus</i>								94	59,5	61,7	65,9	64,2	65,9	64,7	
<i>P. platessa</i>									60,3	62,9	65,1	65,3	63,4	64,3	
<i>A. imperialis</i>										96	67,9	70	63,1	65,7	
<i>A. thori</i>											63,8	68	63,1	68	
<i>L. boscii</i>												72,2	62,8	68,4	
<i>L. whiffiagonis</i>													64,7	64,6	
<i>S. aurata</i>														67,7	
<i>T. trachurus</i>															

Homología que existe entre todas las especies de peces analizadas con la secuencia repetida ACA-72

## 7.4. Anexo IV

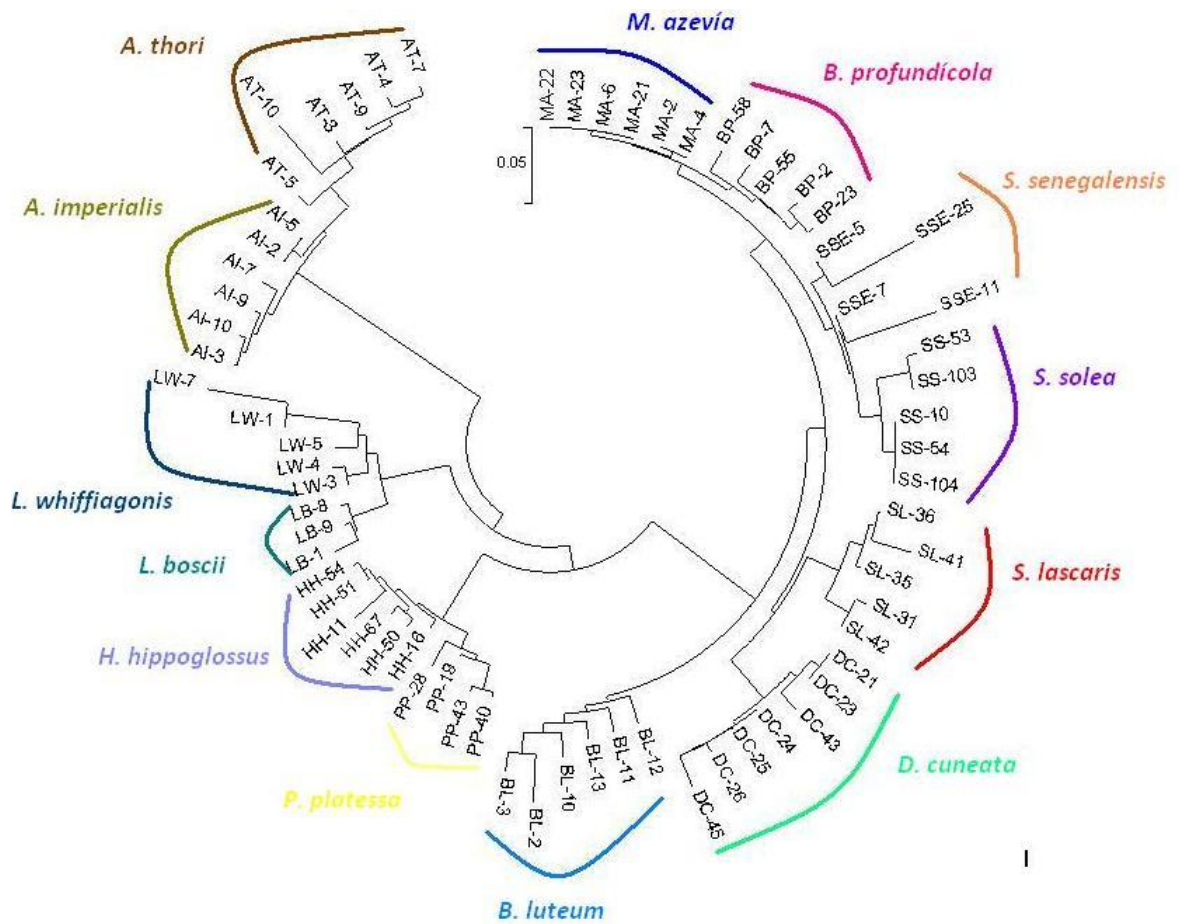
TABLA  
DISTANCIAS

	<i>S. senegalensis</i>	<i>S. solea</i>	<i>S. lascaris</i>	<i>D. cuneata</i>	<i>M. azevía</i>	<i>B. luteum</i>	<i>B. profundícola</i>	<i>H. hippoglossus</i>	<i>P. platessa</i>	<i>A. imperialis</i>	<i>A. thori</i>	<i>L. boscii</i>	<i>L. whiffiagonis</i>
<i>S. senegalensis</i>	<b>0.08</b> 9	0.12	0.09	0.12	0.14	0.22	0.13	0.35	0.37	0.35	0.35	0.38	0.33
<i>S. solea</i>		<b>0.07</b> 5	0.08	0.14	0.15	0.21	0.13	0.33	0.35	0.35	0.36	0.37	0.34
<i>S. lascaris</i>			<b>0.0</b> 5	0.08	0.08	0.09	0.09	0.20	0.21	0.25	0.28	0.20	0.23
<i>D. cuneata</i>				<b>0.06</b> 9	0.15	0.19	0.13	0.34	0.35	0.34	0.35	0.37	0.31
<i>M. azevía</i>					<b>0.0</b> 1	0.19	0.08	0.35	0.36	0.34	0.35	0.37	0.34
<i>B. luteum</i>						<b>0.02</b> 8	0.12	0.34	0.35	0.36	0.38	0.37	0.34
<i>B. profundícola</i>							<b>0.1</b> 0	0.30	0.30	0.34	0.36	0.36	0.31
<i>H. hippoglossus</i>								<b>0.0</b> 5	0.06	0.42	0.42	0.37	0.35
<i>P. platessa</i>									<b>0.03</b> 6	0.42	0.42	0.36	0.36
<i>A. imperialis</i>										<b>0.05</b> 9	0.08	0.40	0.39
<i>A. thori</i>											<b>0.0</b> 3	0.43	0.41
<i>L. boscii</i>												<b>0.03</b> 6	0.24
<i>L. whiffiagonis</i>													<b>0.06</b> 6

Distancia media entre todas las unidades monoméricas de ACA-72 caracterizadas en las especies de peces planos.



## 7.5. Anexo V



Árbol de distancias utilizando la variabilidad media de los clones de las especies analizadas de peces planos analizadas con la parte más conservada de la secuencia ACA-72. Las secuencias se agrupan por afinidad taxonómica.

## 7.6. Anexo VI

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A. NUMBER	E-VALUE	TAMAÑO (bp)	REDUNDANCIA	% DE IDENTIDAD	TÉRMINOS GO		
							PROCESO BIOLÓGICO	FUNCIÓN MOLECULAR	COMPONENTE CELULAR
60S Proteína ribosómica L35a	<i>Salmo salar</i>	ACN09951.1	9,00E-46	259	16	75	Traducción		Citosol
60S Proteína ribosómica L13a	<i>Salmo salar</i>	ACN10380.1	3,00E-18	309	3	66	Traducción		Subunidad grande del ribosoma
60S Proteína ribosómica L8	<i>Squalius pyrenaicus</i>	ACD62234.1	4,00E-42	229	10	100	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Subunidad grande del ribosoma
60S Proteína ribosómica L4-A	<i>Chanos chanos</i>	ABB22762.1	9,00E-62	731	19	81	Traducción	Componente estructural del ribosoma	
60S Proteína ribosómica L4-B	<i>Salmo salar</i>	ACH70798.1	2,00E-59	760	4	94	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Ribosoma
Proteína ribosómica P0	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	ADF97607.1	4,00E-57	316	8	95	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citoplasma
60S Proteína ribosómica L31	<i>Salmo salar</i>	ACN09964.1	3,00E-22	315	9	94	Traducción	Componente estructural del ribosoma, RNA binding	Complejo ribonucleoproteico
60S Proteína ribosómica L10a	<i>Salmo salar</i>	ACI69173.1	7,00E-55	167	4	90	Traducción		
60S Proteína ribosómica L17	<i>Salmo salar</i>	ACI67044.1	9,00E-50	891	14	94	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Subunidad grande del ribosoma

7. Anexos

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A. NUMBER	E-VALUE	TAMAÑO (bp)	REDUNDANCIA	% DE IDENTIDAD	TÉRMINOS GO		
60S Proteína ribosómica L34	<i>Salmo salar</i>	ACN10048.1	1,00E-47	1486	3	88	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Complejo ribonucleoproteico
60S Proteína ribosómica L21	<i>Danio rerio</i>	NP_001002155.1	1,00E-70	547	4	90	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Ribosoma
40S Proteína ribosómica S17	<i>Salmo salar</i>	ACN09866.1	2,00E-57	502	2	96	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
40S Proteína ribosómica S9	<i>Salmo salar</i>	ACI67297.1	3,00E-11	450	7	96	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
40S Proteína ribosómica S23	<i>Epinephelus coioides</i>	ADG29194.1	6,00E-25	796	2	70	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
40S Proteína ribosómica S12	<i>Salmo salar</i>	ACH70842.1	3,00E-70	946	12	93	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
40S Proteína ribosómica S3B	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	ADF97614.1	9,00E-24	195	3	97	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Ribosoma
40S Proteína ribosómica S18	<i>Salmo salar</i>	ACI70010.1	6,00E-10	800	3	69	Traducción		Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
Ubiquitina	<i>Salmo salar</i>	ACN09942.1	2,00E-48	371	6	96	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Ribosoma
Zinc-proteína	<i>Gallus gallus</i>	XM_003642318.1	9,00E-72	423	3	80	Transcripción celular	Unión zinc	
Inmunoglobulina	<i>Callithrix jacchus</i>	AAM89740.1	0,069	760	5	80	Respuesta inmune		Componente de la membrana

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A. NUMBER	E-VALUE	TAMAÑO (bp)	REDUNDANCIA	% DE IDENTIDAD	TÉRMINOS GO		
Superfamilia de la inmunoglobulina	<i>Danio rerio</i>	CU638782.1	2,00E-21	749	3	91	Respuesta inmune		Membrana
Citocromo C-oxidasa	<i>Acipenser sinensis</i>	YP_002860187.2	7,00E-29	708	11	93	Cadena transportadora de electrones		Componente de la membrana
Interferon regulación factor de unión	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001080568.1	1,00E-22	892	8	56	Regulación de la transcripción	Unión a iones metalicos	Nucleo

## 7.7. Anexo VII

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A.NUMBER	E-value	REDUNDANCIA	TAMAÑO (pb)	% DE IDENTIDAD	TERMINOS GO		
							PROCESO BIOLÓGICO	FUNCIÓN MOLECULAR	COMPONENTE CELULAR
Zona pelúcida glicoproteína 2 (ZP2)	<i>Mustela erminea</i>	AAV31789.2	2,00E-05	3	354	43	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora	Región extracelular
Zona pelúcida proteína de unión esperma-2	<i>Loxodonta africana</i>	XP_003418938.1	1,00E-43	1	498	56	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora	Región extracelular
Zona pelúcida glicoproteína B	<i>Acipenser sinensis</i>	AEQ59108.1	7,00E-123	2	483	95	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora	Región extracelular
Zona pelúcida glicoproteína 3 b (ZP3.2)	<i>Acipenser sinensis</i>	FJ610234	4,00E-162	26	596	97,8	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora	Región extracelular
Zona pelúcida glicoproteína 3 c (ZP3.3)	<i>Acipenser sinensis</i>	ADH93592.1	7,00E-173	16	843	93,9	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora	Región extracelular
Zona pelúcida proteína X (ZPAX)	<i>Acipenser sinensis</i>	AEQ59107.1	2,00E-82	20	645	84	Zona de unión del esperma	Proteinasa acrosómica de unión	Gránulo de secreción
Zona pelúcida proteína X	<i>Sparus aurata</i>	AAY21008.1	1,00E-32	4	475	52	Zona de unión del esperma	Proteinasa acrosómica de unión	Gránulo de secreción
ZPAX proteína	<i>Anas platyrhynchos</i>	ABQ09458.1	2,00E-18	2	389	42	Zona de unión del esperma	Proteinasa acrosómica de unión	Multivesicular

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A.NUMBER	E-value	REDUNDANCIA	TAMAÑO (pb)	% DE IDENTIDAD	TERMINOS GO		
Zona pelúcida proteína de unión esperma-4	<i>Danio rerio</i>	XP_002667333.2	2,00E-46	6	667	48	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora, Proteinasa acrosómica de unión	Región extracelular
Zona pelúcida proteína de unión esperma-4	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003452556.1	0,000007	4	557	36	Vesícula para exocitosis del acrosoma	Actividad señal transductora, Proteinasa acrosómica de unión	Región extracelular
Proteína de unión al calcio	<i>Misgurnus fossilis</i>	AAB28829.1	2,00E-34	3	270	85	Regulación negativa de la transcripción de la polimerasa	Proteína de unión al ión calcio	Citoplasma, nucleos, retículo sarcoplásmico
Ferritina	<i>Acipenser sinensis</i>	ABY81252.1	2,00E-80	3	408	95	Homeostasis de iones de hierro celular	Unión al hierro	
60S Proteína ribosómica L17	<i>Macaca mulatta</i>	XP_001082416.1	8,00E-22	1	405	91	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Subunidad grande del ribosoma
60S Proteína ribosómica L8	<i>Lateolabrax japonicus</i>	ABQ57487.1	2,00E-48	1	840	96	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Subunidad grande del ribosoma
60S Proteína ribosómica L13	<i>Solea senegalensis</i>	BAF98660.1	1,00E-12	1	569	88	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Subunidad grande del ribosoma
40S Proteína ribosómica S3	<i>Solea senegalensis</i>	BAF45890.1	3,00E-33	1	450	100	Traducción	Componente estructural del ribosoma	Citosol, subunidad pequeña del ribosoma
Mitocondrial ATP sintetasa $\alpha$	<i>Danio rerio</i>	NP_001070823.1	3,00E-64	1	801	98	Proceso catabólico del ATP		Componente de la membrana mitocondrial
Citocromo C-oxidasa	<i>Acipenser naccarii</i>	AAT28397.1	2,00E-27	1	882	98	Cadena transportadora de electrones	Copper ion binding, cytochrome-c oxidase activity	Componente de la membrana
Proteína de desacoplamiento mitocondrial	<i>Danio rerio</i>	NP_571251.1	4,00E-16	1	139	83	Transporte mitocondrial		Componente de la membrana mitocondrial

## 7. Anexos

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A.NUMBER	E-value	REDUNDANCIA	TAMAÑO (pb)	% DE IDENTIDAD	TERMINOS GO		
Factor ovárico específico C1q	<i>Carassius gibelo</i>	AAT76300.1	1,00E-07	1	395	32	Regulación positiva de la adhesión célula-sustrato, proliferación de células epiteliales		Colágeno
Lipasa maduración	<i>Danio rerio</i>	NP_001122236.1	7,00E-17	2	187	73			Endoplasmic reticulum membrane, Componente de la membrana.
Proteína centrosomal 27 kDa	<i>Salmo salar</i>	NP_001134762.1	5,00E-14	1	949	56	Organización del centrosoma	Centrosoma	
Carioferina $\alpha$ -2	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001135557.1	5,00E-15	1	767	65	Proteína importadora del núcleo	Proteína actividad transportadora	Citoplasma
Proteína de unión citoplasmática Poly(A)	<i>Ovis aries</i>	ABY68599.1	4,00E-56	2	785	83	Desarrollo embrionario de cordados	Proteína de unión	Citoplasma
Citosol malato dehidrogenasa B	<i>Acipenser brevirostrum</i>	AAO26196.1	3,00E-71	1	859	97	Proceso metabólico de carbohidratos	Actividad catalítica	
Bystin-like protein	<i>Salmo salar</i>	NP_001133792.1	7,00E-44	2	269	91	Biogénesis de los ribosomas		Citoplasma
Cadena ligera de la dineína citoplasmática	<i>Salmo salar</i>	ACI66012.1	2,00E-16	2	858	97			Citoplasma
Claudina 4L2	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001086756.1	1,00E-20	1	650	73		Actividad estructural	Componente de la membrana
Queratina, citoesqueleto	<i>Acipenser baerii</i>	Q7SYF8.1	0,00001	1	256	50		Actividad estructural	Filamentos intermedios

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A.NUMBER	E-value	REDUNDANCIA	TAMAÑO (pb)	% DE IDENTIDAD	TERMINOS GO		
RING de proteínas transmembrana	<i>Danio rerio</i>	NP_001018369.1	5,00E-46	1	303	75		Proteína de unión al zinc	Componente de la membrana
Araquidonato 12-lipoxigenasa	<i>Danio rerio</i>	NP_955912.1	9,00E-43	1	808	64	Oxidación-reducción	Unión al hierro	
Phosphoribosylaminoimidazole carboxilasa	<i>Danio rerio</i>	AAH48051.1	2,00E-86	2	563	82	IMP proceso biosintético	Unión ATP	Componente celular
Receptor de TNF proteína asociada	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAZ66789.1	2,00E-48	1	829	82	Plegamiento de proteínas	Unión ATP	Citoplasma
Putative cadena de $\beta$ tubulina variante	<i>Taeniopygia guttata</i>	ACH46006.1	5E-63	2	478	72	Proceso implicado en la duplicación del centrosoma	Componente estructural del citoesqueleto	Complejo tubulina
Putative reverso-transcriptasa	<i>Cicer arietinum</i>	CAD59768.1	0,000002	1	842	89	Glutaminilo-tRNA aminoacilación	Unión ATP	Citoplasma
PREDICTED:Proteína DJ-1	<i>Meleagris gallopavo</i>	XP_003212226.1	0.004	1	189	61	Respuesta celular a peróxido de hidrógeno	Actividad peroxidasa	Mitocondria y núcleo
PREDICTED: MAM dominio de proteína de anclaje glicosilfosfatidilinositol	<i>Danio rerio</i>	XP_002665249.1	2,00E-04	1	619	30	Adhesión celular		Membrana
PREDICTED: Proteína hipotética LOC100083840	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_001514402.2	9,00E-37	2	447	55			
PREDICTED: Ubiquitina de modificación de activación de la enzima de tipo Atg7	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003454618.1	7,00E-50	1	368	91	La respuesta celular a la falta de nitrógeno	Proteína actividad ligasa	Citosol



7. Anexos

HOMOLOGÍA	ESPECIES	A.NUMBER	E-value	REDUNDANCIA	TAMAÑO (pb)	% DE IDENTIDAD	TERMINOS GO		
PREDICTED: Proteína BTG4	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002921151.1	2,00E-06	2	869	41	Regulación negativa del ciclo celular mitótico		
PREDICTED: No caracterizada. Proteína LOC580187	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_785353.3	0,01	4	330	48			Membrana
Hipotética. Proteína precursora LOC565426	<i>Danio rerio</i>	NP_001139060.1	2,00E-07	5	192	45	Proteína de unión		Componente de la membrana
Hipotética proteína LOC555379	<i>Danio rerio</i>	NP_001037795.1	3,00E-32	1	331	69	Señal transducción	Unión GTP	Membrana

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Alexandrov IA, Mitkevich SP and Yurov YB. 1988. The phylogeny of human chromosome-specific alpha satellite. *Chromosoma*. 96, 443-453.
- Amaoka K. 1969. Studies on the sinistral flounders found in the waters around Japan. Taxonomy, anatomy and phylogeny. *J. Shimonoseki Univ. Fish.* 18(2): 1-276.
- Amaury Herpin and Manfred Schartl. 2011. Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J.* 278(7):1010-9.
- Arnason U. (1990). Phylogeny of marine mammals: evidence from chromosomes and DNA. *Chromosomes Today*. 10: 267-278.
- Azevedo Marisa FC et al. 2005. Phylogenetic analysis of the order Pleuronectiformes (Teleostei) based on sequences of 12S and 16S mitochondrial genes. *Scientia Marina*. Vol. 69, no 4. 531-543. 1886-8134.
- Azevedo Marisa FC, Oliveira C, Foresti Fausto. 2007. Cytogenetic characterization of six species of flatfishes with comments to karyotype differentiation patterns in Pleuronectiformes (Teleostei). *J Fish Biol.* 70:1-15.
- Bachmann L, Schibel JM, Raab M, Sperlich D. 1993. Satellite DNA as a taxonomic marker. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21, 3-11.
- Baroiller JF and H D'cotta. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 130: 399-409.
- Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Crihiu E, De Baere E, Guiguen Y, Jaubert F, Pailhoux E, Pannetier M, Vaiman D, Vigier B, Veitia R, Fellous M. Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reprod Nutr Dev.* 45(3):377-82.
- Berbejillo J, Martinez A, Bedo G, Brunet F, Volff JN, Vizziano-Cantonnet D. 2012. Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Mol Reprod Dev.* 79(8):504-16.
- Berendzen PB, Dimmick WW. 2002. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence. *Copeia* 3: 642-652

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):11-21.
- Birstein VJ, Vasil'ev VP. 1987. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizing regions in four acipenserid species. *Genetica.* 72, 3–12.
- Blacklidge KH and CA Bidwell. 1993. Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. *Journal of Heredity.* 84:427-430.
- Bork P and Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett.* 300, 237–240.
- Bouza C, L. Sánchez y P. Martínez. 1994. Karotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease banding techniques. *Marine Biology.* 120: 609-613.
- Bull JJ. 1983. Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park.
- Buntjer JB, Lenstra JA. 1998. Self-amplification of satellite DNA in vitro. 1998: *Genome.* 41 (3):429-34.
- Callaghan MJ, Beh KJ. A tandemly repetitive DNA 1996sequence is present at diverse locations in the genome of *Ostertagia circumcincta*. *Gene.* 174(2):273-9.
- Camon E, Barrell D, Lee V, Dimmer E y Apweiler R. 2004. The Gene Ontology Annotation (GOA) Database - An integrated resource of GO annotations to the UniProt Knowledgebase. *In Silico Biology* 4: 5-6.
- Carone DM, Longo MS, Ferreri GC, Hall L, Harris M, Shook N, Bulazel KV, Carone BR, Obergfell C, O'Neill MJ, O'Neill RJ. 2009. A new class of retroviral and satellite encoded small RNAs emanates from mammalian centromeres. *Chromosoma.* 118(1):113-25.
- Carrasco LAP, DJ Penman and N R Bromage. 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from

synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*. 173: 207-218.

- Chapleau F. 1993. Pleuronectiform relationships: a cladistic reassessment. *Bull. Sci.* 52(1): 516-540.
- Charlesworth PE, Sniegowski and W Stephan. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 371: 215-220.
- Chen J, Fu Y, Xiang D, Zhao G, Long H, Liu J, Yu Q. 2008. XX/XY heteromorphic sex chromosome systems in two bullhead catfish species, *Liobagrus marginatus* and *L. styani* (Amblycipitidae, Siluriformes). *Cytogenet Genome Res.* 122(2):169-74.
- Chen JJ, Du QY, Yue YY, Dang BJ, Chang ZJ. 2010. Screening and identification of male-specific DNA fragments in common carps *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization. Source College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang.
- Chen TR, Reisman HM. 1970. A comparative chromosome study of the North American species of sticklebacks (Teleostei: Gasterosteidae). *Cytogenetics*. 9(5):321-32.
- Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J, Chung B. 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol*. 231(1):149-63.
- Choo KHA. 1997. *The Centromere*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Choudhury A and TA Dick. 1998. The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *J. Biogeogr.* 25: 623–640.
- Chuang-Ju L, Qi-Wei W, Xi-Hua C, Li Z, Hong C, Fang G, Jian-Fang G. 2011. Molecular characterization and expression pattern of three zona pellucida 3 genes in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiol Biochem.* 37(3):471-84.
- Cioffi MB, Bertollo. 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *LA Genome Dyn.*;7:197-221.

- Clarke L, Carbon J. 1985. The structure and function of yeast centromeres. *Annu Rev Genet.* 19:29-55.
- Conte FS, SI Doroshov, PB Lutes and EM Strange. 1988. Hatchery Manual for the white sturgeon *Acipenser transmontanus Richardson* with application to other North American Acipenseridae. US. Fish and Wildlife Service 3322: 104 pp.
- Cross I, Merlo A, Manchado M, Infante C, Cañavate JS and Rebordinos L. 2006. Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)<sub>n</sub>, (TTAGGG)<sub>n</sub> and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica.* Vol. 128. No 1-3.
- Csink AK, Henikoff S. 1998. Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 143(1): 13-22.
- Cui Jian-Zhou, Shen Xue-Yan, Gong Qing-Li, Yang Guan-Pin, Gu Qian-Qun. 2006. Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Aquaculture.* Vol. 257. pp. 30-36.
- De la Herrán R, Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Rossi R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M and Garrido-Ramos MA. 2001. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Mol. Biol. Evol.* 18: 432-436.
- De la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Navas JI, Ruiz Rejón C and Ruiz Rejón M. 2000. Molecular characterization of the ribosomal gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for molecular diagnosis. *Parasitology.* 120: 345-353.
- De la Herrán R, Robles F, Cuñado N, Santos JL, Ruiz Rejón M, Garrido-Ramos MA and Ruiz Rejón C. 2001. A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (Hyacinthaceae). *Chromosoma.* 110: 197-202.
- De la Herrán R, Robles F, Esther Martínez-Espín, Lorente, JA Ruiz Rejón C, Garrido-Ramos MA and Ruiz Rejón M. 2004. Genetic Identification of Western Mediterranean Sturgeons and its Implication for Conservation. *Conservation Genetics.* 5: 545–551.

- De la Herrán R, Robles F, Navas JI, López-Flores I, Herrera M, Hachero I, Garrido-Ramos MA, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M. 2008. The centromeric satellite of the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*, Pleuronectiformes) is composed mainly of a sequence motif conserved in other vertebrate centromeric DNAs. *Cytogenet Genome*. 121:271-276.
- De la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M and Garrido-Ramos MA. 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity*. 87: 691-697.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences.
  - Devlin RH, McNeil BK, Groves TDD, Donaldson EM. 1991. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1606–1612.
- DeWoody JA, Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56 : 461–473.
  - Diatchenko L, Lau YFC, Campbell A.P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD.1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6025–6030.
- Doroshov SI, Moberg GP, Van Eenennaam JP. 1997. Observations on the reproductive-cycle of cultured white sturgeons *Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes*. 48 (1-4) pp. 265-278
- Dover G. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetic*. 2: 159-165.
- Ekker, M., A. Fritz and M. Westerfield, 1992. Identification of two families of satellite-like repetitive DNA sequences from the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics* 13:1169-1173.
- Espiñeira M, Gonzalez-Lavina N, Vieitesa J.M and Santaclara FJ. 2008. Development of a method for the identification of scombroid and common



substitute species in seafood products by FINS. Food Chemistry 117. 698–704.

- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F y Graves JAM. 2006. Relationship between vertebrate. ZW and XY chromosome systems. Curr. Biol. 16: R736-R743.
- Fagundes M, Oliveira C, Martins C, Wasko A, Foresti F. 2005. Isolation and Characterization of a Satellite DNA Family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). 205-210(6).
- Fan Z & Fox D. 1991. Robertsonian polymorphism in plaice, *Pleuronectes platessa* L., and cod, *Gadus morhua* L., (Pisces Pleuronectiformes and Gadiformes). J Fish Biol. 38:635-640.
- Fanning TG, Seuáñez HN and Forman L. 1989. Satellite DNA sequences in the New World primate *Cebus apella* (Platyrrhini, Primates). Chromosoma. 98: 396-401.
- Feist G, Van Eenennaam JP, Doroshov SI, Schreck CB, Schneider RP, Fitzpatrick MS. 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. Aquaculture. 232: 581-590.
- Felomena Li, Lakshmi Sonbuchner, Kyes S, Christian Epp and Kirk W. Deitsch. 2008. Nuclear Non-coding RNAs Are transcribed from the Centromeres of Plasmodium falciparum and Are Associated with Centromeric Chromatin, Stavros S. Niarchos Scholar. Biol Chem. 283 (9):5692-8.
- Felsenstein J.1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39: 783-791.
- Ferreira F, Bucchini D, Martin ME, Levis S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C. 2000. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. J Biol Chem, 275(5): 3021-3024.
- Flynn SR & Benfey TJ. 2007. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur. Journal of Fish Biology. Vol. 70, I 4, pp. 1027–1044.

- Fontana F & Colombo G. 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* (Basel), 30: 739-742.
- Frehner KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. 2007. Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) *Genet. Mol. Biol.* Vol. 30 no.3.
- Friedman Matt. 2008. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature*. 454, 209–212.
- Froschauer A, Körting C, Katagiri T, Aoki T, Asakawa S, Shimizu N, Scharl M, Volff JN. 2002. Construction and initial analysis of bacterial artificial chromosome (BAC) contigs from the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*. 295(2):247-54.
- Gaff C, du Sart D, Kalitsis P, Iannello R, Nagy A, Choo KH. 1994. A novel nuclear protein binds centromeric alpha satellite DNA. *Hum Mol Genet*. 3(5):711-6.
- Ganguly A, Bansal P, Gupta T, Gupta SK. ZP domain of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. Source Reproductive Cell Biology Laboratory, National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi.
- Gardiner AS. 1984. Taxonomy of infraspecific variation in *Betula pubescens* Ehrh., with particular reference to the Scottish Highlands. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. pp. 13–26.
- Garrido-Ramos MA, De la Herrán, R, Jamilena, M, Lozano, R, Ruíz Rejón C and Ruíz Rejón, M. 1999. Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Mol. Phyl. Evol.* 12: 200-204.
- Garrido-Ramos MA, De La Herrán, Ruíz Rejón C and Ruíz Rejón, M. 1998. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet. Cell Genet.* 83: 3-9.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M. 1994. Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet Cell Genet.* 65:233-237.

- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol Nature Biotechnology*. 17: 282-286.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut and Monget P. 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction*. 78 796-806.
- Graur D and Wen-Hsiung Li. 1999. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Edition 2, Sunderland.
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA, Fostier A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev*. 54(2):154-62.
- Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti PM Jr, Willard HF. 1993. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Res*. 1(1):77-86.
- Hale MC, Jackson JR & Dewoody JA. 2010. Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica* 138, 745–756.
- Hardie DC & Hebert PDN. 2004. Genome-size evolution in fishes. *Can. J Fish Aquat Sci*. 61:1636–1646.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci*. 109(8):2955-9.
- Henikoff S, Furuyama T. The unconventional structure of centromeric nucleosomes. 2012. *Chromosoma*. 121(4):341-52.
- Hensley DA & E. Ahlstrom. 1984. Pleuronectiformes: relationships. En: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson (eds.). *Ontogeny and systematics of fishes*. Amer. Soc. Ichthyol. Herp. Spec. Publ. 1: 670-687.

- Herpin A, Rohr S, Riedel D, Kluever N, Raz E, and Scharl M. 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). BMC Dev. Biol. 7:3.
- Hett AK, Ludwig A. 2005. SRY-related (Sox) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). Genome 48, 181–186.
- Hett AK, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A. 2005. Characterization of Sox9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). Journal of Heredity. 96, 150–154.
- Higgins CF, McLaren RS, Newbury SF. 1988. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion. Gene. 72(1-2):3-14. Review.
- Hillis DM and Davis SK. 1988. Ribosomal DNA: Intraspecific Polymorphism, Concerted Evolution, and Phylogeny Reconstruction. Syst Zool. 37, 63-66.
- Hinegardner R. 1968. Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. Am. Nat. 102:517-523.
- Hochleithner M, Gessner J, Podushka S. 2001. The Bibliography of Acipenseriformes. AquaTech Publishing, Kitzbuehel, Austria. 600 pp.
- Holčík J. 1986. The Freshwater Fishes of Europe. Petromyzontiformes. AULA-Verlag, Wiesbaden. pp.119–142.
- Hubbs CL. 1945. Phylogenetic position of the Citharidae, a family of flatfishes. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan, 63: 1-38.
- Hurvitz A, Degani G, Goldberg D, Din SY, Jackson K & Levavi-Silvan B. 2005. Cloning of FSH $\beta$ , LH $\beta$ , and glycoprotein  $\alpha$  subunits from the Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*),  $\beta$ -subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. Gen. Comp. Endocrinol., 140, 61-73.
- Hurvitz A, Jacksonb K, Deganib G, Levavi-Sivana B. 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon

(*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*. Vol. 270, 1–4, pp. 158–166.

- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod*. 78(2):333-41.
- Infante C, Catanese G and Manchado M. 2004. Phylogenetic Relationships Among Ten Sole Species (Soleidae, Pleuronectiformes) from the Gulf of Cádiz (Spain) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Marine Biotechnology*. Vol. 6, no 6. 612-624.
- Ingham LD, Hanna WW, Baier JW, Hannah LC. 1993. Origin of the main class of repetitive DNA within selected Pennisetum species. *Mol Gen Genet*. Apr; 238(3):350-6.
- Iturra P, Medrano J.F, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin JC. 1997. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica*. 101, 209–213.
- Ji Rui-Qin, Xin Xi-Feng, Li Zi-Qin and Feng Hui. 2011. Construction and analysis of a suppression subtractive hybridization (SSH) library of genic multiple-allele inherited male-sterility in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(27), pp. 5296-5303.
- Junghans H, Metzloff M. 1990. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechniques*. 8 (2):176.
- Kato A, Yoichi I, Yakura K, and Tanifuji S. 1985. Sequence analysis of *Vicia faba* highly repeated DNA: the BamHI repeated sequence families. *Plant Mol Biol*. 5, 41–53.
- Kato M and Ito M. 2002. Stepwise expansion of satellite DNA repeat unit in *Lepomis macrochirus*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. (50):285-6.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 122(9):2813-22.

- Keyvanshokoo S, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Vaziri B. 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. *Anim Reprod Sci.* 111(2-4):361-8.
- Keyvanshokoo S, Pourkazemi M, Kalbassi MR. 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *J. Appl. Ichthyol.* Vol. 23, no. 1, pp. 1-2.
- Keyvanshokoo S, Vaziri B. 2008. Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. *Anim Reprod Sci.* 109(1-4):287-97.
- Kikuchi K, Furuta T, Ishizuka H, Yanagawa T. 2007. Growth of tiger puffer, *Takifugu rubripes*, at different salinities. *Journal of the World Aquaculture Society.* Vol. 38, I. 3, pp. 427–434.
- Kikuno Y, Ojima and N Yamashita. 1986. Chromosomes of the flounder *Paralichthys olivaceus*. *Japan Acad.* pp. 194–196
- Kim DS, Nam YK, Noh JK, Park CH, Chapman FA. 2005. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. *Ichthyological Research.* 52 (1): pp. 94–97.
- Kipling D, Mitchell Masumoto, H E Wilson, L Nicol, and H J. 1995. CENP-B binds a novel centromeric sequence in the Asian mouse *Mus caroli*. *Cooke Mol Cell Biol.* 15(8): 4009–4020. PMID: PMC230640.
- Kipling D. 1995. *The telomere.* Oxford University Press Inc. New York.
- Kligerman AD & Bloom SE. 1977. Rapid Chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 266-269.
- Köhler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR. Exchange of Protein Molecules Through Connections Between Higher Plant Plastids. *Science* 27. Vol. 276 no. 5321 pp. 2039-2042.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, and Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature.* 352, 117–121.

- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol. Reprod. Dev. 59: 359-370.
- Kynard B & M Kieffer. 2002. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. J. Appl. Ichthyol. 18(4-6):505-508.
- Larkin P, Knoebl I, and Denslow ND. 2003. Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 136(2):149-61.
- Lee H. Wong, Brettingham-Moore KH, Chan L, Quach JM, Anderson MA, Northrop EL, Hannan R, Saffery R, Shaw ML, Williams E and Choo KHA. 2007. Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. Genome Res. 17(8): 1146–1160.
- Li B, Dettai A, Cruaud C, Couloux A, Desoutter-Meniger M, Lecointre G. 2009. RNF213, A new nuclear marker for acanthomorph phylogeny. Mol Phylogenet Evol. 50 345–363.
- Liu S, Govoroun M, D’Cotta H, Ricordel MJ, Lareyre JJ, McMeel OM, Smith T, Nagahama Y, Guiguen Y. 2001. Expression of cytochrome P45011 $\alpha\beta$  (11 $\alpha\beta$ -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 75: 291-298.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25(4):402-8.
- Loffler KA, Zarkower D & Koopman P. 2003. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. Endocrinology. 144 3237–3243.

- Loidl J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome*. 33 (6):759-78.
- Luckenbach JA, Iliev DB, Goetz FW, Swanson P. 2008. Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reprod Biol Endocrinol*. 18;6:2.
- Ludwig A, Debus L, Lieckfeldt D, Wirgin I, Benecke N, Jenneckens I, Williot P, Waldman JR & Christian Pitra. 2002. Fish populations: When the American sea sturgeon swam east. *Nature*. 419, 447-448.
- Macas J, Pozárková D, Navrátilová A, Nouzová M, Neumann P. 2000. Two new families of tandem repeats isolated from genus *Vicia* using genomic self-priming PCR. *Mol Gen Genet*. 263(5):741-51.
- Mair GC & Abella TA. 1997. Technoguide on the production of Genetically Male Tilapia. Freshwater Aquaculture Centre, Central Luzon State University, Philippines.
- Martinez-Zapater J.M, Estelle MA, and Somerville CR. 1986. A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet*. 204,417-423.
- Martins RS, Deloffre LA, Mylonas CC, Power DM, Canário AV. 2007. Developmental expression of DAX1 in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: lack of evidence for sexual dimorphism during sex differentiation. *Reprod Biol Endocrinol*. 5:19.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*. 417: 559–563.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau E, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y. 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci*. 104(10): 3865–3870.



- McCormick CR, DH Bos and JA DeWoody. 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol. 24, 643–645.
- McMaster GS, Morgan JA, Wilhelm WW. 1992. Simulating winter wheat spike development and growth. Agric. For. Meteorol. 60, 193-220.
- Mikio Kato. 1999. Structural bistability of repetitive DNA elements featuring CA/TG dinucleotide steps and mode of evolution of satellite DNA. 1999. Eur J Biochem. 265 (1):204-9.
- Miklos G.L. 1985. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. Molecular Evolutionary Genetics. pp. 241-321.
- Mivart St G. 1871. The genesis of species. Macmillan, London.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue J.G, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai S.M, Nishida M. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 26, 121–138.
- Moghim M, Vajhi AR, Veshkini A, Masoudifard M. 2002. Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography. J. Appl. Ichthyol.. 18:325–328.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet. 14(1):62-8.
- Müller H and Sxhweise B. 1994. Biochemical Applications for UV/ Vis. Spectroscopy DNA, Protein and Kinetic Análisis. Perkin Elmer. Alemania.
- Nakajima R, Noma K, Ohtsubo H, Ohtsubo E. 1996. Identification and characterization of two tandem repeat sequences (TrsB and TrsC) and a retrotransposon (RIRE1) as genome-general sequences in rice. Genes Genet Syst. 71 (6):373-82.

- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2005. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of 188 testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun.* 333, pp. 729-736.
- Nakano M, Okamoto Y, Ohzeki J and Masumoto H. 2003. Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic-satellite sites on human chromosomes. *J Cell Sci.* 116 (Pt19):4021-34.
- Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H and Loh DY. 1994. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci.* 91, 3700-3704.
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Scharl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci.* 99: 11778–11783.
- Navajas-Pérez R, de la Herrán R, Gonzalez Lopez G, Jamilena M, Lozano, R, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Garrido-Ramos M.A. 2005. The Evolution of Reproductive Systems and Sex-Determining Mechanisms Within *Rumex* (Polygonaceae) Inferred from Nuclear and Chloroplastial Sequence Data. *Mol Biol Evol.* 22:1929-1939.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Press, New York.
- Norman JR. 1934. A systematic monograph of the flatfishes (Heterosomata): Psettodidae, Bothidae, Pleuronectidae. *Brit. Mus. London*, 459 pp.
- Ohno S and Atkin NB. 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. *Chromosoma.* 18:455-466.
- Ohno. 1970. *Evolution by gene duplication*. ISBN0-04-575015-7.
- Ohshima A, Inouye S and Inouye M. 1992. *In vivo* duplication of genetic elements by the formation of stem-loop DNA without an RNA intermediate. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 1016-1020.

- Okada T, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, Masumoto H. 2007. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell*. 131(7):1287-300
- Omoto N , Maebayashi M, Adachi S, Arai K, Yamauchi K. 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female×*Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*. Vol. 245, 1-4, pp. 39–47.
- Orrell TM and K. E. Carpenter. 2004. A phylogeny of fishes of the family Sparidae (Perciformes: Percoidei) inferred from mitochondrial sequence data. *Mol Phylogenet Evol*. 32: 425-434.
- Ota K, Tateno Y, Gojobori T. 2003. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). *Gene*. 317(1-2):187-93.
- Palomeque T, Lorite P. 2008. Satellite DNA in insects *Heredity* 100:564–573.
- Pardo B, Bouza C, Castro J, Martínez P and Sánchez L. 2001. Localization of ribosomal genes in Pleuronectiformes using Ag-, CMA3-banding and *in situ* hybridization. *Heredity*. Vol. 86 | 5, pp. 531 – 536.
- Pardo BG, Machordom A, Foresti F, Porto-Foresti F, Azevedo MFC, Bañon R, Sánchez L, Martínez P. 2005. Phylogenetic analysis of flatfish (Order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16s rDNA sequences. *Scientia Marina*, Vol 69, no. 4.
- Peichel CL, Ross JA, Matson CK, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Myers R, Mori S, Schluter D, Kingsley DM. 2004. The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Current Biology* 14: 1416-1424.
- Peng Z, He S, Wang J, Wang W, Diogo R. Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. 2006. *Gene*. Epub 2006 Feb 14.
- Petochi T, Di Marco P, Donadelli V, Longobardi A, Corsalini I, Bertotto D, Finoia MG and Marino G. 2011. Sex and reproductive stage identification of

sturgeon hybrids (*Acipenser naccarii*, *Acipenser baerii*) using different tools: ultrasounds, histology and sex steroids. J. Appl. Ichthyol.. Vol. 27, I 2, pp. 637–642.

- Petrović V & M Plohl. 2005. Sequence divergence and conservation in organizationally distinct subfamilies of *Donax trunculus* satellite DNA. Gene, Vol. 362, pp. 37-43.
- Pezer Ž, Ugarković Đ. 2008. RNA Pol II Promotes Transcription of Centromeric Satellite DNA in Beetles. PLoS ONE. 3(2): e1594.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29(9):e45.
- Piferrer F & Y Guiguen. 2008. Fish gonadogenesis. Part 2. Molecular biology and genomics of sex differentiation Rev. Fish. Sci. 16(S1): 35-55.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrović N, Mantovani B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. Gene. Vol. 409, no1-2, pp. 72-82.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrović N, Mantovani B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. Gene. Epub 2007 Dec 4. Review.
- Price DJ. 1984. Genetics of sex determination in fishes: a brief review, pp. 77-89 en Fish reproduction: Strategies and tactics.
- Reed KM, Dorschner MO, Phillips RB. 1997. Characteristics of two salmonid repetitive DNA families in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Cytogenet Cell Genet.;79(3-4):184-7.
- Reed KM, Phillips RB. 1995. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. Chromosoma. 104(4):242-51.
- Robles F, De la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Ruíz-Rejón C, Bruzón MA, Ruíz-Rejón M. 2003. Caracterización del satélite Eco RI en el voraz

(*Pagellus bogaraveo*). IX CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA. Libro de resúmenes. pp 211-212.

- Robles F, de la Herrán R, Ludwig A, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Garrido-Ramos M. 2004. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene*. Vol. 338, I 1, 18, pp. 133-142.
- Rozen S y Skaletsky HJ. 1998. Primer3. Code available at [http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi).
- Rudert F, Bronner S, Garnier JM, Dolle P. 1995. Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm Genome*. 6 (2):76-83.
- Russell DG, J Dant, and S Sturgill-Koszycki. 1996. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* containing vacuoles are dynamic, fusion competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J. Immunol*. 156:4764–4773.
- Saeed Keyvanshokoo and Ahmad Gharaei. 2010. A Review of Sex Determination and Searches for Sex-Specific Markers in Sturgeon. *Aqua. Res.*
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2300 p.
- Sambrook and Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Scharl M. 2004. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14:634–641.
- Schwarzacher T, Pat Heslop-Harrison. 2000. *Practical in Situ Hybridization*. Editions Bios.
- Schweizer M, Lebert C, Hölte J, Roberts LM, Schweizer E. 1984. Molecular cloning of the yeast fatty acid synthetase genes, FAS1 and FAS2:

illustrating the structure of the FAS1 cluster gene by transcript mapping and transformation studies. *Mol Gen Genet.* 194(3):457-65.

- Schweizer M, Takabayashi K, Geiger T, Laux T, Biermann G, Buhler JM, Gauthier F, Roberts LM, Heinrich PC. 1987. Identification and sequencing of cDNA clones for the rodent negative acute-phase protein alpha 1-inhibitor 3. *Eur J Biochem.* 164(2):375-81.
- Shen XY, Cui JZ, Gong QL, Nagahama Y. 2007. Cloning of the full-length coding sequence and expression analysis of Sox9b in guppy (*Poecilia reticulata*). *Fish Physiol. Biochem.* 33:195-20.
- Shokooh SK. 2003. The possibility of sex identification in Bluga (*Huso huso*) by using PCR-RAPD technique. M.Sc. Thesis. 2003. Tarbiat modarres University, Iran. 51 pp.
- Simoens CR, Peleman J, Valvekens D, Van Montagu M, Inzé D. 1988. Isolation of genes expressed in specific tissues of *Arabidopsis thaliana* by differential screening of a genomic library. *Gene.* 67(1):1-11.
- Singer MF. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76: 67-112.
- Smith GP. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528-535.
- Sola L, S Cataudella and E Capanna. 1981. New developments in vertebrate cytotaxonomy III. Kariology of bony fishes: a review. *Genetica* 54:285-328.
- Stites SW, Plautz MW, Bailey K, Brien-landner AR, Wesselius LJ. 1999. Increased concentrations of iron and isoferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 160(3): 796-801.
- Strachan T, Webb D and Dover G. 1985. Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J.* 4: 1701-1708.
- Takahashi T, Kawamura Y, Sakata N, Elmesiry GE, Takemon Y, Tanida K, Minoshima S, Shimizu N, Kato M. 2001. Nucleotide sequence of BamHI

family satellite DNA and its unit length polymorphism in bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Mol. Biol. Rep. 28:119–122.

- Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T. 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. Gene. 202(1-2):167-70.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24: 4876-4882.
- Thorgaard GH. 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science. 196(4292):900-2.
- Tinti F, Colombari A, Vallisneri M, Piccinetti C, Stagni A.M. 1999. Comparative analysis of a mitochondrial DNA control region fragment amplified from three Adriatic flatfish species and molecular phylogenesis of Pleuronectiformes. Mar Biotechnol 1: 20-24.
- Topp CN, Zhong CX, Dawe RK. 2004. Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. Source Departments of Plant Biology and Genetics. Proc Natl Acad Sci. 101 (45):15986-91.
- Van Eenennaam AL. 1997. Genetic analysis of the sex determination mechanism of white sturgeon (*Acipenser transmontanus Richardson*). University of California, Davis.
- Vega LE, Díaz I, Cross y LL. 2002. Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Bol. Ins. Esp. Oceanogr; 18(1-4), 245-250.
- Verneau O, Moreau C, Catzeflis F.M, Renaud F. 1994. Phylogeny of flatfishes (Pleuronectiformes): comparisons and contradictions of molecular and morphoanatomical data. J Fish Biol. 45: 685-696.

- Viñas A, Abuín M, Pardo BG, Martínez P, Sánchez L. 2004. Characterization of a new HpaI centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. *Genetica*. 121(1):81-7.
- Vitturi E, Catalano and D. Colombera. 1993. Chromosome analysis of *Bothus podas* (Pisces, Pleuronectiformes) from the Mediterranean Sea. *J Fish Biol*. 43:221-227.
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn*. 236(8):2198-206.
- Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC. 2003. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*. 11 (3):584.
- Von Hofsten J, Olsson PE. 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol*. 3:63. R.
- Wang DS, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Sakai F, Sudhakumari CC, Suzuki T, Yoshikuni M, Matsuda M, Morohashi K, Nagahama Y. 2002. Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 297(3):632-40.
- Wright M, Akou-Edi D and Stabrawa A. 1993. Infestation of dried cassava and maize by *Prostephanus truncatus*: entomological and socio-economic assessments for the development of loss reduction strategies. Larger Grain Borer Project, Chatham, U.K. pp 141.
- Wuertz S, Gaillard S, Barbisan F, Carle S, Gongiu L, Forlani A, Aubert J, Kirschbaum F, Tosi E, Zane L, Grillasca JP. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*. 258, 685–688.
- Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. *Fish physiology. Reproduction and growth bioluminescence, pigments, and poisons*. Academic Press. Vol. 3: pp. 117-175.



- Yarmohammadi M, Pourkazemi M, Chakmehdouz F, Kazemi, R. 2011. Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. J. Appl. Ichthyol. Vol 27, no. 2. pp 157–161.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, et al. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature. 372 (6507):635-41.
- Zhang W, Yi C, Bao W, Liu B, Cui J, Yu H, Cao X, Gu M, Liu M and Cheng Z. 2005. The transcribed 165-bp CentO satellite is the major functional centromeric element in the wild rice species *Oryza punctata*. Plant Physiol. 139 (1):306-15.